

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen

Abteilung Innere Medizin III

(Schwerpunkt: Kardiologie und Angiologie)

**Die myokardiale Expression von
Anaphylatoxinrezeptoren auf CD11c⁺ Zellen und deren
Korrelation mit entzündlichen Veränderungen des
Herzmuskels sowie der Prognose in Patienten mit
Nicht-ischämischer Kardiomyopathie.**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Philipp Alexander Maier

2020

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. H. Langer

2. Berichterstatterin: Professorin Dr. V. Mirakaj

Tag der Disputation: 31.08.2020

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	8
1.1	Pathogenese der Nicht-ischämischen Kardiomyopathien.....	9
1.1.1	NICM: Inflammatorische Kardiomyopathie am Beispiel der Myokarditis	9
1.1.2	NICM: Nicht-inflammatorische Kardiomyopathien	10
1.2	Dendritische Zellen	11
1.2.1	Dendritische Zellen und Herzinsuffizienz.....	13
1.2.2	Dendritische Zellen und inflammatorische Kardiomyopathie:	13
1.3	Das Komplementsystem	15
1.3.1	Rezeptorinteraktion der Anaphylatoxine C3a und C5a.....	16
1.3.2	Der C3a-Rezeptor (C3aR)	16
1.3.3	Der C5a Rezeptor (C5aR)	17
1.3.4	Die Anaphylatoxine C3a und C5a.....	17
1.3.4.1	C5a.....	18
1.3.4.2	C3a.....	18
1.3.5	Komplementsystem und Kardiomyopathie	20
1.7	Fragestellung	22
2.	Studiendesign Methoden und Materialien	22
2.1	Materialien	22
2.2	Studiendesign, Patientenkohorte und Bestimmung klinischer Risikofaktoren.....	23
2.3	Studienendpunkte und Follow-up.....	25
2.4	Endomyokardbiopsie, Immunhistochemie und histopathologische Auswertung.....	26
2.5	Statistische Auswertung:	28
3.	Ergebnisse	29
3.1	Das Ausmaß der durch Myokardbiopsie nachgewiesenen Fibrose und Entzündung unterscheidet sich zwischen Patienten mit inflammatorischer und nicht-inflammatorischer Kardiomyopathie.....	29
3.2	Die Expression des Anaphylatoxinrezeptors C3aR and Co-Expression von C3aR und CD11c ist in Patienten mit inflammatorischer Kardiomyopathie erhöht.....	34
3.3	Die Expression von C3aR und Ko-Expression auf CD11c ⁺ Zellen in Myokardbiopsien ist in Patienten mit Expression etablierter Entzündungsmarker erhöht.	36

3.4 Die Expression von C3aR und Ko-Expression von C3aR auf CD 11c ⁺ Zellen sind Prognosefaktoren bei Patienten mit nicht-ischämischer Herzinsuffizienz.	39
4. Diskussion	45
5. Zusammenfassung:	55
5.1 Definition der Fragestellung	55
5.2 Methodik	55
5.3 Ergebnisse	55
5.3 Diskussionsergebnis/Schlussfolgerung	55
6. Veröffentlichungen	57
7. Literaturverzeichnis	58
8. Erklärung zum Eigenanteil.....	71
9. Danksagung	72

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abbildung 1 - Flussdiagramm zur Illustration der Entscheidungsfindung hinsichtlich der Durchführung einer Endomyokardbiopsie.....	24
Tabelle 1 - Ausgangswerte der Patientenkohorte.....	30
Tabelle 2 - Klassifikation der Kardiomyopathien entsprechend klinischer und histopathologischer Kriterien.....	31
Abbildung 2 - Unterschiedliche Ausprägung des Fibrosegrades sowie der Anzahl CD3 ⁺ bzw. CD68 ⁺ Zellen in Patienten mit inflammatorischer oder nicht-inflammatorischer Kardiomyopathie.....	33
Abbildung 3 - Die Expression des Anaphylatoxinrezeptors C3aR und Co-Expression von C3aR und CD11c ist in Patienten mit inflammatorischer Kardiomyopathie erhöht.....	36
Abbildung 4 - vermehrte C3aR Expression und Ko-Expression auf CD11c ⁺ Zellen in Myokardbiopsien in Patienten mit Expression von MHC II und CD 68	38
Abbildung 5 - Vermehrte C3aR Expression und Ko-Expression auf CD11c ⁺ Zellen bei Nachweis von HHV6, jedoch nicht bei Nachweis von EBV oder PVB19.....	40
Tabelle 3 - Klinisches Outcome während des Follow-up.....	41

Abbildung 6 - Keine Korrelation der LVEF mit vermehrter C3aR Expression und Ko-Expression auf CD11c ⁺ Zellen.....	42
Abbildung 7 - keine Korrelation des LVEDD mit vermehrter C3aR Expression und Ko-Expression auf CD11c ⁺ Zellen.....	43
Abbildung 8 - Patienten ohne Nachweis einer C3aR Expression erreichen den primären Endpunkt öfter.....	44
Tabelle 4 - Eine fehlende C3aR Expression auf CD11c ⁺ Zellen ist ein unabhängiger Vorhersagewert des primären Studienendpunktes.....	45

Abkürzungsverzeichnis

C3aR	C3a-Rezeptor
C5aR	C5a-Rezeptor
CD	Cluster of Differentiation
CVB-3	Coxsackievirus B-3
DC	Dendritische Zelle
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
HNCM	Hypertrophic non-obstructive Cardiomyopathy
HOCM	Hypertrophic obstructive Cardiomyopathy
ICM	Ischemic Cardiomyopathy
IL	Interleukin
LVEF	Linksventrikuläre Ejektionsfraktion
MAC	Membrane Attack Complex
MHC	Major Histocompatibility Complex
NICM	Non-ischemic Cardiomyopathy
NYHA	New York Heart Association
PBM	Peripheral Blood Mononuclear (cells)
TLR	Toll-like Receptor
Tn I	Troponin I
TNF	Tumornekrosefaktor
EMB	Endomyokardbiopsie
BNP	Brain-type Natriuretic Peptide
VT	Ventrikuläre Tachykardie
TTE	Transthorakale Echokardiografie
AHA	American Heart Association
ESC	European Society of Cardiology
BMI	Body Mass Index
CRP	C-reaktives Protein

LVEDD	Linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser
LCA	Left Coronary Artery
MRT	Magnetresonanztomografie
LGE	Late Gadolinium Enhancement
EKG	Elektrokardiogramm
LVF	Linksventrikuläre Funktion
PBS	Phosphate Buffered Saline
EV	Enterovirus
CMV	Cytomegalievirus
EBV	Epstein-Barr Virus
RNA	Ribonucleic Acid
PCR	Polymerase Chain Reaction
HRP	Horseradish Peroxidase
DAB	3,3'-Diaminobenzidine
IgG	Immunglobulin G
LSAB	Labelled avidin-biotin Method
HLA	Human Leucocyte Antigen
WHO	World Health Organisation
IQR	Interquartile Range
HR	Hazard Ratio
ICM	Inflammatory Cardioymopathy
MRA	Mineralkortikoid-Rezeptorantagonist
HHV	Humanes Herpesvirus
hsCRP	High-sensitivity CRP

1. Einleitung

Das breite Spektrum an systemischen oder kardialen Erkrankungen, die eine Schädigung des Herzmuskels zur Folge haben, lässt sich in die Kategorien der Ischämischen Kardiomyopathien (ICM) sowie der Nicht-ischämischen Kardiomyopathien (NICM) einordnen. Die Nicht-ischämischen Kardiomyopathien repräsentieren eine sehr heterogene Gruppe von Erkrankungen denen als Gemeinsamkeit lediglich die Abwesenheit einer ischämischen Komponente in der Pathogenese zugrunde liegt [1]. Trotz der Heterogenität der Grunderkrankungen gleicht sich die pathophysiologische Endstrecke. Sie können zu einer hochgradigen Schädigung des Myokards mit resultierender eingeschränkter Linksherzfunktion führen und im ungünstigsten Fall zu Herzversagen und Tod des Patienten [2], [3]. Prinzipiell sind weitere Unterteilungen der NICM möglich. Sinnvoll ist die Unterscheidung einer entzündlichen von einer nicht entzündlichen Genese, beispielsweise anhand des Vorliegens oder der Abwesenheit von Entzündungszeichen bei der histopathologischen Analyse von Myokardbiopsien [4].

Wie bei allen Entzündungsvorgängen im menschlichen Organismus liegt auch den inflammatorischen Prozessen im Herzmuskel ein komplexes Zusammenspiel aus angeborener und adaptiver Immunantwort, vermittelt durch ein breites Spektrum von Immunzellen, proinflammatorischen Proteinen beziehungsweise Zytokinen und Chemokinen zu Grunde [5]. Trotz einer breiten Datenbasis, die die konkrete Beteiligung von dendritischen Zellen an den Entzündungsvorgängen belegt sowie Hinweisen auf die mögliche Beteiligung des Komplementsystems, sind deren mögliche diagnostische und prognostische Relevanz wenig erforscht [6], [7]. In der vorgelegten Arbeit soll der Frage nachgegangen werden, ob die Expression von C3a- beziehungsweise C5a-Rezeptoren auf CD11c⁺ dendritischen Zellen Rückschlüsse auf die Entzündungsaktivität im Herzmuskel sowie das Outcome in Bezug auf definierte Endpunkte zulässt. Untersuchungsgegenstand waren Endomyokardbiopsien sowie klinische und laborchemische Parameter von am Universitätsklinikum Tübingen hospitalisierten Patienten mit Nicht-ischämischer Kardiomyopathie sowohl entzündlicher als auch nicht entzündlicher Genese.

1.1 Pathogenese der Nicht-ischämischen Kardiomyopathien

1.1.1 NICM: Inflammatorische Kardiomyopathie am Beispiel der Myokarditis

Als Auslöser dominieren neben toxischen Noxen vor allem Infektionen und Autoimmunerkrankungen. Zu nennen sind hier Erreger wie Coxsackie Virus B, Parvovirus B19, Epstein-Barr-Virus, Herpesviren sowie Erkrankungen wie Sarkoidose oder Wegener Granulomatose (granulomatöse Polyangiitis) [8] [9]. Erkenntnisse, vorwiegend aus dem Mausmodell, liegen im größten Umfang zur viralen Myokarditis vor. Die Viren dringen über verschiedene Wege in die Zellen des Herzgewebes ein. Prominentes Beispiel ist der Coxsackie Adenoviral Receptor (CAR) über den unter anderem Coxsackieviren als auch einige Adenoviren ihr Genom in die Wirtszelle einschleusen [10], [11]. Bestimmte virale Enzyme der Enteroviren schädigen das Zytoskelett des Herzmuskels auch direkt über Enzyme wie Proteasen [12]. Die Immunantwort durchläuft sukzessive die Phasen der unspezifischen und spezifischen Immunabwehr. Antigenpräsentierende Zellen wie dendritische Zellen präsentieren Virusfragmente und triggern eine proinflammatorische Signalkaskade; Es kommt zur verstärkten Ausschüttung von Zytokinen wie Tumornekrosefaktor (TNF) Alpha und Interleukin (Il) 1 β [13]–[15]. Im proinflammatorischen Milieu bildet sich das Vollbild der Entzündung des Herzmuskels aus. Das Zellinfiltrat eingewanderter Zellen in das Herzgewebe umfasst Makrophagen, neutrophile Granulozyten, B-Zellen, Mastzellen, dendritische Zellen sowie CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen [16], [17].

Phase 2 Autoimmunität und Chronifizierung:

Zu erwarten wäre nach Reduktion oder Beseitigung der Viruslast ein Rückgang der zellimmunologischen Aktivität auf ein Normalmaß. Im Rahmen der Myokarditis bleibt die Entzündungsaktivität jedoch oftmals bestehen und T-Zellen richten sich gegen körpereigenes Gewebe [18]. Im Rahmen der Freisetzung von körpereigenen Gewebebestandteilen aus zerstörten Herzstrukturen werden

verstärkt autoreaktive T-Zell Klone rekrutiert. Im Mausmodell der autoimmunen Myokarditis konnte gezeigt werden, dass auch T-Zellen, die normalerweise wenig Autoreaktivität zeigen in dieser verstärkt werden können, wenn sie mit hohen Dosen von Selbstantigenen beladen werden [19]–[21]. Diese T-lymphozytäre zytotoxische Wirkung sowie die Bildung von Autoantikörpern gegen Bestandteile des Herzgewebes konnte in humanem Gewebe gezeigt werden [22].

Phase 3 dilatative Kardiomyopathie und Herzinsuffizienz

Die im Rahmen der persistierenden (Auto-)Immunreaktion ausgeschütteten Zytokine triggern beispielsweise Matrix-Metalloproteinasen, die für Remodelling-Prozesse des Myokards verantwortlich sind und eine Dilatation begünstigen, des Weiteren befördern Interleukine fibrotische Umbauprozesse [23]–[25]. Aus dieser andauernden Schädigung des Herzens kann schließlich eine dilatative Kardiomyopathie mit konsekutiver Herzinsuffizienz folgen. Relevant sind hierbei natürlich auch bereits während der aktiven Virusinfektion entstandene Vorschädigungen [12].

1.1.2 NICM: Nicht-inflammatorische Kardiomyopathien

Die unter dem Label Nicht-inflammatorische, Nicht-ischämische Kardiomyopathien zusammengefassten Krankheitsbilder weisen eine große Bandbreite auf und umfassen unter anderem relativ seltene Erkrankungen wie Mitochondropathien oder die stressinduzierte Tako-Tsubo-Kardiomyopathie [1]. In dem dieser Arbeit zugrunde liegenden Patientenkollektiv sind die relativ häufigen Krankheitsbilder der dilatativen Kardiomyopathie, der Hypertroph-obstruktiven Kardiomyopathie sowie der Hypertroph nicht obstruktiven Kardiomyopathie vertreten. Die Auslöser der dilatativen Kardiomyopathie sind vielfältig und reichen von neuromuskulären Erkrankungen bis hin zu übermäßigem Alkoholkonsum [26], [27]. Einen signifikanten Anteil macht des Weiteren die idiopathische dilatative Kardiomyopathie aus bei der kein zugrunde liegender Auslöser zu eruieren ist [1], [28]. Konsens besteht, dass genetische Faktoren eine wesentliche Rolle spielen [29]. Im Fall der dilatativen Kardiomyopathie geht man davon aus, dass in bis zu 40% der Fälle eine genetische Ursache vorliegt [30], [31]. Die primäre HNCM bzw. HOCM ist eine

genetische Erkrankung; Zwar können diverse Grunderkrankungen wie chronischer Hypertonus eine kompensatorische Hypertrophie des linken Ventrikels hervorrufen, die Bezeichnung Hypertrophe Kardiomyopathie ist definitionsgemäß jedoch der genetischen Form des hypertrophen Remodelling des Herzmuskels aufgrund von Mutationen der Myofilamente vorbehalten [32]. Die Unterteilung in eine obstruktive und nicht-obstruktive Form hinsichtlich des Vorliegens einer stenosierenden Komponente des linksventrikulären Ausflusstraktes ist relevant da hiervon klinisches Outcome und Behandlungsregime wesentlich beeinflusst werden [33].

1.2 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen (DC) stellen die wichtigsten antigenpräsentierenden Zellen des menschlichen Organismus dar. Einige Funktionen überschneiden sich mit denen anderer antigenpräsentierender Zellen wie Monozyten/Makrophagen und B-Zellen. Exklusiv den dendritischen Zellen zugerechnete Eigenschaften sind beispielsweise die Stimulierung naiver T-Zellen. Die Hauptaufgabe unreifer dendritischer Zellen besteht darin im peripheren Gewebe zu patrouillieren wo sie unter anderem von Entzündungsherden angezogen werden und dort Antigene aufnehmen [34]. Ihren Ursprung haben dendritische Zellen im Knochenmark wo sie aus CD34⁺ hämatopoetischen Progenitorzellen hervorgehen [35], [36]. Im Zuge der Zirkulation im Blutkreislauf bilden die Zellen je nach Lokalisation verschiedene Oberflächenmerkmale und Aktivitätsprofile aus. Anhand dessen können die dendritischen Zellen unter anderem in epitheliale dendritische Zellen (Langerhanszellen), interstitielle dendritische Zellen, CD11⁻ und CD11⁺ dendritische Zellen unterteilt werden [37]–[39]. Nach Antigenkontakt beziehungsweise -aufnahme wandern dendritische Zellen in die lymphatischen Organe wie die Milz ein. Im Zuge der Ausreifung verlagert sich der Schwerpunkt hin zur Antigenpräsentation: Durch Ausschüttung von Chemokinen wie Il-12 ziehen DC hier T- und B-Lymphozyten an [40].

Zur Migration in die lymphatischen Organe, auch Homing genannt, werden dendritische Zellen durch Chemokine angeregt. Daneben spielt auch C5a eine

Rolle [41], [42]. Ihre Wirkung vermitteln die dendritischen Zellen mittels einer spezifischen Klasse von Oberflächenproteinen dem Major Histocompatibility Complex (MHC). Unterteilt wird diese Gruppe in die Unterformen MHC I und II. An MHC II gekoppelte Antigene werden CD4⁺ „Helfer“ T Lymphozyten präsentiert welche darauf an die dendritischen Zellen binden [43]. Zur Interaktion mit den T-Zellen dienen des Weiteren die kostimulatorischen Moleküle aus der Familie der Cluster of Differentiation wie beispielsweise CD 86/B7-2 [44]. Diese Bezeichnung tragen sie deshalb, da die Präsentation der Antigene über die MHC-Komplexe der antigenpräsentierenden Zellen nur erfolgreich verläuft, wenn die T-Zelle parallel auch über die genannten Oberflächenmoleküle mit der antigenpräsentierenden Zelle kommuniziert und damit "kostimuliert" wird [45], [46]. Um mit CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen zu interagieren, die die Fähigkeit haben, infizierte Zellen sowie Tumorzellen auszuschalten, präsentieren dendritische Zellen Antigene über Oberflächenmoleküle des Typs MHC I. Dendritische Zellen sind jedoch nicht nur an der Induktion der T-Zell vermittelten Immunität beteiligt, sondern erfüllen auch eine wichtige Rolle bei der Verhinderung von unkontrollierten oder überschießenden Immunreaktionen [47]. Wesentliches Prinzip der Abwehr von potentiell pathogenen Fremdartigen im Körper ist die gleichzeitige Erkennung und Schonung von körpereigenen Strukturen anhand ihrer Oberflächenmoleküle (Autoantigene) [35]. Die Rolle der dendritischen Zellen in diesem Prozess besteht in der Präsentation von Autoantigenen. Werden diese von T-Zellen erkannt und gebunden, eliminiert die dendritische Zelle diesen autoreaktiven T- Zell Klon. Es konnte gezeigt werden, dass diese negative Selektion zur Verhinderung von Autoimmunreaktionen zu großen Teilen von dendritischen Zellen getragen wird [48].

B Zell Entwicklung

Neben T-Zellen stellen B-Lymphozyten die zweite Leukozytenklasse des adaptiven Immunsystems dar. B-Zellen unterliegen hierbei ebenfalls dem Prinzip verschiedener Aktivierungsphasen durch Interaktion mit weiteren Zelltypen des Immunsystems. Nach Bindung eines Fremdartigen wandern B-Lymphozyten aus der Peripherie in lymphatische Organe wie zum Beispiel Lymphknoten ein.

Dieser Vorgang ist ebenfalls von kostimulatorischen Signalen abhängig. In diesem Fall ist die gleichzeitige Erkennung des Antigens durch T- Helfer-Zellen und deren kostimulatorische Signale an die B-Zellen Voraussetzung für die klonale Expansion der B-Zellen in den Lymphknoten und deren nachfolgende Differenzierung zu antikörperproduzierenden Plasmazellen. Effekte von dendritischen Zellen wurden hierbei sowohl auf die Proliferation von B-Zellen und auf deren Expression und Sekretion von Antikörpern wie IgG, IgA und IgM beobachtet [49], [50].

1.2.1 Dendritische Zellen und Herzinsuffizienz

Dendritische Zellen spielen eine wichtige, bisher nicht umfassend verstandene Rolle in Kardiomyopathie und konsekutiver Herzinsuffizienz. Die Studienlage ist hier teilweise kontrovers. Allgemein konnte eine Erhöhung der Spiegel von dendritischen Zellen im peripheren Blut in Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz vor Herztransplantation beobachtet werden [51]. In einer anderen Arbeit konnte ein Anstieg im Blut von Herzinsuffizienzpatienten nur beobachtet werden, wenn diese auf eine nicht-ischämische dilatative Kardiomyopathie (DCM) zurückging. Die anderen Patienten wiesen vergleichbare Zahlen über alle NYHA-Stadien hinweg auf [52]. Andere Studien zeigten jedoch eine verminderte Anzahl an zirkulierenden dendritischen Zellen bei Patienten mit dekompensierter Herzinsuffizienz, hier korrelierte die Erholung der Zellzahl sogar mit einer verbesserten linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF). Des Weiteren war ein unzureichender Anstieg ein Prognosefaktor für eine erneute Dekompensation [53].

