

Aus dem  
Department für Diagnostische Labormedizin der Universität  
Tübingen

Institut für Pathologie und Neuropathologie

Abteilung Allgemeine und Molekulare Pathologie und  
Pathologische Anatomie

**Expression von PD1 und PD-L1 in entzündlichen  
Herzerkrankungen**

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

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

**vorgelegt von  
Schönleber, Sarah**

**2023**

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professorin Dr. K. Klingel

2. Berichterstatter: Professor Dr. J. Henes

Tag der Disputation: 30.05.2022

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	Myokarditiden .....	1
1.1.1	Definition und Ätiologie .....	1
1.1.1.1	Klinisch-pathologische Klassifikation.....	3
1.1.2	Diagnose von Myokarditiden .....	4
1.1.2.1	Histologische Klassifikation.....	4
1.1.2.2	Lymphozytäre Myokarditis .....	6
1.1.2.3	Eosinophile Myokarditis .....	6
1.1.2.4	Riesenzellmyokarditis .....	6
1.1.2.5	Granulomatöse Myokarditis .....	7
1.1.3	Myokarditis in Folge einer Checkpointinhibitoren-Therapie .....	7
1.2	Abstoßungsreaktionen nach Herztransplantation .....	9
1.2.1	Allgemeine Grundlagen von Abstoßungsreaktionen .....	9
1.2.2	Diagnose von Abstoßungsreaktionen .....	11
1.2.3	Zusammenhang von Abstoßungsreaktionen und einer Checkpointinhibitoren-Therapie.....	11
1.3	Entzündung .....	12
1.3.1	Zelluläre Immunantwort in Myokarditiden .....	13
1.3.2	Regulation und Immunmodulation im Myokard durch den PD1- PD-L1-Signalweg .....	18
1.4	Zielsetzung .....	24
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>25</b>
2.1	Endomyokardbiopsien .....	25
2.2	Histologische Untersuchungen.....	25
2.3	Immunhistochemische Färbungen .....	25

2.4	Molekularbiologische Erregerdiagnostik.....	27
2.5	Auswertung immunhistochemischer Färbungen.....	27
2.6	Klinische Parameter.....	29
2.6.1	Erkrankungsdauer.....	29
2.6.2	Ejektionsfraktion.....	29
2.7	Patientenkollektiv .....	29
2.7.1	Patienten .....	29
2.7.2	Kontrollgruppen.....	30
2.8	Statistik.....	30
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>33</b>
3.1	Zusammensetzung der Stichprobe .....	33
3.2	Untersuchung bei Patienten mit Myokarditis .....	34
3.2.1	Charakteristika des untersuchten Kollektivs - Alter und Geschlecht.....	34
3.2.2	Expression von CD3, CD68, PD1 und PD-L1 in Myokarditiden .....	40
3.2.3	Einflussfaktoren auf den PD1-Score bei Patienten mit Myokarditis .....	59
3.2.3.1	Einflussfaktoren auf den PD1-Score bei Patienten mit akuten und chronischen Myokarditiden und der Kontrollgruppe .....	59
3.2.3.2	Einflussfaktoren auf den PD1-Score bei Patienten mit akuter lymphozytärer Myokarditis, akuter eosinophiler Myokarditis und Riesenzellmyokarditis .....	61
3.2.3.3	Einflussfaktoren auf den PD1-Score bei Patienten mit chronischer lymphozytärer Myokarditis .....	61
3.2.4	Einflussfaktoren auf den PD-L1-Score bei Patienten mit Myokarditis .....	61
3.2.4.1	Einflussfaktoren auf den PD-L1-Score bei Patienten mit	

akuten und chronischen Myokarditiden und der Kontrollgruppe .....	61
3.2.4.2 Einflussfaktoren auf den PD-L1-Score bei Patienten mit akuter lymphozytärer Myokarditis, akuter eosinophiler Myokarditis und Riesenzellmyokarditis .....	62
3.2.4.3 Einflussfaktoren auf den PD-L1-Score bei Patienten mit chronischer lymphozytärer Myokarditis .....	62
3.3 Untersuchung bei Patienten nach Herztransplantation .....	64
3.3.1 Charakteristika des untersuchten Kollektivs - Alter und Geschlecht.....	64
3.3.2 Expression von PD1 und PD-L1 im Myokard bei Patienten nach Herztransplantation .....	67
3.3.3 Einflussfaktoren auf den PD1-Score bei Patienten nach Herztransplantation .....	75
3.3.4 Einflussfaktoren auf den PD-L1-Score bei Patienten nach Herztransplantation .....	77
<b>4 Diskussion .....</b>	<b>79</b>
4.1 Expression von PD1 und PD-L1 in Patienten mit Myokarditiden und in Patienten nach Herztransplantation .....	79
4.2 Zusammenhang von PD1- und PD-L1-Score bei Patienten mit Myokarditiden und Patienten nach Herztransplantation .....	84
4.3 Zusammenhang des CD3-Scores und des CD68-Scores mit dem PD1- und PD-L1-Score .....	85
4.4 Einflussfaktoren auf die PD1- und PD-L1-Expression bei Myokarditiden und Patienten nach Herztransplantation .....	86
4.5 Klinische Bedeutung der PD1- und PD-L1-Expression in Myokarditiden und Abstoßungsreaktionen.....	90
<b>5 Zusammenfassung .....</b>	<b>95</b>

<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>99</b>
<b>7</b>	<b>Erklärung zum Eigenanteil .....</b>	<b>113</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>114</b>