1.2.2 Dendritische Zellen und inflammatorische Kardiomyopathie:

Im Gewebe des gesunden Herzens stellen dendritische Zellen ca. 1-2% der gesamten Zellpopulation. Bezogen auf die Gesamtzahl der Leukozyten beziehungsweise CD 45⁺ Zellen, machen dendritische Zellen 20-25 % der Zellen aus [54]. Der absolute und relative Anteil dendritischer Zellen an der

Zellpopulation im Myokard unterliegt bei Entzündungsvorgängen signifikanten Schwankungen. Yokohama et al. zeigten im Rahmen einer Autopsiestudie zum Beispiel, dass die Anzahl dendritischer Zellen (HLA-DR⁺, CD 68⁺) in Herzen von Verstorbenen mit manifester akuter Myokarditis im Vergleich zur Kontrollgruppe um den Faktor 8,4 erhöht ist. Des Weiteren persistieren dendritische Zellen offenbar auch Jahre nach der Akutphase der Infektion im Myokard und bilden dort mit B-Zellen und T-Zellen zelluläre Infiltrate um Nekrosezonen [6]. Die Studienlage lässt sich jedoch ebenfalls nicht einheitlich auf die Kausalität reduzieren, dass inflammatorische Prozesse am Herzmuskel oder deren Folgeerkrankungen stets mit einer höheren Zahl an dendritischen Zellen verschiedener Subgruppen korrelieren. Entsprechendes gilt für die umgekehrte Vermutung, dass hohe Zahlen von dendritischen Zellen Myokarditiden befördern und deren Auswirkungen begünstigen. So dokumentierten Pistulli et al. 2013 zum Teil gegenteilige Beobachtungen. Verglichen wurden Endomyokardbiopsien von viruspositiven und virusnegativen DCM Patienten mit post mortem Proben gemachter Herzgesunder [55]. Die Anzahl dendritischer Zellen im Vergleich zu den Kontrollproben war insbesondere in viruspositiven Patienten stark reduziert. Des Weiteren korrelierte eine hohe Anzahl vorhandener dendritischer Zellen mit geringer ausgeprägter Fibrose des Herzmuskels und besserer Funktionalität des Herzmuskels (LVEF). Erkenntnisse aus dem Mausmodell legen eine wichtige Rolle der dendritischen Zellen insbesondere bei autoimmuner Myokarditis nahe. Werden dendritische Zellen mit körpereigenen Antigenen beladen, lösen diese über die T-Zell Interaktion eine Myokarditis aus. Wichtig war hierbei die gleichzeitige Toll-like Rezeptorstimulation. Nach Ausheilung der akuten Myokarditis trat im Verlauf eine Herzinsuffizienz auf [21]. Wenn diese Aktivierung der T-Zellen durch dendritische Zellen ausbleibt, konnte auch nach Injektion eines Autoantigens (Alpha-Myosin-Peptid) keine Myokarditis ausgelöst werden, was die Unverzichtbarkeit der dendritischen Zellen in der Signalkaskade unterstreicht [56].

1.3 Das Komplementsystem

Phylogenetisch gesehen, zählt das Komplementsystem zu den ältesten Komponenten des Immunsystems [57], [58]. Grob lassen sich drei grundlegende Funktionen skizzieren: Die Abwehr von bakteriellen Erregern, die Aktivierung des angeborenen Immunsystems sowie dessen Verzahnung mit dem adaptiven Immunsystem und der Beitrag zur Beseitigung von Immunkomplexen und apoptotischen Zellen [59]. Die grundsätzlichen Abläufe der Komplementaktivierung sind umfassend beschrieben und in zahlreichen Übersichtsarbeiten zusammengefasst. Ein Großteil der Proteine des Komplementsystems wird in der Leber gebildet. Hierbei unterliegen einige von ihnen dem regulatorischen Einfluss von proinflammatorischen Interleukinen im Rahmen der Akute-Phase-Reaktion [60]. Klassische Endstrecke der Komplementreaktion ist die Bildung des Membranangriffskomplexes (membrane attack complex, MAC). Hierbei organisieren sich Proteine in der Membran der Zielzelle zu einer Pore und induzieren so den Zelluntergang. Beschrieben sind drei Wege der Aktivierung des Komplementsystems [59].

- Der klassische Weg
- Der Lektin Weg über die Bindung von Mannose
- Der sogenannte „alternative Weg“

Im ersten Schritt des klassischen Weges binden in Immunkomplexen vernetzte IgM Antikörper die C1q-Komponente [61]. Über Anlagerung und Spaltung verschiedener Proteine des Komplementsystems durch Proteasen und Konvertasen wird schließlich C3 in C3a und C3b gespalten. Der Schritt der Spaltung von C3 ist von zentraler Bedeutung und Bestandteil aller Aktivierungswege, bei jeweils unterschiedlichen Ausgangspunkten. So steht am Beginn des Lektin-Weges die Bindung von bakteriellen Carbohydraten durch Lektine, welche Proteasen aktivieren, die wiederum Komplementproteine spalten [62]. Die dritte Variante der C3 Aktivierung stellt der alternative Weg dar [59]. Im Kreislaufsystem zerfällt ständig C3 und bildet dort in wässrigem Milieu die Form C3(H₂O) [63]. Wie eingangs erwähnt, bildet die Spaltung von C3 in C3a und C3b den gemeinsamen Zwischenschritt aller Aktivierungswege. Freigesetztes C3a wirkt in diesem Zusammenhang als Anaphylatoxin. Elementar für den weiteren

Verlauf der Komplement-Kaskade ist C3b. Dieses setzt sich auf Zelloberflächen, beispielsweise von bakteriellen Erregern ab. Hier erfüllt es zwei zentrale Funktionen. Die Anlagerung von C3b führt zur Markierung der Zielzellen (Opsonierung) welche dann von Phagozyten erfasst werden können [64]. Lagert sich C3b in ausreichender Menge an die Zielzelle an, wird über die Aktivierung der C5-Konvertase die dieses in die Untereinheiten C5a und C5b spaltet die Bildung des Membranangriffskomplexes (MAC) initialisiert [64], [65]. Es formiert sich eine transmembranäre Struktur, die Zytoplasma der Zelle und Extrazellularraum verbindet; Es resultiert die Lyse der Zielzelle.

1.3.1 Rezeptorinteraktion der Anaphylatoxine C3a und C5a

Die Anaphylatoxine C5a und C3a binden unter physiologischen Bedingungen an eine kleine Gruppe von Komplementrezeptoren. Dazu zählen unter anderem der C3a-Rezeptor (C3aR) sowie der C5a-Rezeptor (C5aR). Sie alle gehören zur Gruppe der G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Trotz hoher Sequenzhomologie zwischen C3aR und C5aR binden beide Rezeptoren hochspezifisch die jeweils korrespondierenden Anaphylatoxine C3a beziehungsweise C5a. Kreuzreaktivität, beispielsweise von C3a und C5aR kommt nicht vor [65], [66].

1.3.2 Der C3a-Rezeptor (C3aR)

Der Rezeptor wird von Zellen der myeloischen Reihe exprimiert. Hierzu zählen eosinophile, basophile sowie neutrophile Granulozyten, Mastzellen, Makrophagen und dendritische Zellen [67], [68] Auch auf Vertretern der lymphatischen Zellreihe lässt sich der C3a-Rezeptor (C3aR) nachweisen. Beispielsweise konnte die Expression von C3aR auf murinen CD4⁺ T Zellen sowie deren Hochregulation nach DC-Stimulation gezeigt werden [69]. Die Studienlage ist hier jedoch uneinheitlich. So konnte die Expression von C3aR weder auf humanen naiven T-Zellen noch B-Zellen bestätigt werden [70], [71]. Mittlerweile ist die Expression für weitere Zellpopulationen wie Endothelzellen belegt und auch in Gewebezellen des Herzmuskels konnte C3aR identifiziert

werden [72], [73]. Unabhängig welchen Ursprungs die Zelle ist, wird selektiv C3a gebunden. Physiologisch vorkommende modifizierte Formen wie C3aDesArg werden bereits nicht mehr erkannt [74].

1.3.3 Der C5a Rezeptor (C5aR)

Der C5a-Rezeptor bindet das Anaphylatoxin C5a und in geringerem Maße dessen desarginierte Form C5adesArg. Analog zum C3-Rezeptor konnte der C5a Rezeptor auf zahlreichen Zelllinien nachgewiesen werden. Zu nennen sind ebenfalls neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten, Monozyten und Mastzellen sowie dendritische Zellen [75]–[77]. Strittig ist hingegen die Expression des C5aR auf Zellen der lymphatischen Reihe. Entgegen ersten Studien, die dessen Existenz nahelegten, konnte auch im Rahmen von Screenings verschiedener Zellreihen mittels C5aR spezifischer monoklonaler Antikörper kein Nachweis auf T- und B-Lymphozyten geführt werden [78]. In Studien konnte immunhistochemisch die Expression von C5aR auf Proben des Herzgewebes gezeigt werden [79].

1.3.4 Die Anaphylatoxine C3a und C5a

Entgegen der Begriffsdefinition „Anaphylatoxin“, sind die Peptide C3a und C5a an zahlreichen immunmodulatorischen Vorgängen beteiligt. Ihr Einfluss auf das angeborene und adaptive Immunsystem geht dabei weit über ihre Rolle in der akuten anaphylaktischen Reaktion hinaus. Die Charakterisierung als Entzündungsmediatoren wird dem breiten Wirkspektrum gerechter. Treten die Peptide doch insofern mediatorisch beziehungsweise „vermittelnd“ in Erscheinung, als sie neben klassischen proinflammatorischen Effekten auf die Komponenten der Immunantwort auch antiinflammatorische Effekte vermitteln. Neben dem direkten Einfluss auf die Immunreaktion leisten sie einen wichtigen Beitrag zur Etablierung des die Inflammation begünstigenden Milieus. Durch die Erhöhung der vaskulären Permeabilität wird beispielsweise der Übertritt von Zellen aus der Blutbahn zum Entzündungsherd erleichtert [80]. Folger lässt sich

hieraus eine wichtige Rolle bei der Pathogenese vielfältiger Krankheitsbilder mit inflammatorischer Komponente. Außerdem erfüllen sie wichtige Steuerfunktionen bei der Prägung von Immunzellen unter anderem durch den Umstand, dass C5a und C3a nicht nur ständig systemisch im Körper durch Komplementspaltung anfallen sondern auch lokal durch „prägende“ Immunzellen wie dendritische Zellen gebildet werden [81], [82].

1.3.4.1 C5a

Im Mittelpunkt des Wirkspektrums von C5a steht nach wie vor seine Rolle als hochpotentes Chemotaxin für eine Vielzahl von Immunzellen. Beschrieben ist diese Wirkung unter anderem für neutrophile und eosinophile Granulozyten [83]–[85]. C5a wirkt hier auch als Trigger der Degranulierung [86]. Weitere Zellspezies für die Chemotaxis beschrieben ist, sind Monozyten, Mastzellen und Makrophagen [87]–[89]. Die Interaktion von C5a mit Monozyten und Makrophagen hat außerdem zur Folge, dass diese vermehrt proinflammatorische Zytokine wie Il-1, TNF-Alpha und Il-6 ausschütten [90]. Antigenpräsentierende Zellen wie dendritische Zellen unterliegen ebenfalls dem chemotaktischen Effekt von C5a. Unter den Lymphozyten wirkt C5a chemotaktisch auf naive und Gedächtnis-B-Zellen sowie T-Zellen [91], [92]. Im Zusammenspiel von Antigenpräsentierenden Zellen und T-Zellen wird weiteres C5a und auch C3a freigesetzt. Außerdem kann unter Antigeneinwirkung die Hochregulation der Anaphylatoxinrezeptoren beobachtet werden. Die Blockade dieser Anaphylatoxinwirkung reduziert im Tiermodell wesentlich die T-Zell Antwort sowie die MHC II Expression. C5a und C3a kann also ein wesentlicher Einfluss auf Kostimulation und Rekrutierung von T-Zellen zugeschrieben werden [69].

1.3.4.2 C3a

Im Gegensatz zur klar umrissenen Hauptwirkung von C5a als einem der stärksten Chemotaxine des Körpers, ist die Rolle von C3a vielfältiger [83]. Bezogen auf sekretorische Effekte auf Immunzellen wie Degranulierung

beziehungsweise „oxidative burst“ (H_2O_2 -Ausschüttung) ist die Potenz von C3a meist geringer [93]. Relevante chemotaktische Effekte auf inflammatorische Zellen sind im Versuchsaufbau mit eosinophilen Granulozyten, Mastzellen und dendritischen Zellen dokumentiert [67], [94], [95]. Die Interaktion mit dendritischen Zellen geht über den beobachteten Migrationseffekt hinaus. Dendritische Zellen sind zwar nicht in der Lage C3a direkt zu bilden, besitzen jedoch die enzymatische Ausstattung C3a von C3 abzuspalten. Dadurch wird die lokale Erhöhung der C3a Konzentration erreicht und autokrine Stimulation ermöglicht [96]. Bei der Untersuchung von Mechanismen der Transplantatabstoßung konnte gezeigt werden, dass die C3a Interaktion mit dem korrespondierenden C3a-Rezeptor auf dendritischen Zellen von großer Bedeutung für die Stimulation der T-Zellen ist. Die Blockierung des Rezeptors hatte unter anderem die Herunterregulierung von MHC II an der DC-Oberfläche und damit einhergehend gestörtes Priming der $CD4^+$ T-Zellen auf präsentierte Alloantigene zur Folge [97]. C3a können demzufolge nicht einseitig proinflammatorische beziehungsweise stimulierende Effekte auf das Immunsystem zugeschrieben werden. Zur Balance der Immunantwort trägt C3a unter anderem durch die Reduktion der Ausschüttung von polyklonalen Antikörpern durch B-Zellen bei, vermittelt über T-Suppressor-Zellen [98], [99]. Der mediatorische Effekt lässt sich auch bei der Wirkung des C3a auf die Zytokinausschüttung zeigen. So sorgt die Stimulation von PBM-Zellen (peripheral blood mononuclear cells) mit C3a zwar dafür, dass diese verstärkt TNF-Alpha und Interleukin-1 ausschütten. Diese Kausalität gilt jedoch nur für adhärenente PBM-Zellen. Bei nicht adhärenenten PBM-Zellen tritt mit einer Drosselung der Ausschüttung von Interleukin-1 und Tumornekrosefaktor-Alpha der gegenteilige Effekt ein. Aus dieser Beobachtung lässt sich folgern, dass C3a zwar die lokale und damit gezieltere Synthese von Zytokinen fördert, gleichzeitig aber die systemische durch zirkulierende Zellen hemmt und so überschießende Zellreaktionen einbremst [54]. Zhang et al beschreiben für C3a im Zusammenspiel mit Lipopolysacchariden und Toll-like-Rezeptoren eine Erhöhung der Ausschüttung von Interleukin 6, Interleukin 1β , sowie Tumornekrosefaktor Alpha. Die Ausschüttung von Interleukin 12 ging unter

Bindung von C3a am C3a Rezeptor zurück. Konkret beeinflusste C3aR vor allem TLR 9 wohingegen C5a seine Wirkung im Zusammenspiel mit C5aR entfaltet. Die stärkere Normalisierung der Interleukin Konzentrationen im Serum nach Ausschaltung von C5aR als nach Blockierung von C3aR deutet auch hier auf eine höhere Wirkstärke des C5a hin [100].

1.3.5 Komplementsystem und Kardiomyopathie

Die Aktivierung des Komplementsystems scheint bei vielen Herzerkrankungen eine wichtige, in vielen Fällen bislang nur rudimentär verstandene Rolle zu spielen. Korrelationen mit dem Plasmaspiegel von Komplementfaktoren oder der Expression von Rezeptoren sind sowohl für Pathogenese, Schwere des Krankheitsverlaufes bzw. Ausprägung der klinischen Symptomatik sowie Prognose beschrieben. So führt beispielsweise die Injektion von C3a in die Koronararterien im Schweinemodell unter anderem zu Tachykardie, einer Verschlechterung der AV-Überleitung, Linksherzversagen, Vasokonstriktion der Koronararterien sowie Histaminausschüttung [101]. Im Schweine-Modell vermindert die Antagonisierung von C5a die Infarktgröße nach Reperfusion [102]. Auch bei der dilatativen Kardiomyopathie gibt es Hinweise auf eine Komplementabhängigkeit des Pathomechanismus [103]. Am naheliegendsten ist die Beteiligung des unspezifischen Immunsystems an den Entzündungsvorgängen im Rahmen der Myokarditis. In Myokardbiopsien von Myokarditispatienten kann oftmals Coxsackievirus B3 als Verursacher der viralen Infektion nachgewiesen werden. Abgesehen von der Rolle des Komplementsystems bei bakteriellen Infektionen, konnte gezeigt werden, dass C3 und C4 im Stande sind Viren einzuhüllen und so direkt auszuschalten oder die Lyse der infizierten Zelle zu erleichtern [104]. Die im Rahmen der komplementvermittelten Immunreaktion anfallenden Immunkomplexe aus C3, Antikörpern wie IgG und IgM sowie Immunzellen konnten ebenfalls im Myokarditissetting nachweisen werden [105]. Die Tatsache, dass im Umkehrschluss die Abwesenheit der Komplementantwort die Resistenz des Körpers gegen bakterielle und virale Erreger stark beeinträchtigt, lässt sich

entsprechend dem Stand der Forschung ebenfalls konkret auf Myokarditiden übertragen [106]. So nimmt die Infektion mit CVB3 in CR1/2 Knockout Mäusen einen erheblich schwerwiegenderen Verlauf. Die Todesrate der Tiere während der akuten Phase der Infektion ist deutlich erhöht und die Entzündungsaktivität ausgeprägter [105]. Schwerpunkte sind neben der klassischen Rolle von Komplement in der direkten Immunantwort auf pathogene Keime, dessen Rolle in der prolongierten Entzündungsreaktion. Diese Inflammationspersistenz geht, wie in der Einleitung angeführt, oftmals auf Autoimmunprozesse nach Vorschädigung des kardialen Gewebes zurück. Eine Rolle spielt hierbei die Freisetzung des Motorproteins Myosin aus den Muskelzellen und dessen vermutete immunogene Wirkung, also die Provokation einer Immunantwort auf dieses körpereigene Protein über Antigenpräsentation [107]–[109]. Dies kann im Tiermodell durch die Injektion von freiem, herzmuskelspezifischem Myosin in den Mausorganismus ausgelöst werden [110], [111]. Kaya et al. konnten zeigen, dass die Depletion von C3 die Entwicklung der autoimmunen Myokarditis stark hemmt. Verwendung fanden Mäuse, die nicht in der Lage sind funktionelles C5 zu synthetisieren. So konnte ausgeschlossen werden, dass eventuelle Effekte direkt über die Etablierung des MAC Komplexes vermittelt werden. Um die Entzündungsaktivität bei funktionalem oder dysfunktionalem C3 zu zeigen, wurde bei einem Teil der Mauspopulation Komplement depletiert, was zu einer drastisch reduzierten Antikörperproduktion (IgG) gegen zugeführte Antigene führt [66]. Das Modell von Kaya verengt, unter Ausschaltung von C5, den Fokus auf die Rolle von C3 und folglich dessen nachgeschaltete Spaltprodukte C3a, C3b, C3d. Die Depletion von C3 verhinderte auch hier die überschießende Autoimmunreaktion, konkret die Reduktion der myosinspezifischen Autoantikörper und die Reduktion der Konzentration der proinflammatorischen Zytokine Tumornekrosefaktor Alpha und Interleukin-1 [7], [67]. Unklar bleibt der genaue Weg der Wirkungsvermittlung von C3 oder seiner Spaltprodukte. Möglicher Rezeptor ist hier unter anderem auch C3aR.

1.7 Fragestellung

Besteht eine Korrelation der myokardialen Expression von Anaphylatoxinrezeptoren auf CD11c⁺ Zellen mit myokardialen entzündlichen Veränderungen und der Prognose in Patienten mit Nicht-ischämischer Kardiomyopathie?