### **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Ätiologie von Myokarditiden .....	2
Tabelle 2: Klassifikation von Myokarditiden .....	5
Tabelle 3: Immunhistochemische Färbungen .....	26
Tabelle 4: Korrelation von PD1- und PD-L1-Score in Myokarditiden .....	57
Tabelle 5: Einflussfaktoren auf akute und chronische Myokarditiden und die Kontrollgruppe - PD1-Score .....	60
Tabelle 6: Einflussfaktoren auf akute und chronische Myokarditiden und die Kontrollgruppe - PD-L1-Score .....	63
Tabelle 7: Korrelation von PD1- und PD-L1-Score bei Patienten nach Herztransplantation .....	74
Tabelle 8: Einflussfaktoren auf Patienten nach Herztransplantation - PD1- Score .....	75
Tabelle 9: Einflussfaktoren auf Patienten nach Herztransplantation - PD-L1- Score .....	78

## **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Zusammensetzung der Stichprobe .....	33
Abbildung 2: Nachweis von Nukleinsäuren kardiotoxischer Erreger im Myokard bei Myokarditispatienten und Kontrollpatienten.....	39
Abbildung 3: Nachweis von Nukleinsäuren kardiotoxischer Erreger im Blut bei Myokarditispatienten und Kontrollpatienten.....	40
Abbildung 4: Akute lymphozytäre Myokarditis; Originalvergrößerung x 200.....	42
Abbildung 5: Akute eosinophile Myokarditis; Originalvergrößerung x 200.....	44
Abbildung 6: Riesenzellmyokarditis; Originalvergrößerung x 200 .....	46
Abbildung 7: Chronische lymphozytäre Myokarditis; Originalvergrößerung x 200 .....	48
Abbildung 8: Dilatative Kardiomyopathie; Originalvergrößerung x 200.....	50
Abbildung 9: CD3-Score bei Myokarditispatienten und Kontrollpatienten .....	52
Abbildung 10: CD68-Score bei Myokarditispatienten und Kontrollpatienten .....	52
Abbildung 11: PD1-Score bei Myokarditispatienten und Kontrollpatienten.....	54
Abbildung 12: PD-L1-Score bei Myokarditispatienten und Kontrollpatienten .....	56
Abbildung 13: Korrelation von PD1- und PD-L1-Score bei Myokarditispatienten und Kontrollpatienten .....	58
Abbildung 14: Nachweis von Nukleinsäuren kardiotoxischer Erreger im Myokard bei Patienten nach Herztransplantation .....	66
Abbildung 15: Nachweis von Nukleinsäuren kardiotoxischer Erreger im Blut bei Patienten nach Herztransplantation.....	67
Abbildung 16: Akute zelluläre Abstoßungsreaktion Grad 2R; Originalvergrößerung x 200.....	69
Abbildung 17: PD1-Score bei Patienten mit akuter zellulärer Abstoßungsreaktion Grad 2R und Kontrollpatienten .....	71

Abbildung 18: Biopsie nach Herztransplantation ohne Abstoßungsreaktion entsprechend Grad 0R; Originalvergrößerung x 200.....	72
Abbildung 19: PD-L1-Score bei Patienten mit akuter zellulärer Abstoßungs- reaktion Grad 2R und Kontrollpatienten .....	73
Abbildung 20: Korrelation von PD1- und PD-L1-Score bei Patienten mit akuter zellulärer Abstoßungsreaktion Grad 2R und Kontrollpatienten.....	74

## Abkürzungsverzeichnis

AP1	Activator Protein 1
BALB/c-	Spezielle Albinomäuse, vor allem in der Krebsforschung eingesetzt
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BID	BH3-interaction Domain Death Agonist
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
C3	Komplementfaktor C3
CCL3	Chemokine (C -C Motif) Ligand 3
CD	Cluster of Differentiation
CTLA4	zytotoxisches T-Zell-assoziiertes Protein 4
DAB	Diaminobenzidintetrahydrochlorid
DAMPs	Damage-associated Molecular Patterns
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EBV	Epstein-Barr-Virus
EGF	Epidermal Growth Factor
EPO	Erythropoetin
FoxP3	Forkhead-Box-Protein P3
hCMV	Humanes Cytomegalievirus
HE	Hämatoxylin-Eosin
HHV6	Humanes Herpesvirus 6
HHV7	Humanes Herpesvirus 7
HLA-I	Humanes Leukozytenantigen Klasse I
HLA-II	Humanes Leukozytenantigen Klasse II
HLA-DQ8	Humanes Leukozytenantigen Serogruppe DQ8
HSV-1	Herpes Simplex Virus
HTX	Herztransplantation
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule 1
ICD-10	Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme
IFN- $\alpha$	Interferon $\alpha$

IFN- $\beta$	Interferon $\beta$
IFN- $\gamma$	Interferon $\gamma$
Ig	Immunglobulin
ISHLT	International Society for Heart and Lung Transplantation
ITAM	Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif
ITSM	Immunoreceptor Tyrosine-based Switch Motif
JAK-STAT	Januskinase-Signal Transducers and Activators of Transcription
KK	Kontingenzkoeffizient
Lag-3	Lymphozyten-Aktivierungsgen 3
LCMV	Lymphozytäres Choriomeningitis Virus
LMP1	Latentes Membranprotein 1
LVEF	Linksventrikuläre Ejektionsfraktion
M1	Klassisch-aktivierte Makrophagen
M2	Alternativ-aktivierte Makrophagen
MRL-Faslpr	Mausstamm mit übermäßigem Wachstum der lymphoiden Organe
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
mTOR	Mechanistic Target of Rapamycin
mTORC1	Mammalian Target of Rapamycin Complex 1
mTORC2	Mammalian Target of Rapamycin Complex 2
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NF- $\kappa$ B	Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer of Activated Bcells
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NK-T-Zellen	Natürliche Killer-T-Zellen
PAMPs	Pathogen-associated Molecular Patterns
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PD1	Programmed Cell Death Protein 1
PDK1	Phosphoinositide-dependent Kinase 1
PD-L1	Programmed Cell Death 1 Ligand 1
PD-L2	Programmed Cell Death 1 Ligand 2
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat

PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PRAS40	Proline-rich Akt Substrate
PVB19	Parvovirus B19
Raptor	Regulatory Associated Protein of mTOR
RNA	Ribonukleinsäure
RNAlater	Ribonukleinsäure-stabilisierendes Medium
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
(RT-)PCR	(Reverse Transkriptase-) Polymerase-Kettenreaktion
SHP2	Src Homology Region 2 Domain-containing Phosphatase-2
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
SREBP	Sterol Regulatory Element-Binding Protein
S6K1	Ribosomale Protein S6 Kinase Beta-1
Tex	Exhausted T-cells
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor $\beta$
TH1	T-Helferzellen Typ 1
TH2	T-Helferzellen Typ 2
TH17	T-Helferzellen Typ 17
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
Treg	Regulatorische T-Zelle
TSC1/2	Tuberous Sclerosis Protein
WHF	World Heart Federation
WHO	World Health Organization
ZAP-70	Zeta-Ketten-assoziierte Proteinkinase 70

# 1 Einleitung

## 1.1 Myokarditiden

### 1.1.1 Definition und Ätiologie

Im Jahr 1995 definierten die World Health Organization sowie die heute als World Heart Federation bekannte International Society and Federation of Cardiology den Begriff der Myokarditis wie folgt: *„Myocarditis is an inflammatory disease of the myocardium and is diagnosed by established histological, immunological, and immunohistochemical criteria.“* (Nordet et al., 1996). Myokarditiden werden den erworbenen primären Kardiomyopathien zugeordnet (Maron et al., 2006). Akute Myokarditiden gehen in 21% der Fälle in eine dilatative Kardiomyopathie, kurz DCM, über, welche durch Ventrikeldilatation gekennzeichnet ist (D'Ambrosio et al., 2001). Die Ventrikeldilatation kann mit verminderter Kontraktionsfähigkeit des Herzens und einer reduzierten Auswurfleistung einhergehen (Sagar et al., 2012, Nordet et al., 1996, Michels and Kochanek, 2010). Die eingeschränkte Kontraktionsfähigkeit bei DCM wird hierbei nicht auf ein akutes ischämisches Ereignis, einen Perikarderguss oder eine arterielle Hypertonie zurückgeführt (Caforio et al., 2013). Noxen, Herzklappendefekte, Unterernährung oder vergangene Infarkte stellen weitere Ursachen einer DCM dar. Myokarditiden können infektiöser oder nicht-infektiöser Genese sein. Mögliche Ursachen von Myokarditiden sind in Tabelle 1 dargestellt. Hierbei gelten virale Myokarditiden in der westlichen Welt als häufigste Form der infektiösen Herzmuskelentzündungen. Seit Beginn des 21. Jahrhunderts sind Parvovirus B19 und humanes Herpesvirus 6 die häufigsten in Myokarditiden nachgewiesenen viralen Erreger (Mahrholdt et al., 2006). Für die Myokarditis können insgesamt keine genauen Prävalenzen angegeben werden, da ein Großteil unentdeckt bleibt und spontan wieder abheilt (Leone et al., 2011). Die Inzidenz der Myokarditis wurde jedoch im Jahr 2013 auf weltweit 1,5 Millionen Fälle geschätzt (Global Burden of Disease Study, 2015).

**Tabelle 1: Ätiologie von Myokarditiden**

<p>Infektiös</p>	<p>Viren: Adenoviren, Arboviren, Arenaviren, Echoviren, Enteroviren (z.B. Coxsackieviren), Enzephalomyokarditisvirus, Herpesviren (Humanes Cytomegalievirus, Epstein-Barr-Virus, Humanes Herpesvirus 6, Varizella Zoster Virus), Hepatitis C Virus, Humanes Immundefizienz-Virus (HIV), Influenza A Virus, Influenza B Virus, Mumpsvirus, Parvovirus B19, Poliovirus, Rabiesvirus, Respiratorisches Synzytialvirus, Rubellavirus, Rubeolavirus, Vacciniavirus, Variolavirus</p> <p>Bakterien: Actinomyzeten, Brucella, Chlamydien, Chlamydophila psittaci, Corynebacterium diphtheria, Clostridien, Francisella, Haemophilus, Legionellen, Mycobacterium tuberculosis, Mykoplasmen, Neisseria gonorrhoeae, Neisseria meningitidis, Salmonellen, Staphylokokken, <math>\beta</math>-hämolysierende Streptokokken der Gruppe A, Streptococcus pneumoniae, Tropheryma whipplei</p> <p>Pilze: Aspergillus, Blastomyzeten, Candida, Coccidioides, Cryptococcus, Histoplasma, Nocardia, Sporothrix</p> <p>Helminthen: Echinococcus granulosus, Schistosoma, Toxocara, Trichinella spiralis, Zystizerkus</p> <p>Protozoen: Entamoeba histolytica, Leishmanien, Toxoplasma gondii, Trypanosoma cruzi</p> <p>Rickettsien: Coxiella burnetii, Rickettsia typhi</p> <p>Spirochäten: Borrelia spp., Leptospiren, Treponema pallidum</p>
<p>Autoimmun-</p>	<p>Churg-Strauss Syndrom, Colitis ulcerosa, Dermatomyositis, Hypereosinophiles Syndrom, Kawasaki-Syndrom, Lupus erythematoses, Morbus Crohn, Rheumatoide Arthritis, Sarkoidose, Sklerodermie, Zöliakie</p>
<p>Drogeninduzierte Hypersensitivitätsreaktionen</p>	<p>Ampicillin, Cephalosporine, Tetracycline, Sulfonamide, Antiphlogistika, Benzodiazepine, Clozapin, Methyldopa, Penicillin, Pockenimpfung, Schleifendiuretika, Tetanusimpfung, Thiazide, Trizyklische Antidepressiva</p>
<p>Toxisch</p>	<p>Amphetamine, Anthracycline, Katecholamine, Kokain, Cyclophosphamid, Ethanol, 5-Fluorouracil, Phenytoin, Tastuzumab</p>
<p>Weitere</p>	<p>Arsen, Kupfer, Eisen, Radiotherapie, Thyreotoxische Krise</p>