2. Studiendesign Methoden und Materialien

2.1 Materialien

Sonographie-System	iE33, Philips Medical Systems, Niederlande
Magnetresonanztomograph	1.5 Tesla Tomograph Siemens Medical Systems, Deutschland
Bioptom	Biopsy Forceps, Cordis Corporation, Hialeah, FI, USA
RNA-Fixierung	RNAlater, Ambion Inc, Foster City, CA, USA
Avidin-Biotin-Immunoperoxidase Methode	Vectastain Elite ABC Kit, Vector, Burlingame, CA, USA
Primärantikörper	CD3 (Novocastra Laboratories, Newcastle on Tyne, UK), CD68 (Dako, Glostrup, Dänemark) HLA-DR- α (Dako, Hamburg, Germany)
Blockierlösung	Proteine block serum-free (X0909), Dako, Hamburg, Deutschland
C3aR-Antikörper	H-300; sc-20138, SantaCruz, CA, USA
C5aR-Antikörper	Anti-C5R1, ab59390, abcam, Cambridge, UK
Sekundärantikörper-Mischung	Biotinylated Link Universal, LSAB+System HRP (K0690, Dako, Hamburg, Deutschland
Streptavidin-HRP	LSAB+System HRP K0690, Dako, Hamburg, Deutschland
DAB Substrat Kit	LiquidDAB+Substrate Chromogen System, K3468 Dako, Hamburg, Deutschland
CD11c Antikörper	Purified anti-human CD11c, Clone HI111, Biolegend, SanDiego, CA, USA
Peroxidase Substrat Kit	Vector SG, Vector laboratories, Burlingame, CA, USA
Statistik- und Analyse-Software	SPSS Software Version 22.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA

2.2 Studiendesign, Patientenkohorte und Bestimmung klinischer Risikofaktoren

Die untersuchte Patientenkohorte umfasste 102 Patienten. Grunderkrankung war jeweils eine Nicht-ischämische Kardiomyopathie. Die Definition der Kardiomyopathien folgt den Klassifikationsvorschlägen der Expertenkommission der American Heart Association (AHA) und der European Society of Cardiology (ESC) [1], [114]. Die Gruppe der inflammatorischen Kardiomyopathien umfasst akute und chronische Myokarditis sowie Borderline-Myokarditis. Darüber hinaus galt folgende Prämisse: Nicht-inflammatorische Kardiomyopathien wurden als dilatative Kardiomyopathien definiert und sekundäre Kardiomyopathien auf dem Boden anderer Krankheiten wurden ausgeschlossen. Bei jedem der Patienten war zwischen August 2007 und November 2011 im Rahmen der weiteren Abklärung eine Endomyokardbiopsie durchgeführt worden. Folgende Parameter lagen bei Einweisung in das Universitätsklinikum Tübingen vor:

- LVEF \leq 60 und/oder
- Dyspnoe (NYHA \geq II) und/oder
- Troponin I (TnI) Werten (>0.03 μ g) und/oder
- erhöhten BNP Werten (>100 ng/l) und/oder
- Arrhythmien inklusive rezidivierender Palpitationen mit Präsynkope, Synkope und nachgewiesenen anhaltenden oder intermittierenden VT
- Neu aufgetretene Herzinsuffizienz mit einer Dauer von 2 Wochen mit Dilatation des linken Ventrikels und hämodynamischer Instabilität
- Neu aufgetretene Herzinsuffizienz mit einer Dauer von bis zu 3 Monaten mit dilatiertem linkem Ventrikel und maligner Arrhythmie, unzureichendes Ansprechen auf das übliche Therapieregime oder vermuteter kardialer Beteiligung mit eingeschränkter globaler oder regionaler systolischer rechts- oder linksventrikulärer Pumpfunktion, Vergrößerung des linken oder rechten Ventrikels, Perikarderguss, Myokardhypertrophie oder auffälligen myokardialen Schallmustern in der transthorakalen Echokardiografie (TTE)

Im Flussdiagramm in Abbildung 1 ist diese Entscheidungsfindung noch einmal dargestellt.

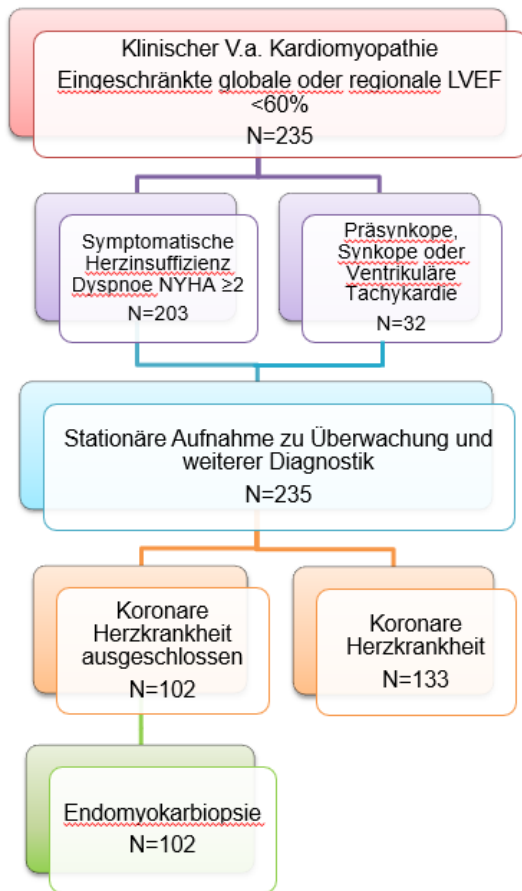


Abbildung 2 - Flussdiagramm zur Illustration der Entscheidungsfindung hinsichtlich der Durchführung einer Endomyokarbiopsie, *N* = Anzahl Patienten, LVEF = Linksventrikuläre Ejektionsfraktion. Abb. modifiziert nach Mueller KAL et al. 2018 [113]

Klinische Risikofaktoren bei Studieneintritt waren Alter, Geschlecht, Body Mass Index (BMI), NYHA-Klasse und aktuelle Medikation. Tn I (>0.03µg/l), BNP (>100ng/l), und C-reaktives Protein (CRP, >0.5mg/dl) wurden als erhöhte Laborwerte eingestuft. Die echokardiographisch erhobenen Parameter umfassten LVEF und LVEDD (iE33, Philips Medical Systems). Bestimmt wurden diese unter Verwendung der modifizierten Simpson Methode, mit Bilderfassung in Vier- und Zweikammerblick. Der LVEDD wurde in allen Patienten mittels 2D geführter M-Mode Echokardiographie quantifiziert. Eine signifikante Koronarsklerose (Stenose > 50% von zwei oder mehr Koronargefäßen oder

Stenose > 50% der LCA oder des proximalen Ramus interventricularis anterior) wurde mittels Koronarangiographie bei allen Patienten ausgeschlossen. Des Weiteren wurden Herzfunktion und Morphologie mittels kontrastmittelgestützter Magnetresonanztomographie (MRT) beurteilt. Verwendet wurde ein 1.5 Tesla (T) Tomograph (Siemens Medical Systems, Germany) mit einer Gradientenstärke von 40 mT/m und einer maximalen Slew-Rate von 200 mT/m/sec. Die Bilder wurden bei liegendem Patienten unter Verwendung von EKG-gegateten Breath-Hold-Sequenzen akquiriert [115]. Zur Bestimmung des Late-Enhancement (LGE) wurden zweidimensionale Gradienten-Echo Sequenzen gefahren (inversion-recovery segmented k-space gradient-echo) mit 0.15 mmol Gadobutrol pro Kilogramm Körpergewicht (Gadovist, Bayer Healthcare, Germany). Zwei erfahrene Untersucher befundeten die zufällig zugeordneten Serien unabhängig voneinander. Die Late Enhancement Serien wurden von den Untersuchern bezüglich An- oder Abwesenheit, Lokalisation und Muster des Late Enhancements beurteilt [116], [117].

Alle Patienten wurden medikamentös entsprechend den aktuellen ESC- und ACC/AHA-Leitlinien behandelt, abhängig von ihrer linksventrikulären Funktion (LVF) und der Ausprägung der Symptome der Herzinsuffizienz. Die Studie entspricht den Prinzipien der Deklaration von Helsinki und wurde vom Ethik-Komitee der Eberhard-Karls-Universität Tübingen (270/2011BO1) genehmigt. Von allen Patienten wurde ein schriftliches Einverständnis eingeholt.

2.3 Studienendpunkte und Follow-up

Alle Patienten stellten sich alle 6 bis 9 Monate in der Ambulanz der Kardiologie (Innere Medizin III - Kardiologie und Kreislauferkrankungen) am Universitätsklinikum Tübingen zu Nachuntersuchungen vor. Im Nachbeobachtungszeitraum schied kein Patient aus der Studie aus. Der primäre Studienendpunkt wurde definiert als Kombination aus Herztransplantation, Tod jeglicher Ursache, Rehospitalisierung aufgrund der Herzinsuffizienz sowie Abnahme der LVEF $\geq 10\%$ im Nachbeobachtungszeitraum von 2 Jahren (mittlere Dauer der Nachbeobachtung: 11.9 Monate). Ob ein Endpunkt eingetreten war,

wurde jeweils von einem unabhängigen Komitee überprüft. Die Ärzte, die über die Notwendigkeit einer Rehospitalisierung entschieden, waren nicht an der Studie beteiligt.

2.4 Endomyokardbiopsie, Immunhistochemie und histopathologische Auswertung

Zunächst wurde ein Bioptom (Biopsy Forceps, Cordis Corporation) über eine 9 French Schleuse venös bis zum rechten Ventrikel geführt. Hier wurden nun 1 bis 3 mm messende Proben aus dem Septum entnommen. Die Proben wurden umgehend für die weitere Auswertung aufbereitet. Sollte eine Färbung durchgeführt werden (Hämatoxylin- und Eosinfärbung (HE), Massons's Trichrome- oder Giemsa-Färbung) oder Immunhistochemie erfolgte die Fixierung in 4% Formaldehyd. Proben für die lichtmikroskopische Beurteilung wurden als 4-µm dicke Schnitte in Paraffin eingebettet und als Vorbereitung zur Untersuchung auf Virus RNA erfolgte die Aufbereitung in RNAlater (Ambion Inc, Foster City, Calif). Hiermit konnte dann die nested-(RT-)PCR durchgeführt werden. Untersucht wurde auf das Vorhandensein von Parvovirus B19 (PVB19), Humanes Herpes Virus 6, 7 und 8 (HHV-6, -7, -8), Enteroviren (EV), Adenoviren, Influenza A and B Viren, Humanes Cytomegalievirus (CMV), und Epstein-Barr Viren (EBV)) [118]. Für die Immunhistochemie wurde eine Avidin-Biotin-Immunoperoxidase Methode entsprechend dem Herstellerprotokoll verwendet (Vectastain Elite ABC Kit, Vector, Burlingame, CA, USA). Zur Differenzierung der Zellen wurden die Folgende monoklonalen Antikörper als Primärantikörper verwendet: CD3 für T-Zellen (Novocastra Laboratories, Newcastle on Tyne, UK), CD68 für Makrophagen (DAKO, Glostrup, Denmark) und HLA-DR-α (DAKO, Hamburg, Germany) um die MHC II Expression auf antigenpräsentierenden Immunzellen zu bestimmen. Um C3aR und C5aR in den Biopsien nachzuweisen, wurden die in Paraffin fixierten Patientenproben mit Roti-Histol entparaffiniert (2x10 Minuten) und mit gestaffelten Ethanol-Waschschritten (100% - 70%) behandelt. Antigen-Demaskierung wurde durch eine Erhitzung der Proben in Zitratpuffer (pH6) über 3x5 Minuten bei 360 Watt in einer Mikrowelle erreicht. Die

endogene Peroxidase Aktivität wurde mit 3% H₂O₂ (15 Minuten) geblockt. Die Objektträger wurden mit „Proteine block serum-free“ der Firma Dako (X0909) präinkubiert und anschließend mit einem C3aR-Antikörper (H-300; sc-20138, SantaCruz, California) oder einem C5aR-Antikörper (Anti-C5R1, ab59390, abcam, Cambridge) inkubiert. Daraufhin wurde eine biotinylierte Sekundärantikörper-Mischung zugegeben („Biotinylated Link Universal“, LSAB+System HRP, Dako, K0690). Rabbit IgG Isotype Ctrl Antikörper wurden als Kontrollen verwandt. Zur Signalverstärkung, wurden die Objektträger für 30 Minuten mit Streptavidin-HRP (LSAB+System HRP, Dako, K0690) inkubiert. Zur Farbreaktion, wurde ein DAB Substrat Kit (LiquidDAB+Substrate Chromogen System, Dako, K3468) verwendet (braune Farbe). Nach dem Waschen in PBS folgte eine zweite Prä-inkubation mit “Proteine block serum-free”. Zum Nachweis von CD11c auf den gleichen Trägern wurde ein Antikörper von Biolegend, San Diego (Purified anti-human CD11c, Clone HI111) hinzugefügt. Ein aufgereinigter Maus-IgG1, κ Isotype Ctrl-Antikörper diente als Kontrolle. Die Objektträger wurden anschließend erneut mit biotinylierter Sekundärantikörpermischung und Streptavidin-HRP inkubiert. Für die Farbreaktion, wurde ein Peroxidase Substrat Kit (Vector SG, Vector laboratories, Burlingame) verwendet (grau-blaue Farbe). Alle Schnitte wurden kurz mit Hämatoxylin gegengefärbt und anschließend mit Deckelmedium überdeckt und bei Zimmertemperatur bis zur Auswertung gelagert. Myokardschnitte, die auf C3aR-Expression und C3aR+CD11+ Co-Expression gefärbt wurden, wurden entsprechend einem semiquantitativen Score bewertet. Dieser reichte von „0“ (keine Expression) bis „8“ (ubiquitär sehr starke Expression) wie in vorangegangenen Arbeiten beschrieben [118]–[123]. C3aR⁻- und C3aR⁺CD11c⁺-Färbungen wurde der Wert 0 zugeordnet, wenn keine gefärbten Zellen vorhanden waren und der Wert 1, wenn 1-8 gefärbte Zellen vorhanden waren. Die Werte für C3aR wurden von zwei unabhängigen Auswertern in jeweils ein bis zwei Schnitten pro Färbung verblindet bestimmt. Das Ausmaß der Fibrose wurde entsprechend einer in vorangegangenen Arbeiten beschriebenen Methodik bestimmt [124]. Entsprechend des Ausmaßes der Fibrose in Prozent der Gesamtfläche des Schnittes wurden die Patienten in drei Gruppen eingeteilt; milde Fibrosierung (Grad1, 0-10%), moderate Fibrosierung

(Grad 2, 11-20%) und schwere Fibrosierung (Grad 3, >20%) [124], [125]. Kardiomyopathien wurden entsprechend etablierter klinischer und histologischer Kriterien klassifiziert. Die inflammatorische Kardiomyopathie wurde entsprechend der Dallas Kriterien definiert als das gleichzeitige Vorliegen von lymphozytären Infiltraten und Myozytennekrose [112], [122], [126]. Die Kriterien für inflammatorische Veränderungen waren erfüllt, wenn immunhistologisch mononukleäre Infiltrate mit mehr als 14 Leukozyten/mm² im Myokard nachzuweisen waren sowie zusätzlich eine vermehrte Expression von HLA II Molekülen entsprechend der WHO/International Society and Federation of Cardiology Task Force zur Definition und Klassifikation von Kardiomyopathien vorlag [112], [120]. EMB ohne Anzeichen inflammatorischer Veränderungen jedoch vorhandenem Myokardschaden und Fibrose wurden als Nicht-inflammatorische Kardiomyopathien klassifiziert; Bei diesen Patienten lag zum großen Teil eine dilatative Kardiomyopathie oder hypertensive Herzerkrankung vor.

2.5 Statistische Auswertung:

Die statistische Auswertung mittels SPSS verantwortete Dr. med. Johannes Patzelt (vgl. hierzu Punkt 8, Erklärung zum Eigenanteil, S. 70)

Kontinuierliche, nicht normalverteilte Variablen werden als Median und Interquartilsabstand (IQR/IQA) angegeben und mittels des Mann-Whitney U Test verglichen. Kategorische Daten werden als Verhältnisse dargestellt und mit dem Chi-Square-Test ausgewertet. Beurteilt wurden Risikofaktoren inklusive der NYHA Klasse, LVEF, LVEDD, LGE, BNP, Tn I, CRP, C3aR⁺, C5aR⁺, C3aR⁺CD11c⁺ und C5aR⁺CD11c⁺. Kontinuierliche Variablen wurden an etablierten Cut-Off Werten dichotomisiert. Die Korrelation von C3aR⁺, C5aR⁺, C3aR⁺CD11c⁺, und C5aR⁺CD11c⁺ mit Tn I wurde mit dem Korrelationskoeffizienten nach Pearson überprüft. Die Cox-Regression (proportional Hazards) wurde zur multivariablen Analyse zur Beurteilung der Beziehung der Risikofaktoren zum primären Endpunkt verwendet. Die Überlebenszeitkurven wurden mittels des Kaplan-Meier Verfahrens errechnet

und auf Basis des Log-Rank-Tests verglichen. Das Risiko für das Auftreten eines Endpunktes wird als Hazard Ratio (HR) mit einem 95% Konfidenzintervall (CI) dargestellt. Die Überlebenszeitanalyse begann zum Zeitpunkt der EMB. Werte werden als Durchschnitt +/- Standardabweichung oder Standard error of the mean angegeben. Ergebnisse wurden als statistisch signifikant gewertet, wenn der zweiseitige P-Wert ≤ 0.05 war. Zur statistischen Auswertung wurde SPSS verwendet (Software version 22.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

3. Ergebnisse

Die im Ergebnisteil vorgestellten Resultate wurden bereits in einer Publikation veröffentlicht und entsprechen inhaltlich weitgehend der dortigen Darstellung. (vgl. Punkt 8, Erklärung zum Eigenanteil, S. 70 sowie Punkt 6, Veröffentlichungen, S. 69)

3.1 Das Ausmaß der durch Myokardbiopsie nachgewiesenen Fibrose und Entzündung unterscheidet sich zwischen Patienten mit inflammatorischer und nicht-inflammatorischer Kardiomyopathie.

Ausgangswerte und Zusammensetzung der Patientenkohorte sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 2 - Ausgangswerte der Patientenkohorte

Die Werte sind als Anzahl der Patienten, deren prozentualer Anteil an der gesamten Studienpopulation (%), Median oder Interquartilsabstand (IQR) angegeben. Signifikante P-Werte sind fett gedruckt. ACE-Hemmer – Angiotensin Converting Enzyme Hemmer, ARB – Angiotensin Receptor Blocker, BMI – Body Mass Index, BNP – b-type Natriuretisches Peptid, CBV – Coxsackie B Virus, CRP – C-reaktives Protein, EBV – Epstein-Barr Virus, HHV6 – Humanes Herpesvirus-6, ICM – Inflammatorische Kardiomyopathie, LGE – Late Gadolinium Enhancement, LVEDD – linksventrikulärer enddiastolischer Diameter, LVEF – linksventrikuläre Ejektionsfraktion, MRA – Mineralocorticoid Receptor Antagonist, Non-ICM – nicht-inflammatorische Kardiomyopathie, NYHA – New York Heart Association, PVB19 – Parvovirus B19, SD – standard deviation/Standardabweichung, TnI - Troponin I. Tabelle modifiziert aus Mueller KAL et al. 2018 [113]. Originalversion erstellt von Dr. med. Karin Müller. Zugrunde liegende Datenbasis erarbeitet von Philipp Alexander Maier, Ergänzungen durch Dr. med. Johannes Patzelt.

Parameter	Alle Patienten, N=102	ICM, N=54 (52.9%)	non ICM, N=48 (47.1%)	P
-----------	--------------------------	----------------------	--------------------------	---

Klinische Charakteristika

Alter in Jahren	54 (20-84)	50.5 (21-79)	68.5 (20-84)	<0.001
Männer	74 (72.5)	40 (74.1)	34 (70.8)	0.825
BMI (kg/m ²)	26.1 (19.9-52.0)	26.5 (19.9-52)	25 (19.9-31.2)	0.603
NYHA Klasse ≥II	88 (86.3)	42 (77.8)	46 (95.8)	0.009
<i>Bestehende kardiologische Medikation bei Studieneintritt</i>				
Beta-Blocker	90 (88.2)	47 (87.0)	43 (89.6)	0.765
ACE-Hemmer	69 (67.6)	34 (63.0)	35 (72.9)	0.299
ARB	23 (22.5)	11 (20.4)	12 (25.0)	0.639
Diuretika	63 (61.8)	26 (48.1)	37 (77.1)	0.004
MRA	54 (52.9)	23 (42.6)	31 (64.6)	0.030
<i>Funktionsparameter des linken Ventrikels</i>				
LVEF (%)	40 (20-60)	50 (25-60)	35 (20-60)	0.001
LVEF <45%	52 (51)	20 (37)	32 (66.7)	0.003
LVEDD (mm)	51 (34-78)	51 (34-78)	52 (38-74)	0.190
LVEDD> 55mm	40 (39.2)	19 (35.2)	21 (43.8)	0.420
Positives LGE	46 (45.1%)	26 (48.1)	20 (41.7)	0.687
<i>Biomarker</i>				
BNP (ng/l)	384 (18-23211)	278 (24-23211)	544(18-11955)	0.143
TnI (µg/l)	0.05 (0-5.6)	0.07 (0-5.6)	0.05 (0-0.34)	0.184
TnI >0.03	60 (69.0)	33 (71.7)	27 (65.9)	0.645
CRP (mg/dl)	0.53 (0-24)	0.62 (0-24)	0.32 (0-4.6)	0.080
CRP >0.5	42 (41.2)	26 (48.1)	16 (33.3)	0.160
<i>Virus-positive Endomyokardbiopsien</i>				
Gesamt	26 (25.5)	17 (31.5)	9 (18.8)	0.175
EBV	8 (7.8)	5 (9.3)	3 (6.3)	0.719
PVB19	10 (9.8)	8 (14.8)	2 (4.2)	0.098
HHV 6	9 (8.8)	5 (9.3)	4 (8.3)	1.000
Influenza A/B	2 (2.0)	1 (1.9)	1 (2.1)	1.000
CBV3	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1.000
<i>Myokardfibrose</i>				
Mild	29 (28.4%)	21 (38.9)	8 (16.7)	0.024

Moderat	39 (38.2)	20 (37.0)	19 (39.6)	0.675
Schwer	24 (23.5)	9 (16.7)	15 (31.3)	0.046
<i>Nachweis immunhistologischer Marker im Myokard</i>				
MHC II	64 (62.7)	50 (92.6)	14 (29.2)	<0.001
CD68	62 (60.8)	50 (92.6)	12 (25.0)	<0.001
CD3	43 (42.2)	41 (75.9)	2 (4.2)	<0.001

Die Klassifikation der zugrunde liegenden Kardiomyopathien ist in Tabelle 2 aufgeführt

Tabelle 2. Klassifikation der Kardiomyopathien entsprechend klinischer und histopathologischer Kriterien

Die Werte sind als Prozentsatz n der gesamten Studienpopulation angegeben. ARVC/D – Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie/Dysplasie, CM - Kardiomyopathie, DCM - Dilatative Kardiomyopathie, HNCM – Hypertrophe nicht-obstruktive Kardiomyopathie, HOCM – hypertrophe obstruktive Kardiomyopathie. Tabelle modifiziert aus Mueller KAL et al. 2018 [113] Originalversion erstellt von Dr. med. Karin Müller. Zugrunde liegende Datenbasis erarbeitet von Philipp Alexander Maier.

Primäre Kardiomyopathien	Patienten, n (%)
<i>Nicht-entzündliche Kardiomyopathie</i>	48 (47.1)
DCM	34 (70.8)
HNCM/HOCM	14 (29.2)
Restriktive Kardiomyopathie	0 (0)
ARVC/D	0 (0)
<i>Entzündliche Kardiomyopathie</i>	54 (52.9)
Chronische Myokarditis	48 (88.9)
Akute Myokarditis	6 (11.1)

Das Durchschnittsalter der Studienpopulation lag bei 54 Jahren (Interquartile Range (IQR) 20-84 Jahre). 74 (72.5%) der Patienten waren Männer. Bei 86.3% der Patienten lag eine symptomatische Herzinsuffizienz vor, ein NYHA Stadium ≥ 2 mit einer mittleren LVEF von 40% (20-60). Die Entscheidung zu einer

Endomyokardbiopsie wurde auf Basis der Angaben im Flussdiagramm in Abbildung 1 getroffen. Kardiale und inflammatorische Biomarker waren erhöht. Beispielsweise lag die durchschnittliche Serumkonzentration des BNP bei 384 (IQR 18-23211) ng/l, TnI lag bei 0.05 (IQR 0-5.6) µg/l. Bei 60 (69.0%) Patienten lag der Wert von TnI über 0.03µg/l. Der CRP Wert lag durchschnittlich bei 0.53 (0-24). Bei 54 (52.9%) Patienten wurde eine inflammatorische Kardiomyopathie diagnostiziert, die übrigen 48 (47.1%) hatten eine nicht-inflammatorische Kardiomyopathie. Patienten mit einer inflammatorischen Kardiomyopathie waren deutlich jünger als Patienten mit einer nicht-inflammatorischen Kardiomyopathie ($p < 0.001$), hatten eine niedrigere NYHA-Klasse ($p = 0.009$), eine bessere LVEF und wurden seltener mit Diuretika ($p = 0.004$) und Mineralcorticoid-Rezeptorantagonisten (MRA, $p = 0.030$) behandelt.

Im Herz MRT war bei 46 von 102 Patienten (45,1%) ein Late-Gadolinium-Enhancement nachweisbar, allerdings gab es keinen Unterschied zwischen inflammatorischer und nicht-inflammatorischer Kardiomyopathie ($p = 0.687$). Eine milde Myokardfibrose war in Patienten mit inflammatorischer Kardiomyopathie signifikant häufiger nachweisbar. (38.9% in inflammatorischer Kardiomyopathie vs. 16.7 % in nicht-inflammatorischer Kardiomyopathie, $p = 0,024$) während eine moderate (37% in inflammatorischer Kardiomyopathie vs. 39.6% in nicht-inflammatorischer Kardiomyopathie, $p = 0.675$) und schwere (16.7% in inflammatorischer Kardiomyopathie vs. 31.3% in nicht-inflammatorischer Kardiomyopathie, $p = 0.046$) Fibrose unter den Patienten mit nicht-inflammatorischer Kardiomyopathie häufiger war, wie Abbildung 2A zeigt.

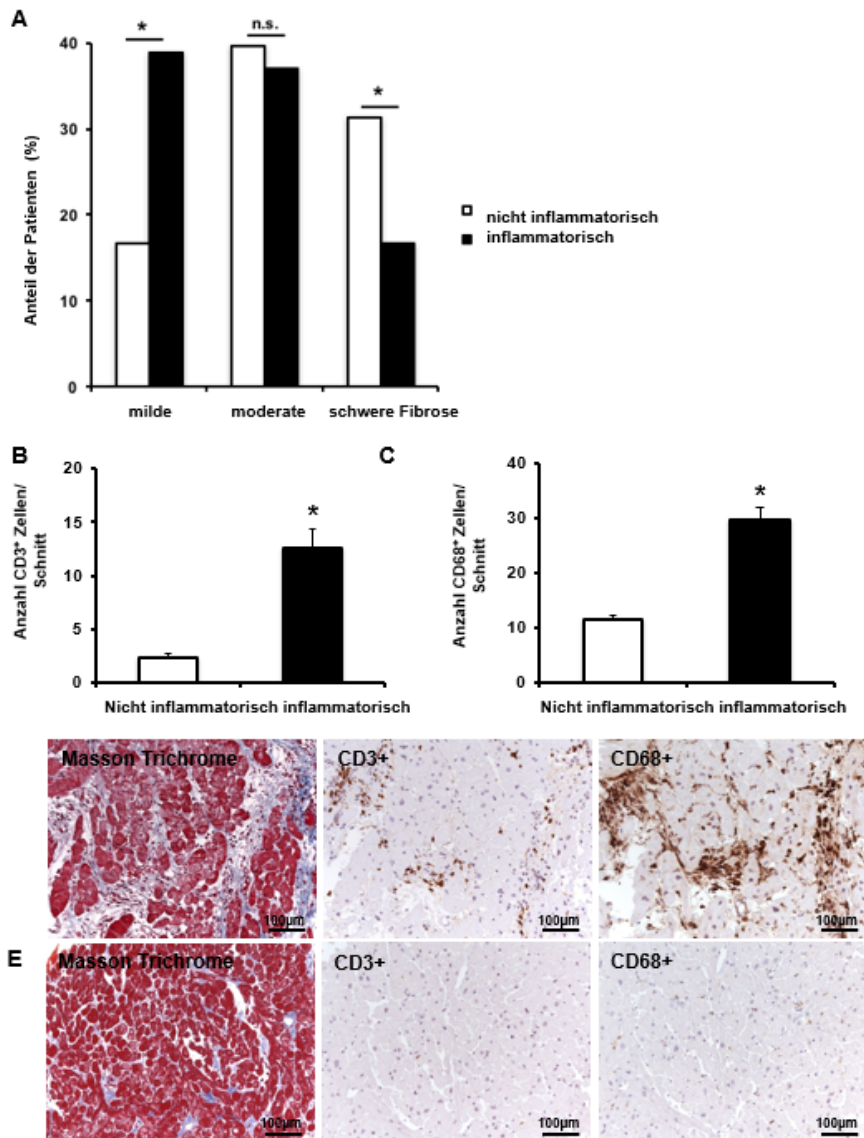


Abbildung 2: Unterschiedliche Ausprägung des Fibrosegrades sowie der Anzahl CD3+ bzw. CD68+ Zellen in Patienten mit inflammatorischer oder nicht-inflammatorischer Kardiomyopathie

Abbildung modifiziert aus Mueller KAL et al. 2018 [113] Originalversion erstellt von Dr. med. Karin Müller. Zugrunde liegende Datenbasis erarbeitet von Philipp Alexander Maier und Dr. med. Karin Müller.

(A) Prozentualer Anteil der Patienten mit unterschiedlichem myokardialem Fibrosegrad* unterteilt in Patienten mit inflammatorischer und nicht inflammatorischer Kardiomyopathie, * = $p \leq 0,05$, n.s. = nicht signifikant

*abhängig von der Größe des fibrosierten Areals des jeweiligen Myokardschnittes; milde Fibrosierung (Grad1, 0-10%), moderate Fibrosierung (Grad 2, 11-20%) und schwere Fibrosierung (Grad 3, >20%)

*(B) (C) Anzahl CD3⁺ oder CD68⁺ Zellen je immunhistochemisch aufgearbeitetem Myokardschnitt in Patienten mit inflammatorischer oder nicht inflammatorischer Kardiomyopathie, * = $p \leq 0,05$, n.s. = nicht signifikant*

(D) und (E) Beispielaufnahmen der Myokardschnitte in Patienten mit inflammatorischer und nicht-inflammatorischer Kardiomyopathie. In den Aufnahmen erscheinen Zellkerne in blau und CD3 bzw. CD68 in braun. Maßstabsbalken = 100 μ m.

Im Rahmen der immunhistochemischen Untersuchungen werteten wir die Anzahl der infiltrierenden inflammatorischen CD3-positiven T-Zellen und CD68-positiven Zellen in den Kohorten der inflammatorischen und nicht-inflammatorischen Kardiomyopathien aus. Die Zahl CD3-positiver und CD68-positiver Zellen unterschied sich in beiden Gruppen signifikant, wie die Abbildungen 2B und C zeigen. Die Zahl CD3⁺ T-Zellen war in Patienten mit inflammatorischer Kardiomyopathie signifikant erhöht, verglichen mit Patienten mit nicht-inflammatorischer Kardiomyopathie. (12.6 ± 1.84 in inflammatorischer Kardiomyopathie vs. 2.3 ± 0.43 in nicht-inflammatorischer Kardiomyopathie, $p < 0.001$, Abbildung 2B).

Die Zahl CD68⁺ Zellen/ Makrophagen war in Patienten mit inflammatorischer Kardiomyopathie im Vergleich zu Patienten mit nicht-inflammatorischer Kardiomyopathie deutlich erhöht (29.7 ± 2.23 in inflammatorischer Kardiomyopathie vs. 11.5 ± 0.65 in nicht inflammatorischer Kardiomyopathie, $p < 0.001$, Abbildung 2C). Repräsentative Myokard-Schnitte verdeutlichen die histologische und immunhistochemische Zusammensetzung des Myokards bei Vorliegen einer inflammatorischen Kardiomyopathie (Abbildung 2D) und nicht-inflammatorischer Kardiomyopathie (Abbildung 2E)

3.2 Die Expression des Anaphylatoxinrezeptors C3aR and Co-Expression von C3aR und CD11c ist in Patienten mit inflammatorischer Kardiomyopathie erhöht.

Der Färbung von C3aR⁺ and C3aR⁺CD11c⁺ wurde der Wert 0 zugeordnet, wenn keine gefärbten Zellen nachweisbar waren bzw. der Wert 1, wenn eine bis acht

gefärbte Zellen abgrenzbar waren. Bei 42/102 (41.2%) Patienten war eine Expression von C3aR nachweisbar, bei 28/102 (27.5%) eine Expression von C5aR. In 41/102 Patienten (40.2%) und 17/102 Patienten (16.7%) war eine Expression von C3aR und C5aR auf CD11c⁺ Zellen im Herzen nachweisbar.

Die Anzahl von C3aR-positiven Zellen und C3aR-positiven CD11c⁺ Zellen war in Patienten mit inflammatorischer Kardiomyopathie im Vergleich zu Patienten mit nicht-inflammatorischer Kardiomyopathie deutlich erhöht. (C3aR positive Zellen: 1.75 ± 0.31 in inflammatorischer Kardiomyopathie vs 0.94 ± 0.26 in nicht-inflammatorischer Kardiomyopathie, $p=0.049$, Abbildung 3A; C3aR positive CD11c⁺ Zellen: 1.25 ± 0.24 in inflammatorischer Kardiomyopathie vs 0.64 ± 0.18 in nicht-inflammatorischer Kardiomyopathie, $p=0.046$, Abbildung 3B).

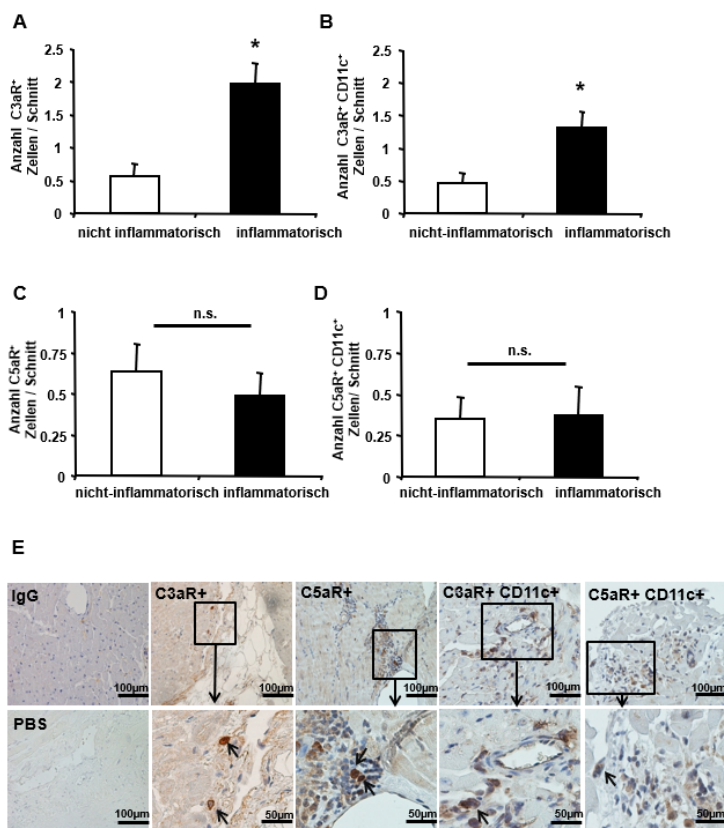


Abbildung 3 Die Expression des Anaphylatoxinrezeptors C3aR und Co-Expression von C3aR und CD11c ist in Patienten mit inflammatorischer Kardiomyopathie erhöht. *Abb. modifiziert nach Mueller KAL et al. 2018 [113] Originalversion erstellt von Dr. med. Karin Müller. Zugrunde liegende Datenbasis erarbeitet von Philipp Alexander Maier.*

(A) (B) Anzahl C3aR⁺ Zellen bzw. C3aR⁺CD11c⁺ Zellen pro Myokardschnitt bei vorliegender inflammatorischer oder nicht-inflammatorischer Kardiomyopathie. * = signifikant ($p \leq 0,05$)

(C) (D) Anzahl C3aR⁺ Zellen bzw. C3aR⁺CD11c⁺ Zellen pro Myokardschnitt bei vorliegender inflammatorischer oder nicht-inflammatorischer Kardiomyopathie, n.s. = nicht signifikant

(E) Beispielaufnahmen der Myokardschnitte in Patienten mit inflammatorischer und nicht-inflammatorischer Kardiomyopathie. In den Aufnahmen erscheinen C3aR und C5aR in braun (DAB), CD11c wurde grau-blau gefärbt

Es bestand kein Unterschied hinsichtlich der Expression von C5aR (C5aR positive Zellen: 0.48 ± 0.13 in inflammatorischer Kardiomyopathie vs. 0.62 ± 0.17 in nicht-inflammatorischer Kardiomyopathie, $p=0.513$, Abbildung 3C; C5aR positive CD11c⁺ Zellen: 0.37 ± 0.17 in inflammatorischer Kardiomyopathie vs. 0.34 ± 0.13 in nicht-inflammatorischer Kardiomyopathie, $p=0.906$, Abbildung 3D.

Repräsentative Schnitte zur Illustrierung der positiven Expression von C3aR, C5aR und der Ko-Expression dieser Anaphylatoxinrezeptoren mit CD11c⁺ Zellen im Myokard sind in Abbildung 3E dargestellt.

3.3 Die Expression von C3aR und Ko-Expression auf CD11c⁺ Zellen in Myokardbiopsien ist in Patienten mit Expression etablierter Entzündungsmarker erhöht.

Bei bis zu 62,7% der Patienten bei denen eine Endomyokardbiopsie durchgeführt wurde, war immunhistochemisch mindestens ein etablierter Entzündungs-Marker nachweisbar und darüber hinaus konnte entweder MHCII (n=64, 62.7%), CD68 (n=62, 60.8%), oder CD3 (n=43, 42.2%) nachgewiesen werden, dargestellt in Tabelle 1.

Patienten mit inflammatorischer Kardiomyopathie wiesen eine signifikant höhere Expression von MHC II ($p<0.001$), CD68 ($p<0.001$), und CD3 ($p<0.001$) auf verglichen mit Patienten mit nicht-inflammatorischer Kardiomyopathie. (Abbildung 4).

In 30 von 64 (46.9%) der Proben der MHC II positiven Patienten war C3aR nachweisbar (Score 1), ein in der Tendenz jedoch nicht signifikant höherer Wert

im Vergleich zu 11 von 38 (28.9%) der MHC II negativen Patienten, $p=0.076$ (Abbildung 4A).

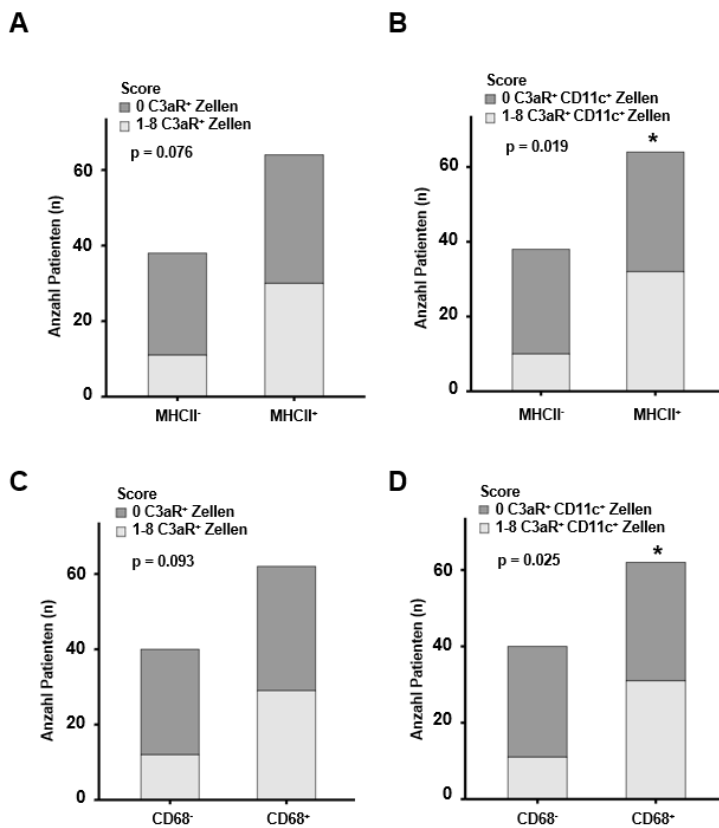


Abbildung 4 vermehrte C3aR Expression und Ko-Expression auf CD11c⁺ Zellen in Myokardbiopsien in Patienten mit Expression von MHC II und CD 68 *Abbildung aus Mueller KAL et al. 2018 [113] Originalversion erstellt von Dr. med. Karin Müller. Zugrunde liegende Datenbasis erarbeitet von Philipp Alexander Maier und Dr. med. Karin Müller.*

(A) (B) Anzahl der Patienten (n) mit und ohne MHCII Nachweis und jeweiliger C3aR⁺ oder C3aR⁺CD11c⁺ Score

(C) (D) Anzahl der Patienten (n) mit und ohne CD68 Nachweis und jeweiliger C3aR⁺ oder C3aR⁺CD11c⁺ Score

* = signifikant ($p \leq 0,05$)

Des Weiteren zeigten 32 von 64 (50.0%) Patienten mit positiver MHC II Expression auch eine positive C3aR Ko-Expression auf CD11c⁺ Zellen (Score 1), ein im Vergleich zu 10 von 38 (26.3%) der MHCII negativen Patienten ein signifikant höherer Wert, $p=0.019$ (Abbildung 4B).