(Kindermann et al., 2012, Dennert et al., 2008)

#### 1.1.1.1 Klinisch-pathologische Klassifikation

Symptome einer Myokarditis sind Brustschmerzen, Arrhythmien oder ein kardiogener Schock. Eine schwerverlaufende Myokarditis kann zum akuten oder chronischen Herzversagen führen. 8,6% der an plötzlichem Herztod verstorbenen Menschen, bei denen bereits eine ischämische Ursache ausgeschlossen wurde, wiesen eine Myokarditis oder eine kardiale Sarkoidose auf, die meisten Patienten mit Myokarditis waren unter 35 Jahre alt (Fabre and Sheppard, 2006). Der Großteil der Myokarditiden verläuft jedoch asymptomatisch (Kindermann et al., 2012, Maisch and Alter, 2018). Unter klinischen Gesichtspunkten lassen sich fulminante, akute und chronische Myokarditiden unterscheiden. Die fulminante Myokarditis ist eine akut einsetzende, lebensbedrohliche Myokarditis, bei der häufig Arrhythmien und akutes Herzversagen auftreten (Maisch and Alter, 2018). Im Myokard finden sich über 50 infiltrierende Zellen des Immunsystems pro mm<sup>2</sup> und Myozytennekrosen (Maisch and Alter, 2018). Im Rahmen einer akuten Myokarditis zeigen die Patienten häufig ein plötzliches Herzversagen, teils begleitet von einem Perikarderguss. Im Vergleich zur fulminanten Myokarditis tritt bei einer akuten Myokarditis keine hämodynamische Instabilität des Patienten auf, beziehungsweise kann diese mit geringen Dosen von Vasopressoren behoben werden (McCarthy et al., 2000). Patienten mit akuten Myokarditiden zeigten jedoch im Vergleich zu Patienten mit fulminanten Myokarditiden ein höheres Risiko im Verlauf transplantationspflichtig zu werden oder an der Erkrankung zu versterben (McCarthy et al., 2000). Patienten mit chronischer Myokarditis weisen meist einen dilatierten linken Ventrikel mit variabler Ejektionsfraktion auf, häufig tritt zudem ein chronisches Herzversagen, teils zusammen mit einem Perikarderguss, auf (Maisch and Alter, 2018).

### **1.1.2 Diagnose von Myokarditiden**

Die Diagnose einer Myokarditis kann durch Echokardiografie, kardiale Magnetresonanztomographie, Elektrokardiographie und Erhöhung der Serumspiegel kardialer Enzyme gestützt werden (Schultz et al., 2009). Als Goldstandard zur Diagnose einer Myokarditis gilt die histologische Diagnose nach Endomyokard- biopsie (Guglin and Nallamshetty, 2012).

#### 1.1.2.1 Histologische Klassifikation

Für die histologische Klassifikation verwendet man die 1987 von Aretz et al. publizierte Dallas-Klassifikation, welche 1999 von der World Heart Federation um immunhistologische Kriterien ergänzt wurde. Tabelle 2 fasst diese Klassifikations- systeme zusammen und zeigt die damit korrespondierende Kodierung nach ICD-10. Die in der WHF-Klassifikation neu definierte inflammatorische Kardiomyopathie bezeichnet hierbei eine histologisch gesicherte chronische Myokarditis, welche sich klinisch in einer eingeschränkten Herzfunktion manifestiert (Balletshofer et al., 2006, Caforio et al., 2013).

Für die Diagnose einer Myokarditis ist ein entzündliches Infiltrat aus mindestens 14 Leukozyten mit  $\geq 7$  T-Zellen/mm<sup>2</sup> obligat, wobei bis zu 4 Makrophagen enthalten sein können. Die infiltrierenden Immunzellen können fokal, diffus oder konfluierend angeordnet sein (Maisch, 1999, Aretz et al., 1986). Die Ausprägung wird qualitativ in mild, moderat und schwer unterteilt (Aretz et al., 1986).

**Tabelle 2: Klassifikation von Myokarditiden**

	Dallas-Klassifikation	WHF –Klassifikation	ICD-10
Akute, aktive Myokarditis	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Entzündliches Infiltrat</li> <li>- Myozytolyse</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Entzündliches Infiltrat von <math>\geq 14</math> Leukozyten/mm<sup>2</sup> (bis zu 4 Makrophagen/mm<sup>2</sup> und <math>\geq 7</math> T-Zellen/mm<sup>2</sup>)</li> <li>- Monoklonale Antikörper</li> <li>- Immunglobulin und Komplementfixation (IgM, C3)</li> </ul>	<p>I40.0</p> <p>I40.1</p> <p>I40.8</p> <p>I40.9</p>
Persistierende, „ongoing“ Myokarditis	<p>In der zweiten Biopsie</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Entzündliches Infiltrat</li> <li>- Myozytolyse</li> </ul>	<p>In der zweiten Biopsie</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Wie akute Myokarditis plus</li> <li>- Expression von HLA-I und HLA-II</li> <li>- ICAM</li> </ul>	I51.4
Abheilende Myokarditis	<p>In der zweiten Biopsie</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- rückläufiges Infiltrat</li> <li>- reparative Fibrose</li> <li>- fakultative Myozytolyse</li> </ul>	<p>In der zweiten Biopsie</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- rückläufiges entzündliches Infiltrat</li> <li>- Rückläufige Expression von HLA-I und HLA-II</li> </ul>	I51.4
Borderline-Myokarditis	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Entzündliches Infiltrat</li> <li>- keine Myozytolyse</li> <li>- Überprüfung in zweiter Biopsie bei klinischem Verdacht auf Myokarditis</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <math>\geq 14</math> Leukozyten/mm<sup>2</sup></li> </ul>	I51.4
Chronische Myokarditis, inflammatorische Kardiomyopathie	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Nicht definiert</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <math>\geq 14</math> Leukozyten</li> <li>- Immunglobulin-Komplementfixation</li> </ul>	I51.4

(Aretz et al., 1986, Michels and Kochanek, 2010, Graubner, 2018, Caforio et al., 2013, Maisch et al., 2000)

#### 1.1.2.2 Lymphozytäre Myokarditis

In über der Hälfte aller Biopsien mit der Diagnose einer Myokarditis findet sich ein lymphozytäres Infiltrat (Magnani et al., 2006). Lymphozytäre Myokarditiden werden bei viral bedingten Myokarditiden beobachtet. Lymphozytäre Myokarditiden können jedoch auch bei Noxeneinwirkung, Kollagenosen, Vaskulitiden, Sarkoidose oder beim Kawasaki-Syndrom beobachtet werden. Entzündungsreaktionen, welche zusätzlich zu Lymphozyten neutrophile Granulozyten enthalten, weisen auf eine bakteriell bedingte Myokarditis hin (Aretz et al., 1986).

#### 1.1.2.3 Eosinophile Myokarditis

Eosinophile Myokarditiden treten bei Löffler Endomyokarditis, Hypersensitivitätsreaktionen und parasitären Infektionen auf (Aretz et al., 1986). Kardiale Entzündungen in Folge einer Hypersensitivitätsreaktion betreffen meist alle kardialen Schichten und beschränken sich nicht auf das Myokard allein; man spricht hierbei von einer Pankarditis (Leone et al., 2011).

#### 1.1.2.4 Riesenzellmyokarditis

Die relativ selten vorkommende Riesenzellmyokarditis ist eine meist fulminant verlaufende, lebensbedrohliche Herzmuskelentzündung, welche in über 75 Prozent der Fälle zu einer schnell fortschreitenden Herzinsuffizienz führt (Xu and Brooks, 2016, Seif et al., 2017). Meist betrifft die Riesenzellmyokarditis junge, gesunde Erwachsene (Xu and Brooks, 2016). Histologisch entsprechen Riesenzellen stark vergrößerten, mehrkernigen CD68-positiven Makrophagen (Xu and Brooks, 2016). Die Ursachen der Riesenzellmyokarditis sind weitestgehend unklar. Neben einer „idiopathischen“ Riesenzellmyokarditis, welche meist mit Autoimmunerkrankungen assoziiert ist, sind weitere Erkrankungen bekannt, die zu einer sekundären Riesenzellmyokarditis führen können (Davidoff et al., 1991).

Hierzu zählen infektiöse Endokarditiden, rheumatoide Arthritis, Wegener Granulomatose, Takayasu Arteriitis, Tuberkulose, Pilzinfektionen wie Kokzidioidomykose oder Kryptokokkose und Syphilis (Davidoff et al., 1991). Auch bei der kardialen Manifestation einer Sarkoidose und bei Hypersensitivitätsreaktionen werden Riesenzellen beobachtet, wobei diese Erkrankungen von der Riesenzellmyokarditis histologisch und immunhistologisch unterschieden werden können (Magnani and Dec, 2006). Die Prognose der Riesenzellmyokarditis variiert je nach Therapiebeginn, eine Therapie mit Immunsuppressiva erhöht die mittlere Überlebenszeit von drei auf zwölf Monate (Kindermann et al., 2012). Nach Absetzen der immunsupprimierenden Therapie kann es jedoch teilweise zu fatalen Rückfällen kommen (Kindermann et al., 2012).

#### 1.1.2.5 Granulomatöse Myokarditis

Bei einer granulomatösen Myokarditis zeigen sich granulomartig angeordnete Infiltrate bestehend aus Lymphozyten und Makrophagen. Die granulomatöse Myokarditis tritt häufig als kardiale Mitbeteiligung einer Sarkoidose oder bei rheumatoider Arthritis auf (Dominguez et al., 2016).

#### **1.1.3 Myokarditis in Folge einer Checkpointinhibitoren-Therapie**

In den letzten Jahren konnten auf dem Gebiet der Onkologie dank neuer Forschung zur Hemmung negativer Immunreaktionen mit Hilfe von Checkpointinhibitoren wie Pembrolizumab große Erfolge, vor allem in der Melanomtherapie und bei Nicht- kleinzelligen-Lungenkarzinomen, verzeichnet werden. Checkpointinhibitoren sind monoklonale Antikörper, die den Signalweg PD1-PD-L1/2 blockieren und es dem Immunsystem so ermöglichen, gegen Tumorzellen aktiv zu werden. Die Tumorzellen können die körpereigene Immunantwort nicht mehr herunterregulieren und werden von CD8-positiven T-Zellen in Apoptose getrieben. Die Entdeckung dieses Mechanismus wurde mitunter durch den