Ähnliche Werte ergaben sich in Patienten mit positiver CD68 Expression. 29 von 62 (46.8%) Patienten mit positiver CD68 Expression wiesen auch eine positive C3aR Expression (Score 1) auf welche tendenziell ausgeprägter war als bei CD68 negativen Patienten (12/40 30.0%, $p=0.093$, Abbildung 4C).

Des Weiteren zeigten 31 von 62 (50.0%) der Patienten mit positiver CD 68 Expression eine C3aR Ko-Expression auf CD11c⁺ Zellen (Score 1), welche im Vergleich zu 11 von 40 (27.5%) der CD68 negativen Patienten signifikant höher war, $p=0.025$, Abbildung 4D).

In der Endomyokardbiopsie waren 26 von 102 (25.5%) Patienten Virus-positiv (Tabelle 1). Bei 10 von 26 (38.5%) konnte Parvovirus B19 (PVB19) nachgewiesen werden, bei 8 von 36 Patienten (20.5%) das Epstein-Barr Virus (EBV), bei 9/26 Patienten (25.0%) das humane Herpesvirus-6 (HHV-6) und bei 2/26 (5.6%) Influenza A/B (Tabelle 1).

Interessanterweise war die C3aR⁺ Expression und Ko-Expression auf CD11c⁺ Zellen im Fall des Virusgenomnachweises in der Endomyokardbiopsie ausgeprägter. 7 von 9 (77.8%) HHV6 positive Patienten wiesen eine C3aR Expression oder Ko-Expression von C3aR auf CD11c⁺ Zellen auf ($p=0.017$ und $p=0.020$ vs. HHV6 negative Patienten, Abbildung 5A and B), während es keinen signifikanten Unterschied bei EBV und PVB 19 positiven Patienten gab (Abbildung 5C-F).

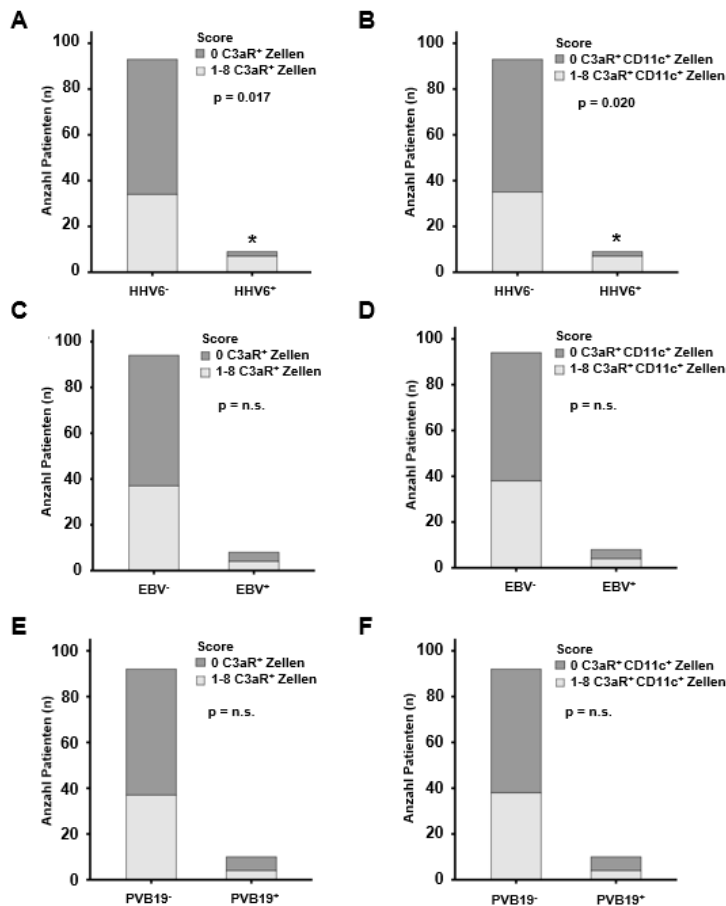


Abbildung 5 vermehrte C3aR Expression und Ko-Expression auf CD11c⁺ Zellen bei Nachweis von HHV6, jedoch nicht bei Nachweis von EBV oder PVB19 *Tabelle aus Mueller KAL et al. 2018 [113] Originalversion erstellt von Dr. med. Karin Müller. Zugrunde liegende Datenbasis erarbeitet von Philipp Alexander Maier und Dr. med. Karin Müller.*

(A) – (F) Anzahl der Patienten (n) mit und ohne Virus-Nachweis und jeweiliger C3aR⁺ oder C3aR⁺CD11c⁺ Score. * = signifikant ($p \leq 0,05$), n.s. = nicht signifikant. HHV6 = Humanes Herpesvirus 6, EBV = Epstein-Barr-Virus, PVB 19 = Parvovirus B 19

3.4 Die Expression von C3aR und Ko-Expression von C3aR auf CD 11c⁺ Zellen sind Prognosefaktoren bei Patienten mit nicht-ischämischer Herzinsuffizienz.

Während einer durchschnittlichen Follow-Up Periode von 11.9 Monaten erreichten 36 (35.2%) Patienten den primären Endpunkt. Tabelle 3 zeigt das Outcome während der Nachbeobachtung aufgeschlüsselt nach der zugrunde liegenden Kardiomyopathie.

Tabelle 3. Klinisches Outcome während des Follow-up. *Tabelle modifiziert aus Mueller KAL et al. 2018 [113] Originalversion erstellt von Dr. med. Karin Müller. Zugrunde liegende Datenbasis erarbeitet von Philipp Alexander Maier und Dr. med. Karin Müller.*

Outcome	Alle Patienten (n=102)	ICM (n=54, 52.9%)	Non ICM (n=48, 47.1%)	P
Kombinierter Endpunkt*	36 (35.3)	15 (27.8)	21 (43.8)	0.102
Tod jeglicher Ursache	7 (6.9)	5 (9.3)	2 (4.2)	0.442
Herzinsuffizienz-assozierte Rehospitalisierung	6 (5.9)	4 (7.4)	2 (4.2)	0.681
Verschlechterung der LVEF	23 (22.5)	6 (11.1)	17 (35.4)	0.004

Die Werte sind in absoluten Zahlen angegeben, in Klammern ist jeweils der prozentuale Anteil aufgeführt. Signifikante P-Werte sind fett gedruckt.

* Kombination aus Tod jeglicher Ursache, Rehospitalisierung aufgrund von Herzinsuffizienz und Verschlechterung der linksventrikulären Funktion von $\leq 10\%$. ICM – Inflammatorische Kardiomyopathie, non-ICM – Nicht-inflammatorische Kardiomyopathie

Von diesen Patienten waren 11 von 36 (30.6%) C3aR positiv (Score 1, $p=0.205$) und 9 von 36 zeigten eine C3aR Expression auf CD11c⁺ Zellen (Score 1, $p=0.02$). Wir überprüften ob das Vorliegen von C3aR⁺ oder C3aR⁺CD11c⁺ Zellen mit der LVEF korreliert. Wie in Abbildung 6 und 7 dargestellt bestand keine Korrelation von C3aR⁺ oder C3aR⁺CD11c⁺ Zellen mit der LVEF oder dem linksventrikulären enddiastolischen Diameter (LVEDD). Das Ausmaß der Myokardfibrose in Endomyokardbiopsien und Vorliegen von LGE im Herz-MRT korrelierte ebenfalls nicht mit der Expression von C3aR and C3aRCD11c.

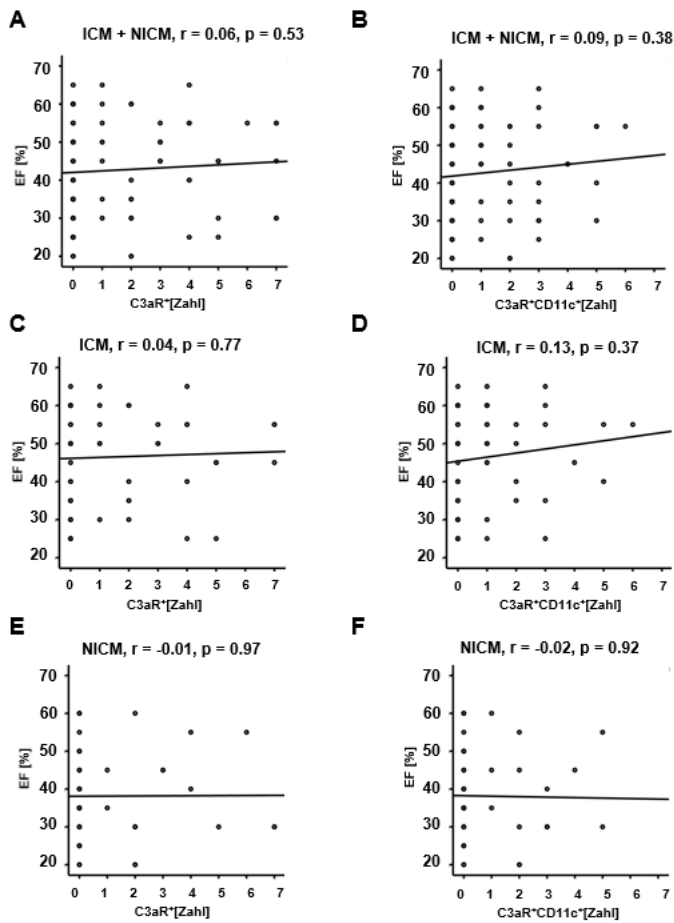


Abbildung 6 keine Korrelation der LVEF mit vermehrter C3aR Expression und Ko-Expression auf CD11c⁺ Zellen. *Abbildung aus Mueller KAL et al. 2018 [113] Originalversion erstellt von Dr. med. Karin Müller. Zugrunde liegende Datenbasis erarbeitet von Dr. med. Karin Müller und Philipp Alexander Maier.*

(A) – (F) Korrelation der Zellzahl (C3aR⁺ / C3aR⁺CD11c⁺) mit der Ejektionsfraktion

EF = Ejektionsfraktion, ICM = Ischämische Kardiomyopathie, NICM = nicht ischämische Kardiomyopathie. r = Korrelationskoeffizient, p = Signifikanzniveau

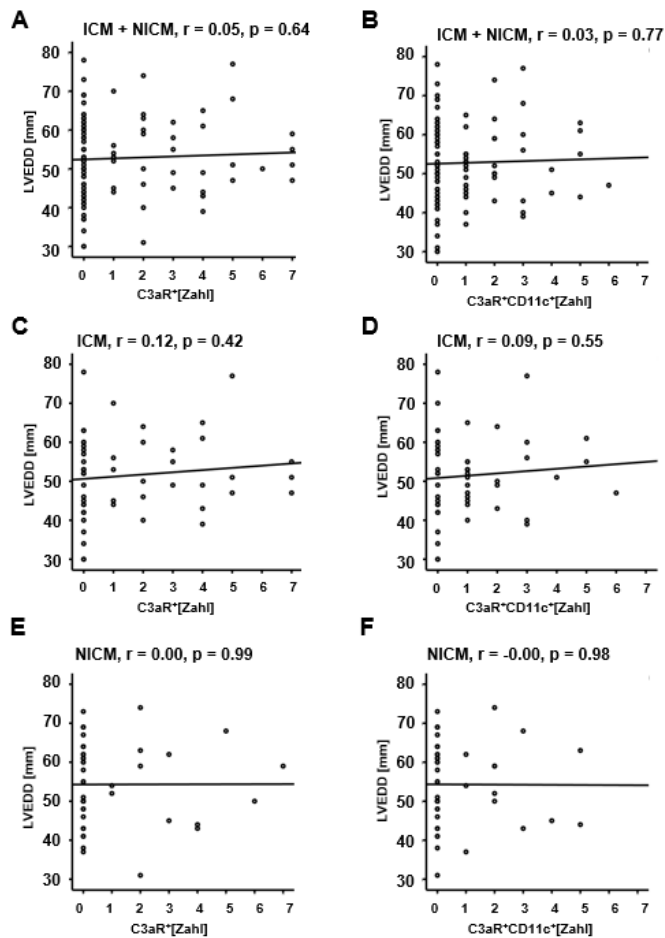


Abbildung 7 keine Korrelation des LVEDD mit vermehrter C3aR Expression und Ko-Expression auf CD11c⁺ Zellen. *Abbildung aus Mueller KAL et al. 2018 [113] Originalversion erstellt von Dr. med. Karin Müller. Zugrunde liegende Datenbasis erarbeitet Dr. med. Karin Müller*

(A) – (F) Korrelation der Zellzahl (C3aR⁺ / C3aR⁺CD11c⁺) mit dem LVEDD

EF = Ejektionsfraktion, LVEDD = linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser, ICM = Ischämische Kardiomyopathie, NICM = nicht ischämische Kardiomyopathie. r = Korrelationskoeffizient, p = Signifikanzniveau

Die Kaplan Meier Kurve der gesamten Patientenkohorte ($n=102$, inflammatorische und nicht-inflammatorische Kardiomyopathie) zeigt, dass Patienten ohne C3aR Nachweis (Score 0) den primären Endpunkt öfter erreichen als Patienten mit positiver C3aR Expression (Score 1) (Log Rank 5.963, $p=0.015$, Abbildung 8A).

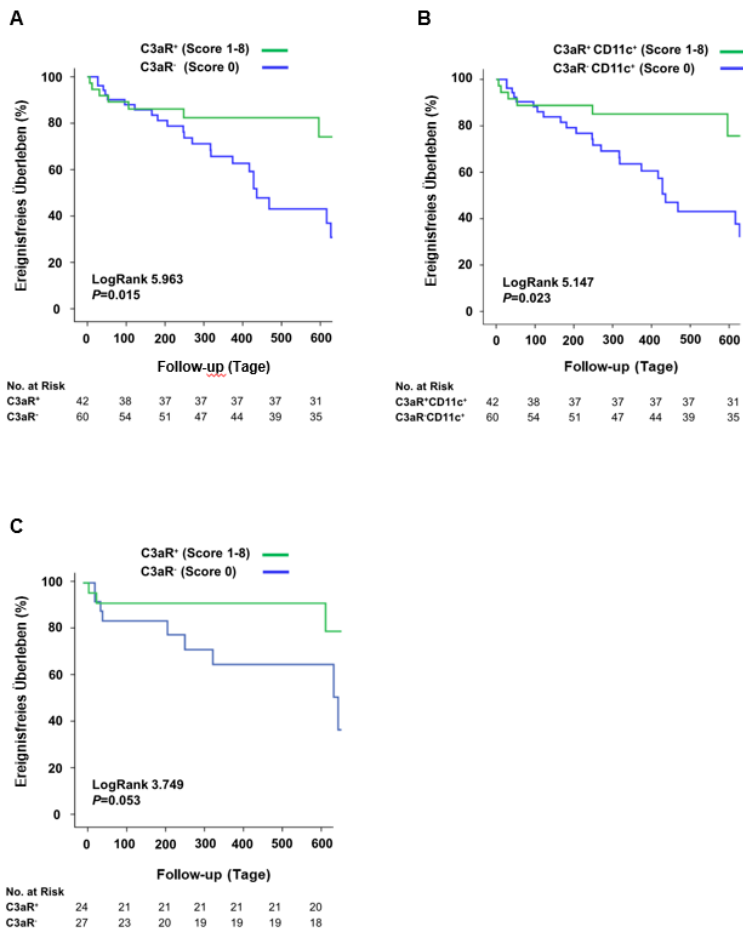


Abbildung 8 Patienten ohne Nachweis einer C3aR Expression erreichen den primären Endpunkt öfter. *Abb. aus Mueller KAL et al. 2018 [113] Originalversion erstellt von Dr. med. Karin Müller. Zugrunde liegende Datenbasis erarbeitet von Dr. med. Karin Müller.*

(A) – (C) Prozentsatz der Patienten mit ereignisfreiem Überleben über einen Nachbeobachtungszeitraum von 600 Tagen bei vorhandener oder nicht nachweisbarer C3aR-Expression. Signifikant: $p \leq 0,05$

Des Weiteren erreichen Patienten ohne Nachweis von C3aR auf CD11c⁺ Zellen den primären Endpunkt öfter als Patienten mit C3aR Expression auf CD11c⁺ Zellen (Log Rank 5.147, $p=0.023$, Abbildung 8B). In der Untergruppe der Patienten mit inflammatorischer Kardiomyopathie ($n=54$) zeigt die Kaplan Meier Kurve, dass C3aR-negative Patienten (Score 0) den primären Endpunkt öfter erreichen als C3aR-positive Patienten (Score 1) (Log Rank 3,749, $p=0.053$, Abbildung 8C). Der primäre Endpunkt wurde definiert als eine Kombination aus Tod jeglicher Ursache, Herztransplantation, Rehospitalisierung in Verbindung mit Herzinsuffizienz sowie die Verschlechterung der LVEF. In der multivariaten Cox-

Regressionsanalyse bezüglich des primären Endpunktes, war unter allen überprüften Risikofaktoren (Expression von C3aR; Alter; Geschlecht; LVEF; CRP; NYHA \geq 2) die fehlende C3aR Expression ein aussagekräftiger Indikator für das Auftreten eines primären Endpunktes. (Hazard Ratio [HR] 0.46; 95% Konfidenzintervall [CI] 0.26–0.82, $p=0.009$, Tabelle 4). Des Weiteren korrelierte eine fehlende C3aR Ko-Expression auf CD11c⁺ Zellen mit dem Auftreten des primären Endpunktes (HR 0.36; 95% CI 0.16–0.80, $p=0.012$).

Tabelle 4. Eine fehlende C3aR Expression auf CD11c⁺ Zellen ist ein unabhängiger Vorhersagewert des primären Studienendpunktes *Tabelle modifiziert aus Mueller KAL et al. 2018 [113] Originalversion erstellt von Dr. med. Karin Müller. Zugrunde liegende Datenbasis erarbeitet von Philipp Alexander Maier und Dr. med. Karin Müller. Die Werte sind in absteigender Reihenfolge der Hazard Ratio aufgeführt. Signifikante P-Werte sind fett gedruckt. KI – Konfidenzintervall, CRP – C-reaktives Protein, HR - Hazard Ratio, LVEF – linksventrikuläre Ejektionsfraktion, NYHA – New York Heart Association*

Variable	Cox Regressionsanalyse	
	HR (95% KI)	P
Geschlecht	2.30 (0.92 – 5.76)	0.075
Alter	1.04 (1.0 – 1.1)	0.006
CRP (mg/dl)	1.03 (1.0 – 1.05)	0.019
LVEF (%)	0.97 (0.94 – 1.0)	0.052
NYHA Klasse \geq II	0.68 (0.24 – 1.94)	0.47
C3aR⁻	0.46 (0.26 – 0.82)	0.009

4. Diskussion

Die Zahl der Herzinsuffizienzpatienten und der damit verbundenen Krankenhausaufenthalte nimmt in Deutschland und weltweit seit Jahren stark zu [127]. Ein Fokus der klinischen Forschung liegt auf der Etablierung immer neuer Biomarker zur Verbesserung der Risikostratifizierung und entsprechenden Auswahl eines optimalen Therapieregimes [128]. Inflammatorische Kardiomyopathien haben in vielen Fällen eine chronische Herzinsuffizienz zur Folge. Zum jetzigen Zeitpunkt existiert jedoch noch keine verlässliche Methodik oder Marker um eine anhaltende oder zukünftig progrediente Herzinsuffizienz verlässlich zu prognostizieren. In der vorgelegten Arbeit wird ein möglicher neuer Parameter vorgestellt welcher die histopathologische Diagnostik bei Patienten mit inflammatorischer Kardiomyopathie ergänzen könnte und zur besseren Abschätzung der Prognose beiträgt. Ganz grundsätzlich könnten die Ergebnisse neue Ansätze der Grundlagenforschung bezüglich Remodelling Prozessen am Herzmuskel sowie Aktivierung des Immunsystems aufzeigen.