Medizinnobelpreis im Jahr 2018 geehrt, jedoch stellt sie Mediziner auch vor weitere Herausforderungen. Eine Arbeit von Mahmood et al. zeigte, dass 1,14% aller mit Checkpointinhibitoren behandelten Patienten innerhalb der ersten 21-75 Tage (Median 34 Tage) eine lymphozytäre Myokarditis entwickelten. Patienten unter anti-CTLA4-Therapie wiesen am häufigsten Myokarditiden auf (3,3%). Die alleinige Therapie mit PD-L1-Antikörpern wie Avelumab führte in 2,4% der Patienten zu einer Myokarditis, ebenso eine zeitgleiche Therapie mit PD1- und CTLA4-Antikörpern. Unter Therapie mit PD-L1- sowie CTLA4- Antikörpern konnte in 1%, unter Monotherapie mit PD1-Antikörpern in 0,5% der Fälle eine Myokarditis beobachtet werden (Mahmood et al., 2018). Andere Studien zeigten, dass das Risiko einer Myokarditis bei Kombinationstherapie von Nivolumab und Ipilimumab gegenüber einer Monotherapie mit Nivolumab stark erhöht war (Johnson et al., 2016). In einer Studie von Javid J. Moslehi et al. verliefen 47% der durch Checkpointinhibitoren ausgelösten Myokarditiden tödlich, 67% aller Patienten mit Myokarditis erhielten eine Kombinationstherapie mit PD1- oder PD-L1- Antikörpern zusammen mit CTLA4-Antikörpern. Unter Monotherapie mit PD1- oder PD-L1-Antikörpern verstarben 37% der Patienten. Unter Monotherapie mit dem CTLA4-Antikörper Ipilimumab kam es zu 60% an Todesfällen (Moslehi et al., 2018), Escudier et al. berichten dagegen von 27% Letalität bei Checkpointinhibitor- assoziierten Myokarditiden, auch hier wurde die höchste Mortalität von 57% unter Kombinationstherapie mit Ipilimumab und Nivolumab, sprich CTLA4- und PD1- Antikörper Kombinationstherapie, beobachtet. Als Todesursachen wurden refraktäre ventrikuläre Arrhythmien, Herzversagen, Lungenarterienembolien, Erregungs- leitungsstörungen und plötzlicher Tod beschrieben (Escudier et al., 2017). Der zu Grunde liegende Mechanismus der Entstehung von Myokarditiden unter Checkpointinhibitoren-Therapie ist bislang nicht verstanden. In einem post mortem untersuchten Patienten wurde im Myokard und in der Skelettmuskulatur eine hohe Zahl monoklonaler CD3-positiver T-Zellen identifiziert, woraufhin die

Hypothese aufgestellt wurde, dass Myozyten, Skelettmuskelzellen sowie manche Tumorzellen ein identisches beziehungsweise ähnliches Protein exprimieren könnten, gegen welches ein T-Zell-Klon gerichtet sein könnte (Johnson et al., 2016). Durch die Inhibierung der T-Zell-Rückkopplung würde das körpereigene Immunsystem sowohl die Tumorzellen als auch die Myozyten angreifen (Johnson et al., 2016). Ein Zusammenhang mit einem oder mehreren spezifischen HLA-Typen wurde bislang nicht beschrieben (Johnson et al., 2016). Mögliche Risikofaktoren einer Checkpointinhibitor-induzierten Myokarditis sind Diabetes mellitus, ein erhöhter Body Mass Index sowie das obstruktive Schlafapnoe-Syndrom (Mahmood et al., 2018). Patienten, die innerhalb der letzten 6 Monate vor Start der Checkpointinhibitoren- Therapie oder während dieser gegen Influenza geimpft wurden, entwickelten prozentual seltener eine Myokarditis als Patienten ohne Impfung und auch bei auftretender Myokarditis war der Troponin-I-Spiegel dreifach niedriger als bei ungeimpften Patienten (Awadalla et al., 2019).

## **1.2 Abstoßungsreaktionen nach Herztransplantation**

### **1.2.1 Allgemeine Grundlagen von Abstoßungsreaktionen**

Man kann hyperakute, akute und chronische Abstoßungsreaktionen unterscheiden. Bei einer hyperakuten Abstoßungsreaktion hatte der Transplantatempfänger bereits vor Transplantation Antikörper gegen einen Bestandteil des Transplantats. Diese Antikörper führen innerhalb von Minuten bis Stunden zur Aktivierung des Komplementsystems und Ausschüttung von von-Willebrand-Faktor; eine Thrombose mit Transplantatnekrose ist die Folge, das Transplantat muss entfernt werden. Die akute Abstoßungsreaktion tritt nach einer Woche bis mehrere Monate später auf. Sie kann in akute zelluläre und akute humorale Abstoßungsreaktionen unterteilt werden. Die humorale Abstoßungsreaktion wird durch Antikörper verursacht, welche in fast allen Patienten mit Abstoßungsreaktion gefunden werden können (Harmer et

al., 1995, Moreau et al., 2013, Terasaki, 2003). Hinsichtlich der geringen Anzahl durchgeführter Herztransplantationen gibt es wenige therapeutische Studien zur Behandlung von akuten zellulären Abstoßungsreaktionen. Auf Grund der Studienlage zu Therapieoptionen nach Nierentransplantatabstoßung werden auch bei akuten zellulären Abstoßungsreaktionen Kortikosteroide, Plasmapherese, intravenöse Immunglobuline und Biologika wie Rituximab eingesetzt. Zudem erfolgt eine symptomatische Herzinsuffizienztherapie (Colvin et al., 2015).

Bei der zellulären Abstoßungsreaktion erkennen CD8-positive T-Zellen Oberflächenproteine des Transplantats als fremd und treiben die Zellen mit Perforin und Granzymen in die Apoptose (Moreau et al., 2013). Zur Therapie der zellulären Abstoßung werden Steroide und die Anti-T-Zell-Antikörper Basiliximab und Muromonab-CD3 eingesetzt (Ludhwani, 2020).

Chronische Abstoßungsreaktionen haben eine zelluläre sowie eine humorale Komponente und stellen den größten Teil der Abstoßungsreaktionen dar. Hierbei führen chronische vaskuläre Entzündungen zur Minderversorgung des Transplantats und zur Abstoßung (Becker et al., 2016, Moreau et al., 2013).

Nachdem die erste erfolgreiche Herztransplantation bereits 1967 durchgeführt wurde, wurden im Jahr 2015 laut ISHLT nur insgesamt 5074 Herztransplantationen weltweit durchgeführt. Verstarb der erste transplantierte Patient bereits nach nur wenigen Tagen, so lag die 1-Jahres-Überlebensrate einer Kohorte, welche zwischen 2006 und Juni 2012 ihr Herztransplantat erhielt, bei 84-85% (Lund et al., 2014). Trotz immunsuppressiver Therapie kommt es im Anschluss auch heute noch oft zu akuten Abstoßungsreaktionen. Abstoßungsreaktionen äußern sich durch Dyspnoe, Appetitlosigkeit, Gewichtszunahme, Palpitationen, neu aufgetretene Arrhythmien, Oligurie, Hypotension und weitere Zeichen der Herzinsuffizienz wie Ödeme oder gestaute Jugularvenen (Ludhwani, 2020). Insgesamt versterben bis zu 11% der Patienten innerhalb der

ersten 3 Jahre an einer akuten Abstoßungsreaktion (Ludhwani, 2020).

### **1.2.2 Diagnose von Abstoßungsreaktionen**

Nach den Leitlinien der ISHLT können akute zelluläre Abstoßungsreaktionen in folgende Schweregrade unterteilt werden (Stewart et al., 2005):

- Grad 0: keine Abstoßungsreaktion
- Grad 1R: milde Abstoßungsreaktion, histologisch interstitielle und/oder perivaskuläre Infiltrate mit bis zu einem mononukleären Zellherd mit Myozytenuntergang
- Grad 2R: moderate Abstoßungsreaktion, zwei oder mehr Infiltratherde mit assoziiertem Myozytenuntergang, eosinophile Granulozyten können vorhanden sein
- Grad 3R: schwere Abstoßungsreaktion, diffuse, teils polymorphe Infiltrate mit multifokalem Myozytenuntergang, teils mit Ödemen, Hämorrhagien oder Vaskulitis

In dieser Arbeit wurde ausschließlich die PD1-/PD-L1-Expression von Abstoßungsreaktionen Grad 2R betrachtet, da das zelluläre Infiltrat bei Grad 1R zu gering ist, um eine Aussage über die PD1- und PD-L1-Expression treffen zu können. Es wurden keine Biopsien Grad 3R untersucht, da diese kaum auftreten und zu wenige Präparate mit akuten zellulären Abstoßungsreaktionen des Grads 3R vorlagen.

### **1.2.3 Zusammenhang von Abstoßungsreaktionen und einer Checkpointinhibitoren-Therapie**

Nach Organtransplantationen steigt das Krebsrisiko der Patienten auf Grund der immunsuppressiven Therapie stark an. Viele Patienten entwickeln in der Folge Malignome, welche mit Hilfe von Checkpointinhibitoren therapiert werden (Engels et al., 2011). Diese

bergen jedoch das Risiko einer Transplantatabstoßung, wie mehrere Fallbeispiele zeigen. D'Izarny-Gargas et al. konnten in einer zusammenfassenden Recherche von 83 veröffentlichten Fallberichten eine Abstoßungswahrscheinlichkeit von 39,8% feststellen, wobei von sechs eingeschlossenen Patienten mit Herztransplantation ein Patient (entspricht 16,7%) eine Abstoßungsreaktion hatte. Checkpointinhibitoren scheinen Abstoßungsreaktionen zu begünstigen, Nieren- und Lebertransplantate scheinen stärker betroffen zu sein als Herztransplantate (d'Izarny-Gargas et al., 2020). Der PD1-PD-L1-Signalweg scheint somit von großer Relevanz für die Unterdrückung der Abstoßung durch das eigene Immunsystem zu sein. Die Expression von PD1 im Transplantatempfänger scheint zudem eine wichtige Rolle als Prädiktor für spätere Abstoßungsreaktionen darzustellen. Bei mehreren Patienten mit Nierenabstoßungen wurde eine hohe PD1-Expression auf T-Zellen beobachtet (Pike et al., 2016), Patienten mit akuten renalen Abstoßungsreaktionen zeigten erhöhte PD1-mRNA-Konzentrationen im Blut (Ya-wen et al., 2011).

### **1.3 Entzündung**

Eine Entzündung ist die Reaktion des Immunsystems auf Keime, abgestorbene Zellfragmente oder Noxen. Kardinalzeichen einer Entzündung sind Rötung, Schwellung, Überwärmung und Schmerz (Medzhitov, 2010). Diese Kardinalzeichen resultieren aus einer erhöhten Permeabilität der Gefäße und einer dadurch verstärkten Einwanderung von Immunzellen und Serumkomponenten ins Gewebe (Takeuchi and Akira, 2010). Entzündungen können in akut, subakut und chronisch unterteilt werden (Pahwa R, 2020). Hierbei werden die humorale und die zelluläre sowie die angeborene und die erworbene Immunantwort unterschieden. Zur angeborenen Immunantwort zählen Barrierebestandteile wie tight junctions, Epithelien und muköse Sekrete. Auch das Komplementsystem, Akute-Phase-Proteine, Zytokine und Chemokine werden zur angeborenen Immunantwort gezählt (Chaplin,

2010). Zur angeborenen zellulären Immunantwort gehören Makrophagen, Granulozyten, dendritische Zellen und NK-Zellen (McDonald and Levy, 2019). Zur zellulären erworbenen Immunantwort werden B- und T-Zellen gezählt, die humorale erworbene Immunantwort bilden Antikörper, welche in IgA, IgD, IgE, IgG und IgM unterteilt werden können (Chaplin, 2010).