Die zentralen Ergebnisse [113]:

I) Die Expression des Anaphylatoxinrezeptors C3aR oder Ko-Expression von C3aR auf CD11c⁺ Zellen ist insbesondere in Patienten mit inflammatorischer Kardiomyopathie hochreguliert.

II) Die Expression von C3aR ist in Patienten bei gleichzeitigem Nachweis anderer (Myokard-)Entzündungsmarker vermehrt.

III) Mit einer fehlenden Expression von C3aR und Ko-Expression von C3aR auf CD11c⁺ Zellen geht ein häufigerer Eintritt des kombinierten Endpunktes einher (Tod jeglicher Ursache, Herztransplantation, Rehospitalisierung aufgrund einer Herzinsuffizienz und Verschlechterung der linksventrikulären Ejektionsfraktion).

Der Einfluss der Expression von C3aR und C5aR in Patienten mit nicht-ischämischer Kardiomyopathie ist bis dato noch nicht untersucht worden. Die Komplementrezeptoren C3aR und C5aR spielen wie einleitend ausgeführt eine wichtige Rolle bei Entzündungsprozessen im Gewebe [129]. Entsprechend ist es naheliegend, dass in der untersuchten Patientenkohorte bei Vorliegen einer

inflammatorischen Kardiomyopathie vermehrt C3aR exprimiert wird. Interessant ist vielmehr die Tatsache, dass nicht auch gleichzeitig eine signifikant vermehrte Expression von C5aR nachzuweisen war. Hypothetisch könnte hier eine Rolle spielen, dass die Hauptwirkung von C5a relativ eng auf die Funktion als eines der potentesten Anaphylatoxine des Körpers begrenzt ist. Es kann spekuliert werden, dass eine vermehrte Synthese und konsekutiv vermehrte Rezeptorexpression entsprechend vor allem in der Akut- beziehungsweise Frühphase einer inflammatorischen Kardiomyopathie zu suchen wäre, wohingegen die vielfältigeren immunmodulatorischen Effekte von C3a dauerhaft eine Rolle spielen [83]. In der Gruppe der nicht-inflammatorischen Kardiomyopathien war kein signifikanter Unterschied der Expression der Anaphylatoxinrezeptoren festzustellen. Dendritische Zellen exprimieren sowohl C3aR als auch C5aR [130]. Sie spielen als antigenpräsentierende Zellen eine wichtige Rolle in der Akutphase einer inflammatorischen Kardiomyopathie beziehungsweise Myokarditis und persistieren anschließend in vielen Fällen als Teil von entzündlichen Infiltraten im Myokard [6]. Des Weiteren ist der Nachweis geführt, dass sie an der Induktion von Autoimmunreaktionen als eine der Säulen einer Chronifizierung inflammatorischer Kardiomyopathien beteiligt sind [21], [56], [96]. Erste Ansätze aus dem Infarktmodell deuten darauf hin, dass sie auch in Heilungs-, und Remodellingprozessen des Myokards eine Rolle spielen sowie protektive Eigenschaften haben [131], [132]. Da der C3a-C3aR Signalweg ebenfalls pro- und antiinflammatorische Signalwege beschreiten kann, lässt sich im aktuellen Studiendesign nicht klären welche Prozesse, illustriert durch die vermehrte Expression des Anaphylatoxinrezeptors C3aR oder Ko-Expression von C3aR auf CD11c⁺ Zellen, vermehrt aktiv sind. Sicherlich könnte hier perspektivisch ein Studiendesign, das die entsprechende Expression zu definierten Zeitpunkten nach Erstdiagnose einer inflammatorischen Kardiomyopathie quantifiziert um eine eventuelle Dynamik abzubilden weiteren Erkenntnisgewinn liefern.

Die Ablagerung von Komplement hat nachteilige Remodelling-Prozesse des Herzmuskels nach einem Infarkt zur Folge [133]. DC werden als klassische antigenpräsentierende Zellen durch Fremdartigene und kardialen körpereigene

Antigene, welche auf MHC II Molekülen präsentiert werden, aktiviert [134]. Darüber hinaus führt die Aktivierung des Komplementsystems zu einer vermehrten Einwanderung von Leukozyten [67], [77]. Ergebnisse aus dem Tiermodell legen eine wichtige Rolle von DC bei der Autoimmun-Myokarditis nahe [56], [135]. Des Weiteren ist der Spiegel von dendritischen Zellen im Blut bei Patienten mit schwerer Herzinsuffizienz erhöht [51]. In der vorgelegten Arbeit war bei signifikant mehr Patienten mit erhöhter Expression von MHCII Expression auch vermehrt C3aR nachweisbar. Hilfreich für das weitere Verständnis wäre hierbei perspektivisch sicherlich eine Aufschlüsselung welche Zellspezies und Mechanismen für die vermehrte Nachweisbarkeit von C3aR neben den über die CD11c-Färbung identifizierten DC verantwortlich sind. Konkret in Frage kommen neutrophile Granulozyten, Makrophagen und T-Zellen welche jeweils C3aR exprimieren [136]. Eine vermehrte Nachweisbarkeit ist sowohl durch eine vermehrte Einwanderung von C3aR⁺ (Immun-)Zellen erklärbar als auch durch eine vermehrte C3aR Expression je Zelle und wäre in jedem Fall Marker für eine vermehrte Immunaktivität. Das Verständnis der Signalwege wird darüber hinaus dadurch kompliziert, dass Immunzellen sowohl als Effektor als auch Rezeptor fungieren, exemplarisch sind DC zur Synthese von C3a fähig, wodurch auch para- und autokrine Mechanismen Berücksichtigung finden müssen [136], [137]. Auch wird von Zellen des Herzens selbst Komplement synthetisiert, von welcher Subspezies genau ist unklar [138]. Möglicherweise illustriert die vermehrte C3aR Expression unter anderem auf CD11c⁺ Zellen bei gleichzeitiger Hochregulation von MHC II auch eine frühe autoimmune Komponente des Entzündungsprozesses. Gesichert ist, dass C3 und seine Spaltprodukte C3a und C3b sowie dendritische Zellen eine wichtige Rolle bei der Induktion einer Autoimmunität und Myokarditis spielen [7], [21]. Relevant ist hierbei unter anderem die Stimulation von Th1-Zellen über den MHC II Signalweg [139], [140]. Vergleichbare Signalwege werden auch im Rahmen der Transplantatabstoßung bzw. Allostimulation besprochen und hier spielen die Stimulation des C3aR auf DC sowie teils sogar die C3 Synthese durch DC und MHC II Expression eine maßgebliche Rolle [96], [97].

Meines Wissens nach ist die vorliegende Arbeit die erste, die auch eine prognostische Relevanz des Nachweises von C3aR in Patienten beschreibt bei denen eine EMB im Rahmen einer nicht-ischämischen Herzinsuffizienz durchgeführt wurde, nämlich dass der fehlende Nachweis von C3aR oder C3aR auf CD11c⁺ Zellen mit einem schlechteren Outcome einhergeht. Diese Beobachtung lässt sich zum jetzigen Stand der Forschung noch nicht zu einer tragfähigen Hypothese hinsichtlich des zugrunde liegenden Mechanismus verdichten. Mögliche Erklärungsansätze wären bezüglich der vermindert C3aR exprimierenden CD11c⁺ positiven Zellen eine dann verminderte Migration in den Herzmuskel sowie eine konsekutiv fehlende immunoprotektive bzw. immunomodulatorische Aktivität und Attenuierung von Autoimmunprozessen [131], [141]. Ein möglicher Erklärungsansatz, dass ein insgesamt verminderter Nachweis von C3aR ein schlechteres Outcome zur Folge hat, könnte die Rolle der vermehrten Komplementaktivierung bei der Rekrutierung von Stammzellen in den Herzmuskel sein. Beschrieben ist, dass kardiale pluripotente Stammzellen zur Migration in den Herzmuskel und zur Proliferation angeregt werden sowie Heilungs- sowie Remodellingprozesse unterstützen. Eine insgesamt verminderte Komplementaktivität könnte dies nachteilig beeinflussen [133] [142]. Studien, die die Expression des C3aR Rezeptors und dessen mögliche Relevanz für das Outcome einer Nicht-ischämischen Herzinsuffizienz thematisieren, existieren aktuell noch nicht. Arbeiten, die sich im Rahmen desselben Settings mit C3a auseinandersetzen sind äußerst rar. Gezeigt werden konnte unter anderem eine Korrelation eines erhöhten C3a Spiegels mit einer erhöhten Re-Hospitalisierungsrate sowie Mortalität in Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz. Eine Aufschlüsselung nach Genese der Herzinsuffizienz fand nicht statt [143]. Aukrust et al. machten die Beobachtung, dass bei der Behandlung einer chronischen Herzinsuffizienz mit intravenösem Immunglobulin der Spiegel von C3b, dem zweiten Spaltprodukt von C3 neben C3a, deutlich anstieg, jedoch trotzdem eine Verbesserung der LVEF eintrat, diese war jedoch geringer je höhere Werte von C3b gemessen wurden [144]. Frey et al zeigten in einer Studie mit Patienten, die eine stabile Herzinsuffizienz aufwiesen, dass erhöhte C3c Werte mit einem besseren Gesamtüberleben, einer etwas höheren

LVEF und geringeren NTpro-BNP Werten einhergingen [145]. Frey formuliert darüber hinaus konstruktive Kritikpunkte am Studiendesign der Arbeiten, die C3a/C3b und dessen Einfluss auf das Outcome einer Herzinsuffizienz untersuchen. Er führt an, dass sowohl C3b als auch C3a im Gegensatz zu C3c sehr instabil sind und rasch abgebaut werden wodurch bereits eine verzögerte Aufarbeitung bzw. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen die Werte massiv verfälschen können. Des Weiteren binden einige erhältliche Antikörper auch das Zerfallsprodukt C3a des-Arg, welches jedoch völlig andere pharmakologische Eigenschaften aufweist [146], [147]. Die ergänzende Färbung des Herzgewebes auf den keinem schnellen Zerfall unterliegenden C3a Rezeptor als indirektes Maß einer vermehrten Komplementaktivität wie in der vorgelegten Arbeit durchgeführt, könnte hier eventuell zukünftig eine komplementäre indirekte Quantifizierungsmethode darstellen und zur Lösung der Problematik beitragen. Insgesamt sind alle drei Arbeiten mit der vorgelegten Arbeit nur eingeschränkt vergleichbar, da explizit auch Herzinsuffizienzen ischämischer Genese in die Studien einbezogen wurden. Insgesamt sind die Patientenkollektive im direkten Vergleich sehr heterogen mit differierenden Schweregraden bzw. Dauer der jeweils vorliegenden Herzinsuffizienz. Sowohl in der vorgelegten Arbeit als auch in den Studien von Gombos und Frey korrelieren die erhöhten Komplementwerte mit Biomarkern einer Akute-Phase-Reaktion sowie entzündlichen Veränderungen, unter anderem CRP. Es ist somit nicht gänzlich auszuschließen, dass eine Korrelation mit Myokardschädigung und dem langfristigen kardiovaskulären Outcome teilweise nur sekundär zur Korrelation mit anderen Entzündungsmarkern besteht.

Es ist schon lange bekannt, dass in vielen Fällen Patienten mit verschiedenen Schweregraden einer Herzinsuffizienz erhöhte CRP-Level aufweisen [148]. Mit der Etablierung von High Sensitivity Assays können auch geringe CRP-Erhöhungen deutlich unter 1 mg/dl valide quantifiziert werden [149]. Seither konnte in vielen Studien gezeigt werden, dass auch diese geringe CRP-Erhöhung prognostischen Wert insbesondere in ischämischer Kardiomyopathie sowie Herzinsuffizienz hat und mit einer schlechteren Prognose einhergeht [150]. Die Studienlage hinsichtlich der prognostischen Relevanz in Nicht-ischämischer

Kardiomyopathie ist kontrovers. In einer Arbeit von Lamblin et al. war eine CRP-Erhöhung nicht mit einer erhöhten Mortalität assoziiert. Eine weitere Aufschlüsselung der Genese der Herzinsuffizienz fand nach erfolgtem endovaskulärem Ausschluss einer signifikanten Koronarsklerose nicht statt [151]. Ähnlich verfahren wurde bei der Abgrenzung der nicht-ischämischen Kardiomyopathien in einer Arbeit von Ronnow et al. Erhöhte CRP-Werte korrelierten hier signifikant mit einer erhöhten Mortalität, allerdings wies die Patientenkohorte auch durchschnittlich deutlich höhere CRP-Werte auf [152]. Die vorgelegte Arbeit ist eine der ersten in diesem Zusammenhang welche sowohl die Gruppe der Nicht-ischämischen Kardiomyopathien präzise subklassifiziert als auch inflammatorische Kardiomyopathien in den Fokus nimmt. Die CRP-Werte korrelierten nicht mit dem definierten kombinierten Endpunkt und auch nicht mit anderen Entzündungsmarkern. Ebenso konnte im Gegensatz zu bisherigen Erkenntnissen aus dem immunhistologischen Nachweis einer Entzündung (CD3, CD 68, MHCII) nicht auf zukünftige unerwünschte Ereignisse (UE) in der untersuchten Patientenkohorte mit inflammatorischer Kardiomyopathie geschlossen werden. Die weitere Aufschlüsselung der Gruppe der nicht-ischämischen Kardiomyopathien nach erfolgtem Ausschluss einer signifikanten Koronarsklerose ist zukünftig sicherlich ein unabdingbarer Schritt hin zu einer besseren Vergleichbarkeit entsprechender Patientenkohorten in unterschiedlichen Studien. Das dies durchaus mit einem klaren Erkenntnisgewinn verbunden sein kann, zeigt die Studienlage der DCM unterschiedlicher Genese als Subkategorie der Nicht-ischämischen Kardiomyopathien. Hier konnte in zwei Arbeiten eine Korrelation zwischen erhöhten CRP-Werten und der Mortalität gezeigt werden [153], [154]. Erschwerend kommt sicherlich hinzu, dass die hsCRP Bestimmung zur weiteren validen Aufschlüsselung von CRP-Werten $<0,5\text{mg/dl}$ nicht zu den Standardlaborwerten gehört und somit retrospektive Studiendesigns erschwert. Insbesondere wenn in einer Studie inflammatorische Kardiomyopathien mit erwartbarer CRP-Erhöhung eingeschlossen werden, ist nicht auszuschließen, dass eine CRP-Erhöhung trotz sorgfältiger Patientenauswahl auf andere noch unerkannte infektiöse oder chronisch-entzündliche Krankheitsbilder

zurückzuführen ist und die Ergebnisse entsprechend verfälscht werden [155]. Auch aus dem immunhistologischen Nachweis weiterer Entzündungsmarker konnte entgegen bisheriger Erkenntnisse nicht auf zukünftige unerwünschte Ereignisse (UE) in der untersuchten Patientenkohorte mit inflammatorischer Kardiomyopathie geschlossen werden [156]. Über ein Drittel der untersuchten Patienten wies eine myokardiale Expression von C3aR bzw. eine Ko-Expression von C3aR und CD11c auf. Diese Marker waren vermehrt vertreten, wenn darüber hinaus bestimmte Virus-RNA nachgewiesen werden konnte. Diese Ergebnisse stimmen mit früheren Erkenntnissen überein, die darlegen, dass Immunzellen relevante Ziele einer myokardialen Enterovirus-Infektion sind und ein extrakardiales Reservoir für Virus-RNA darstellen [157]. Die diagnostische und prognostische Relevanz des Nachweises von Virus-RNA ist weiterhin strittig. Es liegen sowohl Arbeiten vor in denen der Virusnachweis keinen Einfluss auf das Outcome der Patienten hatte, als auch Studien bei denen eine Korrelation zwischen Virusnachweis und schlechterem Outcome beschrieben wird [8], [158]. Im hier untersuchten Patientenkollektiv war ein Drittel der Biopsien viruspositiv, der Nachweis von Virus-RNA hatte jedoch keinen positiven Vorhersagewert für das Auftreten eines klinischen Endpunktes im Nachbeobachtungszeitraum. Eine Einzelbetrachtung beziehungsweise Aufschlüsselung nach den einzelnen nachgewiesenen Virusarten fand angesichts der für eine statistisch signifikante Auswertung zu geringen Einzelzahlen nicht statt. Ein großer Teil der vorliegenden Studien nimmt diese Aufschlüsselung ebenfalls nicht vor. Die widersprüchliche Studienlage lässt sich damit vermutlich teilweise erklären, da die einzelnen Studien hierdurch aus mehreren Gründen eingeschränkt vergleichbar sind: Die Zusammensetzung der Gesamtheit an verschiedenen nachgewiesenen Viren differiert sowohl regional, international als auch im Laufe der Zeit. So unterscheidet sich beispielsweise die nachweisbare Virenpopulation in verschiedenen Regionen der USA [159]. Exemplarisch nimmt gleichzeitig in Deutschland der Anteil von Myokarditiden bei denen Parvovirus B 19 isoliert werden kann zu [160]. Außer Acht gelassen werden sollte zudem auch nicht, dass die Stämme der nachgewiesenen Viren deutliche saisonale Unterschiede aufweisen, was bekanntermaßen insbesondere für Influenzaviren gut

dokumentiert ist [161]. Bei aller Diskussion um die Relevanz des Virusnachweises zum Diagnosezeitpunkt sollte die Rolle des Virusnachweises insgesamt jedoch nicht unterschätzt werden. Es sei daran erinnert, dass eine Viruspersistenz im späteren Krankheitsverlauf sehr wohl klinische und prognostische Relevanz besitzt [162].

Die vorgelegte Arbeit hat sicherlich teilweise beobachtenden beziehungsweise beschreibenden Charakter und stellt zahlreiche Hypothesen auf. Dies ist unter anderem in der Tatsache begründet, dass die Teilgebiete wie nicht-ischämische Kardiomyopathien sowie die Rolle des Komplementsystems und dendritischer Zellen im Krankheitsverlauf zwar teils ausführlich erforscht sind, es jedoch nur sehr wenige Arbeiten gibt, die die einzelnen Komponenten zu einem kohärenten Gesamtmodell vereinen und auf denen entsprechend aufgebaut werden konnte. Insbesondere letzteres illustriert jedoch den großen Bedarf an weiterer Grundlagenforschung im Bereich der Vernetzung von DC und Anaphylatoxinrezeptoren mit Kardiomyopathien, welcher bisher noch nicht eingehend untersucht ist, jedoch große klinische Bedeutung haben könnte. Insbesondere wenn Themen der Immunologie behandelt werden mit ihren hochkomplexen und komplizierten Signalwegen und entsprechend einem weiten Feld an Einflussfaktoren durch teils unbekannte Variablen, bleibt es, wie in vielen Studien, auch in dieser teils bei einer Auflistung von einzelnen signifikanten Ergebnissen, die erst in Zusammenschau mit zukünftigen Arbeiten Teil einer belastbaren Hypothese werden können. Im konkreten Fall kommt sicherlich erschwerend hinzu, dass die Bezugsgröße, nämlich die Gruppe der nicht-inflammatorischen Kardiomyopathien selbst wiederum sehr heterogen ist und in zahlreiche Untergruppen zerfällt mit entsprechenden Auswirkungen auf das Erreichen valider Signifikanzniveaus. Sehr kritisch zu sehen ist definitiv die Tatsache, dass zahlreiche vorangegangene Arbeiten dieses Problem umgehen und nicht-inflammatorische Kardiomyopathien wie ein einheitliches Krankheitsbild behandeln und keine Aufschlüsselung in die einzelnen Untergruppen aufnehmen mit entsprechenden Folgen für die Vergleichbarkeit von Studien untereinander. Ein erster Schritt wäre bei identischem Studiendesign eine deutliche Erhöhung der Patientenzahlen um auch in den Subkategorien

statistisch auswertbare Fallzahlen zu erreichen. Dies gilt zum Beispiel für einzelne Virusspezies, die zum Teil nur in weniger als fünf Patienten nachweisbar waren oder die Unterkategorie der akuten Myokarditiden mit 11 Patienten. Während eines Nachbeobachtungszeitraumes von 2 Jahren, war die Ereignisrate von zunehmendem myokardialen Remodelling, definiert durch eine Verschlechterung der LVEF in der Patientenkohorte, relativ niedrig. Entsprechend würde eine größere Studienpopulation auch hier einen Beitrag leisten um zu evaluieren ob die C3aR Expression auch dann als unabhängiger Vorhersagewert einer Verschlechterung der LVEF in NICM Bestand hat. Des Weiteren wäre sicherlich eine Ausweitung des Nachbeobachtungszeitraumes sinnvoll um chronische Veränderungen im Rahmen von Remodelling und Autoimmunprozessen adäquat abzubilden. In der Literatur ist beispielsweise eine erhöhte Event-Rate bezogen auf die Mortalität auch noch im Zeitfenster von 4-15 Jahren beschrieben nach zunächst relativ stabilem Verlauf [163] Es muss eingeräumt werden, dass die Färbung der Anaphylatoxin-Rezeptoren in einem semiquantitativen verblindeten Verfahren ausgewertet wurde [1], [164]–[166] Obwohl diese Methodik bereits für andere Biomarker vorgeschlagen wurde, wäre eine Standardisierung zur präzisen Bestimmung der C5aR- und C3aR-Expression wünschenswert [167]. In der vorgelegten Arbeit wurde eine Patientenkohorte ausgewertet wie sie im klinischen Alltag regelmäßig auftritt. Eingeschlossen wurden Patienten bei denen die Indikation zur EMB gestellt wurde, die Primärauswahl erfolgte also nicht anhand einer eingeschränkten LVEF als Marker einer Herzinsuffizienz. Da die Indikation zur EMB nicht ausschließlich von der LVEF abhängt, sind relativ viele Patienten eingeschlossen bei denen die Funktion des linken Ventrikels nur gering eingeschränkt ist. Diese relativ hohe Schwankungsbreite stellt eine mögliche Störvariable dar. Die multivariate Datenauswertung zeigt aber deutlich, dass eine verminderte Ko-Expression von C3aR und CD11c auch im angepassten Modell als unabhängiger Vorhersagewert Bestand hatte. Des Weiteren hat der Umstand, dass die Patientenkohorte bezogen auf die linksventrikulären Funktionsparameter relativ gesund ist, 51% der Patienten hatten eine LVEF < 45%, naturgemäß Auswirkungen auf das Auftreten von Endpunkten im Rahmen des

Nachbeobachtungszeitraumes. Harte Endpunkte sind entsprechend rar, exemplarisch starben lediglich 7 Patienten im Nachbeobachtungszeitrum. Aus ähnlichen Studien geläufige weitere harte Endpunkte wie die Notwendigkeit einer Herztransplantation traten nicht auf. Folglich musste bei der Auswertung auf einen definierten kombinierten Endpunkt zurückgegriffen werden. Hier muss kritisch eingeräumt werden, dass dieser maßgeblich von einer Verschlechterung der LVEF abhängt.

5. Zusammenfassung:

5.1 Definition der Fragestellung

Besteht eine Korrelation der myokardialen Expression von Anaphylatoxinrezeptoren auf CD11c⁺ Zellen mit myokardialen entzündlichen Veränderungen und der Prognose in Patienten mit nicht-ischämischer Kardiomyopathie?

5.2 Methodik

In Myokardbiopsien von 102 Patienten mit nicht-ischämischer Kardiomyopathie wurde die Expression von C3aR, C5aR und weiteren Oberflächenproteinen bestimmt und diese in Beziehung zu definierten Labor- und Funktionsparametern gesetzt. Der primäre Studienendpunkt wurde definiert als Kombination aus Herztransplantation, Tod jeglicher Ursache, Rehospitalisierung aufgrund der Herzinsuffizienz sowie signifikante Abnahme der LVEF im Nachbeobachtungszeitraum.

5.3 Ergebnisse

Die Expression von C3aR und Ko-Expression von C3aR auf CD11c⁺ Zellen ist im Myokardgewebe bei Patienten mit Zeichen einer Myokardschädigung und Entzündung erhöht. Des Weiteren ist sie mit dem klinischen Outcome sowie nachteiligen kardialen Remodelling-Prozessen, die einer progredienten Herzinsuffizienz zugrunde liegen, vergesellschaftet.

5.3 Diskussionsergebnis/Schlussfolgerung

Der Nachweis von C3aR auf CD11c⁺ Zellen könnte als neuer, zusätzlicher Biomarker dienen um ein nachteiliges Outcome, und insbesondere eine

Verschlechterung der LVEF in Patienten mit nicht-ischämischer Kardiomyopathie vorherzusagen. Die Färbung auf diesen Indikator könnte perspektivisch im Rahmen der Routine zur erweiterten Risikostratifizierung von Patienten mit NICM sinnvoll sein. Des Weiteren könnten die Ergebnisse der vorgelegten Arbeit den Weg hin zu weiterer klinischer und experimenteller Grundlagenforschung auf dem Gebiet der Anaphylatoxinrezeptoren und ihrer Rolle im Rahmen der inflammatorischen Kardiomyopathie ebnen.

6. Veröffentlichungen

Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits in der folgenden Publikation veröffentlicht:

Myocardial expression of the anaphylatoxin receptor C3aR is associated with cardiac inflammation and prognosis in patients with non-ischaemic heart failure.

Mueller KAL, Patzelt J, Sauter M, Maier P, Gekeler S, Klingel K, Kandolf R, Seizer P, Gawaz M, Geisler T, Langer HF.

ESC Heart Fail. 2018 Oct;5(5):846-857. doi: 10.1002/ehf2.12298. Epub 2018 Aug 31.

7. Literaturverzeichnis

- [1] B. J. Maron *et al.*, "Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies," *Circulation*, 2006.
- [2] C. A. Elamm, S. G. Al-Kindi, and G. H. Oliveira, "Characteristics and Outcomes of Patients with Myocarditis Listed for Heart Transplantation," *Circ. Hear. Fail.*, 2016.
- [3] S. Shore *et al.*, "Characteristics, Treatments, and Outcomes of Hospitalized Heart Failure Patients Stratified by Etiologies of Cardiomyopathy," *JACC. Heart Fail.*, 2015.
- [4] H. Thomas Aretz, "Myocarditis: The Dallas criteria," *Hum. Pathol.*, 1987.
- [5] L. T. Cooper, "Myocarditis.," *N. Engl. J. Med.*, 2009.
- [6] H. Yokoyama, S. Kuwao, K. Kohno, K. Suzuki, T. Kameya, and T. Izumi, "Cardiac dendritic cells and acute myocarditis in the human heart," *Jpn Circ J*, 2000.
- [7] Z. Kaya *et al.*, "Contribution of the innate immune system to autoimmune myocarditis: A role for complement," *Nat. Immunol.*, vol. 2, no. 8, pp. 739–745, 2001.
- [8] I. Kindermann *et al.*, "Predictors of outcome in patients with suspected myocarditis," *Circulation*, 2008.
- [9] J. C. Schultz, A. a Hilliard, L. T. Cooper, and C. S. Rihal, "Diagnosis and treatment of viral myocarditis.," *Mayo Clin. Proc.*, 2009.
- [10] J. M. Bergelson *et al.*, "Isolation of a common receptor for coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5," *Science (80-.)*, 1997.
- [11] T. A. Martino *et al.*, "The coxsackie-adenovirus receptor (CAR) is used by reference strains and clinical isolates representing all six serotypes of coxsackievirus group B and by swine vesicular disease virus," *Virology*, 2000.
- [12] C. Badorff *et al.*, "Enteroviral protease 2A cleaves dystrophin: Evidence of cytoskeletal disruption in an acquired cardiomyopathy," *Nat. Med.*, 1999.
- [13] D. Fairweather *et al.*, "Mast cells and innate cytokines are associated with susceptibility to autoimmune heart disease following Coxsackievirus B3 infection," *Autoimmunity*, 2004.
- [14] J. R. Lane, D. A. Neumann, A. Lafond-Walker, A. Herskowitz, and N. R. Rose, "Interleukin 1 or tumor necrosis factor can promote Coxsackie B3-induced myocarditis in resistant B10.A mice.," *J. Exp. Med.*, 1992.
- [15] R. E. Cunnion and J. E. Parrillo, "Myocardial dysfunction in sepsis.," *Crit.*

Care Clin., 1989.

- [16] S. Frisancho-Kiss *et al.*, "Cutting Edge: Cross-Regulation by TLR4 and T cell Ig Mucin-3 Determines Sex Differences in Inflammatory Heart Disease," *J. Immunol.*, 2007.
- [17] D. Fairweather *et al.*, "IL-12 Protects against Coxsackievirus B3-Induced Myocarditis by Increasing IFN- and Macrophage and Neutrophil Populations in the Heart," *J. Immunol.*, 2005.
- [18] P. P. Liu and J. W. Mason, "Advances in the understanding of myocarditis," *Circulation*, 2001.
- [19] M. Kodama *et al.*, "Rat dilated cardiomyopathy after autoimmune giant cell myocarditis," *Circ. Res.*, 1994.
- [20] D. Zehn and M. J. Bevan, "T Cells with Low Avidity for a Tissue-Restricted Antigen Routinely Evade Central and Peripheral Tolerance and Cause Autoimmunity," *Immunity*, 2006.
- [21] U. Eriksson *et al.*, "Dendritic cell-induced autoimmune heart failure requires cooperation between adaptive and innate immunity," *Nat. Med.*, 2003.
- [22] B. Maisch, P. Deeg, G. Liebau, and K. Kochsiek, "Diagnostic relevance of humoral and cytotoxic immune reactions in primary and secondary dilated cardiomyopathy," *Am. J. Cardiol.*, 1983.
- [23] K. Ono, a Matsumori, T. Shioi, Y. Furukawa, and S. Sasayama, "Cytokine gene expression after myocardial infarction in rat hearts: possible implication in left ventricular remodeling.," *Circulation*, 1998.
- [24] P. Blyszczuk *et al.*, "Myeloid differentiation factor-88/interleukin-1 signaling controls cardiac fibrosis and heart failure progression in inflammatory dilated cardiomyopathy," *Circ. Res.*, 2009.
- [25] G. C. Baldeviano *et al.*, "Interleukin-17A is dispensable for myocarditis but essential for the progression to dilated cardiomyopathy," *Circ. Res.*, 2010.
- [26] J. A. Towbin *et al.*, "Incidence, causes, and outcomes of dilated cardiomyopathy in children," *J. Am. Med. Assoc.*, 2006.
- [27] R. Estruch *et al.*, "Reversibility of alcoholic cardiomyopathy with abstinence: presentation of 2 cases," *Med. Clin. (Barc.)*, 1989.
- [28] R. G. Weintraub, C. Semsarian, and P. Macdonald, "Dilated cardiomyopathy," *The Lancet*. 2017.
- [29] A. C. Garfinkel, J. G. Seidman, and C. E. Seidman, "Genetic Pathogenesis of Hypertrophic and Dilated Cardiomyopathy," *Heart Failure Clinics*. 2018.

- [30] E. L. Burkett and R. E. Hershberger, "Clinical and genetic issues in familial dilated cardiomyopathy," *J Am Coll Cardiol*, 2005.
- [31] N. G. Mahon, R. T. Murphy, C. A. MacRae, A. L. P. Caforio, P. M. Elliott, and W. J. McKenna, "Echocardiographic evaluation in asymptomatic relatives of patients with dilated cardiomyopathy reveals preclinical disease," *Ann. Intern. Med.*, 2005.
- [32] H. Ashrafian, W. J. McKenna, and H. Watkins, "Disease pathways and novel therapeutic targets in hypertrophic cardiomyopathy," *Circulation Research*. 2011.
- [33] J. B. Geske, S. R. Ommen, and B. J. Gersh, "Hypertrophic Cardiomyopathy: Clinical Update," *JACC: Heart Failure*. 2018.
- [34] W. A. Muller and G. J. Randolph, "Migration of leukocytes across endothelium and beyond: Molecules involved in the transmigration and fate of monocytes," in *Journal of Leukocyte Biology*, 1999.
- [35] J. Banchereau and R. M. Steinman, "Dendritic cells and the control of immunity.," *Nature*, 1998.
- [36] R. M. Steinman, "Dendritic cells: Versatile controllers of the immune system," *Nature Medicine*. 2007.
- [37] C. Caux *et al.*, "Dendritic cell biology and regulation of dendritic cell trafficking by chemokines," *Springer Semin.*, 2000.
- [38] G. J. Randolph, K. Inaba, D. F. Robbiani, R. M. Steinman, and W. A. Muller, "Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo," *Immunity*, 1999.
- [39] G. Häusser, B. Ludewig, H. R. Gelderblom, Y. Tsunetsugu-Yokota, K. Akagawa, and A. Meyerhans, "Monocyte-derived dendritic cells represent a transient stage of differentiation in the myeloid lineage," *Immunobiology*, 1997.
- [40] T. Kitajima, K. Ariizumi, P. R. Bergstresser, and A. Takashima, "A novel mechanism of glucocorticoid-induced immune suppression: the inhibition of T cell-mediated terminal maturation of a murine dendritic cell line.," *J. Clin. Invest.*, 1996.
- [41] S. Sozzani *et al.*, "Migration of dendritic cells in response to formyl peptides, C5a, and a distinct set of chemokines.," *J. Immunol.*, 1995.
- [42] D. R. Greaves *et al.*, "CCR6, a CC chemokine receptor that interacts with macrophage inflammatory protein 3alpha and is highly expressed in human dendritic cells.," *J. Exp. Med.*, 1997.
- [43] P. Pierre *et al.*, "Developmental regulation of MHC class II transport in mouse dendritic cells.," *Nature*, 1997.

- [44] K. Shortman and Y.-J. Liu, "MOUSE AND HUMAN DENDRITIC CELL SUBTYPES," *Nat. Rev. Immunol.*, 2002.
- [45] C. Caux *et al.*, "B70/B7-2 is identical to CD86 and is the major functional ligand for CD28 expressed on human dendritic cells.," *J. Exp. Med.*, 1994.
- [46] K. Inaba, "The tissue distribution of the B7-2 costimulator in mice: abundant expression on dendritic cells in situ and during maturation in vitro," *J. Exp. Med.*, 1994.
- [47] R. M. Steinman and M. C. Nussenzweig, "Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2002.
- [48] T. Brocker, M. Riedinger, and K. Karjalainen, "Targeted expression of major histocompatibility complex (MHC) class II molecules demonstrates that dendritic cells can induce negative but not positive selection of thymocytes in vivo.," *J. Exp. Med.*, 1997.
- [49] B. Dubois *et al.*, "Dendritic cells enhance growth and differentiation of CD40-activated B lymphocytes.," *J. Exp. Med.*, 1997.
- [50] J. Fayette *et al.*, "Human Dendritic Cells Skew Isotype Switching of CD40-activated Naive B Cells towards IgA₁ and IgA₂," *J. Exp. Med.*, 1997.
- [51] P. Athanassopoulos, L. M. B. Vaessen, A. P. W. M. Maat, A. H. M. M. Balk, W. Weimar, and A. J. J. C. Bogers, "Peripheral blood dendritic cells in human end-stage heart failure and the early post-transplant period: evidence for systemic Th1 immune responses.," *Eur. J. Cardiothorac. Surg.*, 2004.
- [52] P. Athanassopoulos *et al.*, "Blood dendritic cell levels and phenotypic characteristics in relation to etiology of end-stage heart failure: implications for dilated cardiomyopathy.," *Int. J. Cardiol.*, 2009.
- [53] Y. Sugi *et al.*, "Reduction and activation of circulating dendritic cells in patients with decompensated heart failure," *Int. J. Cardiol.*, 2011.
- [54] M. Afanasyeva, D. Georgakopoulos, and N. R. Rose, "Autoimmune myocarditis: Cellular mediators of cardiac dysfunction," *Autoimmunity Reviews*. 2004.
- [55] R. Pistulli *et al.*, "Decrease in dendritic cells in endomyocardial biopsies of human dilated cardiomyopathy," *Eur. J. Heart Fail.*, 2013.
- [56] U. Eriksson *et al.*, "Activation of Dendritic Cells through the Interleukin 1 Receptor 1 Is Critical for the Induction of Autoimmune Myocarditis," *J. Exp. Med.*, 2003.
- [57] W. Z. Al-Sharif, J. O. Sunyer, J. D. Lambris, and L. C. Smith, "Sea urchin coelomocytes specifically express a homologue of the complement component C3.," *J. Immunol.*, 1998.

- [58] J. Oriol Sunyer, I. K. Zarkadis, and J. D. Lambris, "Complement diversity: A mechanism for generating immune diversity?," *Immunology Today*, 1998.
- [59] M. J. Walport, "Complement-first of two parts," *N. Engl. J. Med.*, 2001.
- [60] F. Petry, M. Botto, R. Holtappels, M. J. Walport, and M. Loos, "Reconstitution of the Complement Function in C1q-Deficient (C1qa^{-/-}) Mice with Wild-Type Bone Marrow Cells," *J. Immunol.*, 2001.
- [61] D. T. Fearon and W. W. Wong, "Complement Ligand-Receptor Interactions that Mediate Biological Responses," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 1, no. 1, pp. 243–271, 1983.
- [62] S. E. Degn, S. Thiel, and J. C. Jensenius, "New perspectives on mannan-binding lectin-mediated complement activation," *Immunobiology*, 2007.
- [63] F. Bexborn, P. O. Andersson, H. Chen, B. Nilsson, and K. N. Ekdahl, "The tick-over theory revisited: Formation and regulation of the soluble alternative complement C3 convertase (C3(H₂O)Bb)," *Mol. Immunol.*, 2008.
- [64] D. Ricklin and J. D. Lambris, "Complement in immune and inflammatory disorders: pathophysiological mechanisms.," *J. Immunol.*, 2013.
- [65] T. Crass *et al.*, "Expression cloning of the human C3a anaphylatoxin receptor (C3aR) from differentiated U-937 cells," *Eur. J. Immunol.*, 1996.
- [66] H. C. Wilken, S. Rogge, O. Götze, T. Werfel, and J. Zwirner, "Specific detection by flow cytometry of histidine-tagged ligands bound to their receptors using a tag-specific monoclonal antibody," *J. Immunol. Methods*, 1999.
- [67] R. Gutzmer *et al.*, "Human monocyte-derived dendritic cells are chemoattracted to C3a after up-regulation of the C3a receptor with interferons," *Immunology*, 2004.
- [68] A. Klos, A. J. Tenner, K. O. Johswich, R. R. Ager, E. S. Reis, and J. Köhl, "The role of the anaphylatoxins in health and disease," *Molecular Immunology*, 2009.
- [69] M. G. Strainic *et al.*, "Locally Produced Complement Fragments C5a and C3a Provide Both Costimulatory and Survival Signals to Naive CD4⁺T Cells," *Immunity*, 2008.
- [70] J. Zwirner, O. Götze, G. Begemann, A. Kapp, K. Kirchhoff, and T. Werfel, "Evaluation of C3a receptor expression on human leucocytes by the use of novel monoclonal antibodies," *Immunology*, 1999.
- [71] U. Martin *et al.*, "The human C3a receptor is expressed on neutrophils and monocytes, but not on B or T lymphocytes.," *J. Exp. Med.*, 1997.

- [72] T. Monsinjon, P. Gasque, P. Chan, A. Ischenko, J. J. Brady, and M. Fontaine, "Regulation by complement C3a and C5a anaphylatoxins of cytokine production in human umbilical vein endothelial cells," *FASEB J.*, 2003.
- [73] M. H. Hsu, J. A. Ember, M. Wang, E. R. Prossnitz, T. E. Hugli, and R. D. Ye, "Cloning and functional characterization of the mouse C3a anaphylatoxin receptor gene.," *Immunogenetics*, 1997.
- [74] H. C. Wilken, O. Götze, T. Werfel, and J. Zwirner, "C3a(desArg) does not bind to and signal through the human C3a receptor," *Immunol. Lett.*, 1999.
- [75] D. E. Chenoweth and T. E. Hugli, "Demonstration of specific C5a receptor on intact human polymorphonuclear leukocytes.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1978.
- [76] N. P. Gerard, M. K. Hodges, J. M. Drazen, P. F. Weller, and C. Gerard, "Characterization of a receptor for C5a anaphylatoxin on human eosinophils," *J. Biol. Chem.*, 1989.
- [77] A. Morelli, A. Larregina, E. Chuluyán, E. Kolkowski, and L. Fainboim, "Expression and modulation of C5a receptor (CD88) on skin dendritic cells. Chemotactic effect of C5a on skin migratory dendritic cells," *Immunology*, 1996.
- [78] A. Soruri, S. Kim, Z. Kiafard, and J. Zwirner, "Characterization of C5aR expression on murine myeloid and lymphoid cells by the use of a novel monoclonal antibody," *Immunol. Lett.*, 2003.
- [79] R. A. Wetsel, "Expression of the complement C5a anaphylatoxin receptor (C5aR) on non-myeloid cells," *Immunol. Lett.*, 1995.
- [80] K. B. Yancey, C. H. Hammer, L. Harvath, L. Renfer, M. M. Frank, and T. J. Lawley, "Studies of human C5a as a mediator of inflammation in normal human skin," *J. Clin. Invest.*, 1985.
- [81] S. H. Sacks and W. Zhou, "The role of complement in the early immune response to transplantation," *Nature Reviews Immunology*. 2012.
- [82] C. Kemper and J. P. Atkinson, "T-cell regulation: With complements from innate immunity," *Nature Reviews Immunology*. 2007.
- [83] H. N. Fernandez, P. M. Henson, A. Otani, and E. Hugli, "Chemotactic response to human C3a and C5a anaphylatoxins I. Evaluation of C3a and C5a leukotaxis in vitro and under simulated in vivo conditions," *J. Immunol.*, 1978.
- [84] M. U. Ehrengruber, T. Geiser, and D. A. Deranleau, "Activation of human neutrophils by C3a and C5A Comparison of the effects on shape changes, chemotaxis, secretion, and respiratory burst," *FEBS Lett.*, 1994.

- [85] E. Morita, J. M. Schroder, and E. Christophers, "Chemotactic responsiveness of eosinophils isolated from patients with inflammatory skin diseases.," *J. Dermatol.*, 1989.
- [86] I. M. Goldstein and G. Weissmann, "Generation of C5-Derived Lysosomal Enzyme-Releasing Activity (C5a) by Lysates of Leukocyte Lysosomes," *J. Immunol.*, vol. 113, no. 5, pp. 1583–1588, 1974.
- [87] W. R. Pieters, L. A. Houben, L. Koenderman, and J. A. Raaijmakers, "C5a-induced migration of human monocytes is primed by dexamethasone.," *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 1995.
- [88] G. Nilsson *et al.*, "C3a and C5a are chemotaxins for human mast cells and act through distinct receptors via a pertussis toxin-sensitive signal transduction pathway.," *J. Immunol.*, 1996.
- [89] R. R. Aksamit, W. Falk, and E. J. Leonard, "Chemotaxis by mouse macrophage cell lines.," *J. Immunol.*, 1981.
- [90] T. E. Mollnes *et al.*, "Essential role of the C5a receptor in E coli – induced oxidative burst and phagocytosis revealed by a novel lepirudin-based human whole blood model of inflammation," *Blood*, 2002.
- [91] L. Ottonello *et al.*, "rC5a directs the in vitro migration of human memory and naive tonsillar B lymphocytes: implications for B cell trafficking in secondary lymphoid tissues.," *J. Immunol.*, 1999.
- [92] S. Nataf, N. Davoust, R. S. Ames, and S. R. Barnum, "Human T Cells Express the C5a Receptor and Are Chemoattracted to C5a," *J Immunol*, 1999.
- [93] M. C. L. Wu *et al.*, "The receptor for complement component C3a mediates protection from intestinal ischemia-reperfusion injuries by inhibiting neutrophil mobilization," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2013.
- [94] P. J. Daffern, "C3a is a chemotaxin for human eosinophils but not for neutrophils. I. C3a stimulation of neutrophils is secondary to eosinophil activation," *J. Exp. Med.*, 1995.
- [95] K. Hartmann *et al.*, "C3a and C5a stimulate chemotaxis of human mast cells.," *Blood*, 1997.
- [96] Q. Peng *et al.*, "Local production and activation of complement up-regulates the allostimulatory function of dendritic cells through C3a-C3aR interaction," *Blood*, 2008.
- [97] Q. Peng, K. Li, H. Patel, S. H. Sacks, and W. Zhou, "Dendritic Cell Synthesis of C3 Is Required for Full T Cell Activation and Development of a Th1 Phenotype," *J. Immunol.*, 2006.
- [98] E. Morgan, W. Weigle, and T. Hugli, "Anaphylatoxin-mediated regulation of the immune response. I. C3a-mediated suppression of human and

- murine humoral immune responses.," *J. Exp. ...*, 1982.
- [99] E. L. Morgan, M. L. Thoman, M. V. Hobbs, W. O. Weigle, and T. E. Hugli, "Human C3a-mediated suppression of the immune response. II. Suppression of human in vitro polyclonal antibody responses occurs through the generation of nonspecific OKT8+ suppressor T cells," *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 1985.
- [100] X. Zhang *et al.*, "Regulation of Toll-like receptor-mediated inflammatory response by complement in vivo," *Blood*, 2007.
- [101] U. H. del Balzo, R. Levi, and M. J. Polley, "Cardiac dysfunction caused by purified human C3a anaphylatoxin.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1985.
- [102] J. W. Homeister, P. Satoh, and B. R. Lucchesi, "Effects of complement activation in the isolated heart. Role of the terminal complement components," *Circ. Res.*, 1992.
- [103] N. Latif, J. Smith, M. J. Dunn, M. H. Yacoub, and M. L. Rose, "Complement-mediated cytotoxic activity of anti-heart antibodies present in the sera of patients with dilated cardiomyopathy," *Autoimmunity*, 1994.
- [104] D. R. Anderson, C. M. Carthy, J. E. Wilson, D. Yang, D. V Devine, and B. M. McManus, "Complement component 3 interactions with coxsackievirus B3 capsid proteins: innate immunity and the rapid formation of splenic antiviral germinal centers.," *J. Virol.*, 1997.
- [105] D. Fairweather *et al.*, "Complement Receptor 1 and 2 Deficiency Increases Coxsackievirus B3-Induced Myocarditis, Dilated Cardiomyopathy, and Heart Failure by Increasing Macrophages, IL-1 , and Immune Complex Deposition in the Heart," *J. Immunol.*, 2006.
- [106] M. Suresh, H. Molina, M. S. Salvato, D. Mastellos, J. D. Lambris, and M. Sandor, "Complement component 3 is required for optimal expansion of CD8 T cells during a systemic viral infection.," *J. Immunol.*, 2003.
- [107] B. Maisch, P. Deeg, G. Liebau, and K. Kochsiek, "Diagnostic relevance of humoral and cytotoxic immune reactions in primary and secondary dilated cardiomyopathy," *Am. J. Cardiol.*, vol. 52, no. 8, pp. 1072–1078, 1983.
- [108] L. J. Wolfgram, K. W. Beisel, A. Herskowitz, and N. R. Rose, "Variations in the susceptibility to Coxsackievirus B3-induced myocarditis among different strains of mice.," *J. Immunol.*, 1986.
- [109] F. L. Alvarez, N. Neu, N. R. Rose, S. W. Craig, and K. W. Beisel, "Heart-specific autoantibodies induced by Coxsackievirus B3: Identification of heart autoantigens," *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 1987.
- [110] N. Neu, K. W. Beisel, M. D. Traystman, N. R. Rose, and S. W. Craig, "Autoantibodies specific for the cardiac myosin isoform are found in mice susceptible to Coxsackievirus B3-induced myocarditis.," *J. Immunol.*,

1987.

- [111] N. Neu, N. R. Rose, K. W. Beisel, a Herskowitz, G. Gurri-Glass, and S. W. Craig, "Cardiac myosin induces myocarditis in genetically predisposed mice.," *J. Immunol.*, 1987.
- [112] O. Leone *et al.*, "2011 Consensus statement on endomyocardial biopsy from the Association for European Cardiovascular Pathology and the Society for Cardiovascular Pathology," *Cardiovasc. Pathol.*, 2012.
- [113] K. A. L. Mueller *et al.*, "Myocardial expression of the anaphylatoxin receptor C3aR is associated with cardiac inflammation and prognosis in patients with non-ischaemic heart failure," *ESC Hear. Fail.*, 2018.
- [114] *et al.* Elliott P, Andersson B, Arbustini E, "Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the European Society Of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases.," *Eur Hear. J.*, 2008.
- [115] K. A. L. Muller *et al.*, "Prognostic value of contrast-enhanced cardiac magnetic resonance imaging in patients with newly diagnosed non-ischemic cardiomyopathy: cohort study.," *PLoS One*, 2013.
- [116] K. Kallianos, G. L. Moraes, and K. G. Ordovas, "Prognostic Role of MR Imaging in Nonischemic Myocardial Disease," *Magnetic Resonance Imaging Clinics of North America*. 2015.
- [117] A. Gulati *et al.*, "Association of fibrosis with mortality and sudden cardiac death in patients with nonischemic dilated cardiomyopathy.," *JAMA*, 2013.
- [118] L. T. Cooper *et al.*, "The role of endomyocardial biopsy in the management of cardiovascular disease: A scientific statement from the American Heart Association, the American College of Cardiology, and the European Society of Cardiology," *Circulation*. 2007.
- [119] C. S. Zuern *et al.*, "Cyclophilin A predicts clinical outcome in patients with congestive heart failure undergoing endomyocardial biopsy," *Eur. J. Heart Fail.*, 2013.
- [120] C. Basso, F. Calabrese, A. Angelini, E. Carturan, and G. Thiene, "Classification and histological, immunohistochemical, and molecular diagnosis of inflammatory myocardial disease," *Heart Fail. Rev.*, 2013.
- [121] K. Klingel *et al.*, "Pathogenesis of murine enterovirus myocarditis: virus dissemination and immune cell targets.," *J. Virol.*, 1996.
- [122] H. Mahrholdt *et al.*, "Presentation, patterns of myocardial damage, and clinical course of viral myocarditis," *Circulation*, 2006.
- [123] A. L. P. Caforio *et al.*, "Current state of knowledge on aetiology, diagnosis, management, and therapy of myocarditis: A position statement of the European Society of Cardiology Working Group on Myocardial and

- Pericardial Diseases,” *Eur. Heart J.*, 2013.
- [124] K. A. L. Mueller *et al.*, “Clinical and histopathological features of patients with systemic sclerosis undergoing endomyocardial biopsy,” *PLoS One*, 2015.
- [125] C. Lang *et al.*, “Connective tissue growth factor: A crucial cytokine-mediating cardiac fibrosis in ongoing enterovirus myocarditis,” *J. Mol. Med.*, 2008.
- [126] N. C. Riedemann *et al.*, “Increased C5a receptor expression in sepsis,” *J. Clin. Invest.*, 2002.
- [127] M. Christ *et al.*, “Heart failure epidemiology 2000–2013: insights from the German Federal Health Monitoring System,” *Eur. J. Heart Fail.*, 2016.
- [128] P. U. Gandhi and S. Pinney, “Management of chronic heart failure: Biomarkers, monitors, and disease management programs,” *Annals of Global Health*. 2014.
- [129] Q. Peng, K. Li, S. H. Sacks, and W. Zhou, “The role of anaphylatoxins C3a and C5a in regulating innate and adaptive immune responses.,” *Inflamm. Allergy Drug Targets*, 2009.
- [130] K. Li *et al.*, “Expression of complement components, receptors and regulators by human dendritic cells,” *Mol. Immunol.*, 2011.
- [131] A. Anzai *et al.*, “Regulatory role of dendritic cells in postinfarction healing and left ventricular remodeling,” *Circulation*, 2012.
- [132] A. Valaperti, M. Nishii, D. Germano, P. P. Liu, and U. Eriksson, “Vaccination with Flt3L-induced CD8⁺ dendritic cells prevents CD4⁺ T helper cell-mediated experimental autoimmune myocarditis,” *Vaccine*, 2013.
- [133] D. Lara-Astiaso *et al.*, “Complement anaphylatoxins C3a and C5a induce a failing regenerative program in cardiac resident cells. Evidence of a role for cardiac resident stem cells other than cardiomyocyte renewal,” *Springerplus*, 2012.
- [134] P. A. Roche and K. Furuta, “The ins and outs of MHC class II-mediated antigen processing and presentation,” *Nature Reviews Immunology*. 2015.
- [135] U. Eriksson *et al.*, “Interleukin-6-deficient mice resist development of autoimmune myocarditis associated with impaired upregulation of complement C3,” *Circulation*, vol. 107, no. 2, pp. 320–325, 2003.
- [136] B. P. Morgan and P. Gasque, “Extrahepatic complement biosynthesis: Where, when and why?,” *Clinical and Experimental Immunology*. 1997.
- [137] J.-H. Sheen *et al.*, “TLR-Induced Murine Dendritic Cell (DC) Activation

- Requires DC-Intrinsic Complement,” *J. Immunol.*, 2017.
- [138] K. Yasojima, K. S. Kilgore, R. A. Washington, B. R. Lucchesi, and P. L. McGeer, “Complement gene expression by rabbit heart: Upregulation by ischemia and reperfusion,” *Circ. Res.*, 1998.
- [139] M. A. Kroenke, T. J. Carlson, A. V. Andjelkovic, and B. M. Segal, “IL-12– and IL-23–modulated T cells induce distinct types of EAE based on histology, CNS chemokine profile, and response to cytokine inhibition,” *J. Exp. Med.*, 2008.
- [140] D. Luger *et al.*, “Either a Th17 or a Th1 effector response can drive autoimmunity: conditions of disease induction affect dominant effector category,” *J. Exp. Med.*, 2008.
- [141] U. Hofmann *et al.*, “Activation of CD4 + T lymphocytes improves wound healing and survival after experimental myocardial infarction in mice,” *Circulation*, 2012.
- [142] I. U. Schraufstatter, R. G. Discipio, M. Zhao, and S. K. Khaldoyanidi, “C3a and C5a are chemotactic factors for human mesenchymal stem cells, which cause prolonged ERK1/2 phosphorylation.,” *J. Immunol.*, 2009.
- [143] T. Gombos *et al.*, “Complement anaphylatoxin C3a as a novel independent prognostic marker in heart failure,” *Clin. Res. Cardiol.*, 2012.
- [144] P. Aukrust, A. Yndestad, T. Ueland, J. Kristian Damås, S. S. Frøland, and L. Gullestad, “The role of intravenous immunoglobulin in the treatment of chronic heart failure,” *Int. J. Cardiol.*, 2006.
- [145] A. Frey, G. Ertl, C. E. Angermann, U. Hofmann, S. Störk, and S. Frantz, “Complement C3c as a biomarker in heart failure,” *Mediators Inflamm.*, 2013.
- [146] R. J. Lohman *et al.*, “Exploiting a novel conformational switch to control innate immunity mediated by complement protein C3a,” *Nat. Commun.*, 2017.
- [147] R. A. Skidgel and E. G. Erdös, “Structure and function of human plasma carboxypeptidase N, the anaphylatoxin inactivator,” *International Immunopharmacology*. 2007.
- [148] M. Pye, A. P. Rae, and S. M. Cobbe, “Study of serum C-reactive protein concentration in cardiac failure.,” *Br. Heart J.*, 1990.
- [149] W. L. Roberts, R. Sedrick, L. Moulton, A. Spencer, and N. Rifai, “Evaluation of four automated high-sensitivity C-reactive protein methods: implications for clinical and epidemiological applications.,” *Clin. Chem.*, 2000.
- [150] J. P. Araújo *et al.*, “Prognostic Value of High-Sensitivity C-Reactive Protein in Heart Failure: A Systematic Review,” *Journal of Cardiac*

Failure. 2009.

- [151] N. Lamblin *et al.*, "High-sensitivity C-reactive protein: Potential adjunct for risk stratification in patients with stable congestive heart failure," *Eur. Heart J.*, 2005.
- [152] B. S. Ronnow *et al.*, "C-reactive protein predicts death in patients with non-ischemic cardiomyopathy," *Cardiology*, 2005.
- [153] T. Sadahiro *et al.*, "MRI and serum high-sensitivity C reactive protein predict long-term mortality in non-ischaemic cardiomyopathy.," *Open Hear.*, 2015.
- [154] K. Kaneko *et al.*, "C-Reactive protein in dilated cardiomyopathy.," *Cardiology*, 1999.
- [155] P. Lourenço *et al.*, "Higher C-reactive protein predicts worse prognosis in acute heart failure only in noninfected patients," *Clin. Cardiol.*, 2010.
- [156] I. Kindermann, M. Kindermann, R. Kandolf, and et al., "Predictors of outcome in patients with suspected myocarditis," *Circulation*, 2008.
- [157] K. Klingel, B. M. McManus, and R. Kandolf, "Enterovirus-infected immune cells of spleen and lymph nodes in the murine model of chronic myocarditis: a role in pathogenesis?," *Eur. Heart J.*, 1995.
- [158] H. J. F. Why *et al.*, "Clinical and prognostic significance of detection of enteroviral RNA in the myocardium of patients with myocarditis or dilated cardiomyopathy," *Circulation*, 1994.
- [159] R. A. Strikas, L. J. Anderson, and R. A. Parker, "Temporal and geographic patterns of isolates of nonpolio enterovirus in the united states, 1970-1983," *J. Infect. Dis.*, 1986.
- [160] J. P. Breinholt *et al.*, "Viral epidemiologic shift in inflammatory heart disease: The increasing involvement of parvovirus B19 in the myocardium of pediatric cardiac transplant patients," *J. Hear. Lung Transplant.*, 2010.
- [161] C. Panayiotou, J. Richter, S. Bashiardes, D. Koptides, C. Tryfonos, and C. Christodoulou, "Molecular epidemiology of influenza A virus infection in Cyprus in four consecutive seasons (2009 pandemic-2013)," *Epidemiol. Infect.*, 2014.
- [162] U. Kühl *et al.*, "Viral persistence in the myocardium is associated with progressive cardiac dysfunction," *Circulation*, 2005.
- [163] J.-C. Youn *et al.*, "Detailed pathologic evaluation on endomyocardial biopsy provides long-term prognostic information in patients with acute myocarditis," *Cardiovasc. Pathol.*, 2014.
- [164] A. Frustaci, M. Pieroni, and C. Chimenti, "The role of endomyocardial biopsy in the diagnosis of cardiomyopathies.," *Ital. Heart J.*, 2002.

- [165] C. Kawai, "From myocarditis to cardiomyopathy: Mechanisms of inflammation and cell death: Learning from the past for the future," *Circulation*. 1999.
- [166] S. Rutschow, J. Li, H. P. Schultheiss, and M. Pauschinger, "Myocardial proteases and matrix remodeling in inflammatory heart disease," *Cardiovascular Research*. 2006.
- [167] K. A. Mueller *et al.*, "Gremlin-1 identifies fibrosis and predicts adverse outcome in patients with heart failure undergoing endomyocardial biopsy," *J Card Fail*, 2013.

8. Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Klinik für Kardiologie und Kreislaufkrankungen (Innere Medizin III) am Universitätsklinikum Tübingen unter Betreuung von Prof. Dr. med. Harald Langer durchgeführt. Er hat die Arbeit betreut und das Manuskript korrigiert. Die Konzeption der Studie erfolgte durch Prof. Dr. med. Harald Langer. Die Erstellung der Datenbank sowie Einpflegen der Patientendaten und Laborwerte sowie Auswertung der klinischen Verläufe anhand der definierten Parameter wurde von Dr. med. Karin Müller und mir durchgeführt. Die Myokardschnitte färbte ich in Zusammenarbeit mit Manuela Sauter nach dem etablierten Protokoll. Die lichtmikroskopische Auswertung aller Myokardschnitte und Bestimmung der jeweiligen Zellzahlen führte ich durch. Den Hauptteil der Auswertung leistete Dr. med. Karin Müller. Vereinzelt erstellte ich eine orientierende statistische Auswertung und Signifikanzanalyse mittels Excel, exemplarisch dargestellt in den Abb. 1 B/C sowie Abb. 2 A-D. Die statistische Analyse mittels SPSS verantwortete Dr. med. Johannes Patzelt. Dr. med. Johannes Patzelt und Dr. med. Karin Müller verfassten das veröffentlichte Paper. Die enthaltenen Abbildungen wurden von Dr. med. Karin Müller erstellt. Diese wurden für die vorgelegte Dissertation entsprechend den Layout-Vorgaben von mir angepasst und übersetzt. Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben

9. Danksagung

Ganz besonders möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Harald Langer für die Überlassung des interessanten Themas und die intensive Betreuung bedanken. Trotz so mancher Rückschläge, insbesondere im experimentellen Teil der Arbeit, weiß ich es sehr zu schätzen, dass die Unterstützung bei der Doktorarbeit bis zur erfolgreichen Fertigstellung nie in Frage stand.

Besonderer Dank gilt auch Manuela Sauter. Ohne ihre jahrelange Unterstützung wäre eine Fortführung und Komplettierung der Arbeit nach Beginn der Facharztweiterbildung in Stuttgart nur sehr schwer möglich gewesen.

Allen weiteren Mitarbeitern der AG Cardioimmunology möchte ich für die hervorragende Zusammenarbeit und kontinuierliche Unterstützung danken. Nicht zuletzt war auch der sehr kollegiale Umgang in der Arbeitsgruppe ein wichtiger Motivationsfaktor. Namentlich erwähnen möchte ich Sarah Gekeler, Frederic Emschermann sowie Dr. Marcus Olbrich.