### **1.3.1 Zelluläre Immunantwort in Myokarditiden**

Für die Entwicklung einer Myokarditis sind CD4-positive Helferzellen von essenzieller Bedeutung. Die Injektion von kardialem  $\alpha$ -Myosin in gesunde Mäuse induziert eine T-Zell-vermittelte autoimmune Myokarditis (Smith and Allen, 1991). Dendritische Zellen sind hierbei die wichtigsten Antigen-präsentierenden Zellen im Körper, wobei sie aufgenommene körpereigene zelluläre Bestandteile (DAMPs) und körperfremde Bestandteile (PAMPs) über das Oberflächenmolekül HLA-II nach Wanderung in lymphozytäres Gewebe den naiven T-Zellen präsentieren (Lichtman, 2013, Steinman and Witmer, 1978). Dendritische Zellen werden in CD123-positive, CD11c-negative plasmazytoide dendritische Zellen, deren Hauptaufgabe die Produktion von IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$  ist, und in CD123-negative, CD11c-positive myeloide dendritische Zellen unterteilt. Myeloide dendritische Zellen werden anhand weiterer Oberflächenproteine in zwei Subgruppen differenziert (Patente et al., 2019). Während die Zahl aller im Blut zirkulierenden dendritischen Zellen in Myokarditis-Patienten vermindert ist, können im Myokard vermehrt plasmazytoide dendritische Zellen gefunden werden. Experimentelle autoimmune Myokarditiden in Mäusen zeigten ebenfalls mehr plasmazytoide dendritische Zellen, hier waren auch die myeloiden dendritischen Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht (Pistulli et al., 2020, Van der Borght et al., 2018). Die Deletion des Interleukin-1-Rezeptors, welcher für die Aktivierung von dendritischen Zellen notwendig ist, führt zur Unfähigkeit autoimmune Myokarditiden in Mäusen auszulösen, was die essenzielle Bedeutung von dendritischen Zellen in der Pathogenese von Myokarditiden zeigt (Eriksson et al.,

2003). In akuten zellulären Abstoßungsreaktionen finden sich vermehrt dendritische Zellen, welche durch Produktion von Interleukin-12 NK-Zellen aktivieren (Adib-Conquy et al., 2014, Schroth et al., 2020). Allerdings unterstützen dendritische Zellen nicht nur proinflammatorische Prozesse, sie sind auch in der Lage, CD8-positive T-Zellen über den PD1-PD-L1-Signalweg in Apoptose zu treiben und die Bildung und Aktivierung antiinflammatorischer T<sub>reg</sub> zu induzieren (Gottschalk et al., 2013, Steinman and Nussenzweig, 2002).

Auch Makrophagen sind in der Lage über HLA-II Antigene zu präsentieren; in autoimmunen Myokarditiden machen sie den größten Teil aller infiltrierenden Immunzellen aus (Afanasyeva et al., 2004). IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  bewirken eine Differenzierung zu klassisch-aktivierten Makrophagen (M1), welche Interleukin-1, -6 und -12 sowie TNF- $\alpha$  ausschütten und so die Ausdifferenzierung von proinflammatorisch wirkenden TH1- und TH17-Zellen, welche Interleukin-17 produzieren, begünstigen. Zudem produzieren M1-Zellen ROS und Stickoxide, welche das umliegende Gewebe schädigen. Alternativ-aktivierte Makrophagen (M2) wirken dagegen durch Interleukin-10 und PD-L1-Expression antiinflammatorisch, die Aktivität von TH1-Zellen wird herunterreguliert und die Ausbildung von T<sub>reg</sub> gefördert (Gutierrez et al., 2014). Coxsackievirus B3-assoziierte Myokarditiden in Mäusen verliefen bei männlichen Versuchstieren innerhalb der ersten zehn Tage nach Infektion in 50% tödlich, weibliche Versuchstiere starben in 7% der Fälle. Bei gleicher Quantität an Makrophagen in männlichen und weiblichen Versuchstieren zeigten weibliche Tiere verstärkt M2-Zellen, während in männlichen Tieren vermehrt M1- Zellen gefunden wurden (Li et al., 2009). In akuten Abstoßungsreaktionen machen Makrophagen 38-60% aller infiltrierenden Immunzellen aus. Die Deletion von Makrophagen in Mäusen mit Nierentransplantaten führte zur signifikanten Abschwächung der akuten Abstoßungsreaktionen und einer Reduktion der freien Stickoxide um 90%, was für das Vorherrschen von M1-Zellen in akuten Abstoßungsreaktionen spricht (Jose et al., 2003). Die T-Zell-Aktivierung

blieb durch die Deletion der Makrophagen unbeeinflusst (Jose et al., 2003). Auch die Blockade von Stickstoffmonoxidsynthasen erhöhte die Überlebenszeit nach Herz- transplantation in Ratten signifikant (Roza et al., 2000). Vorhandensein von M2- Zellen in Kornea-Transplantaten wurde verstärkt bei Versuchstieren ohne Abstoßungsreaktion beobachtet, während in akuten Abstoßungsreaktionen M1- Zellen überwogen (Oh et al., 2013).

T-Zellen stellen eine heterogene Zellpopulation dar, die für die Ausbildung von autoimmunen Myokarditiden essenziell ist (Smith and Allen, 1991). T-Zellen werden im Knochenmark gebildet und wandern dann in den Thymus. In der Außenzone des Thymusmarks werden im Rahmen einer positiven Selektion alle T-Zellen, die keine HLA-Proteine erkennen, aussortiert und in die Apoptose getrieben. In der Innenzone werden im Rahmen einer negativen Selektion alle T-Zellen aussortiert, welche T-Zell- Rezeptoren gegen körpereigene Proteine exprimieren. Am Ende dieses Prozesses verbleiben weniger als 5% der T-Zellen, welche als naive T-Zellen in den Körperkreislauf gelangen (Königshoff and Brandenburger, 2012). Kommt es im Rahmen der negativen Selektion zu Fehlern gelangen naive T-Zellen mit Rezeptoren für körpereigene Stoffe in den Körperkreislauf. Vor allem  $\alpha$ -Myosin-spezifische T- Zellen sind für die Ausbildung autoimmuner Myokarditiden essenziell, auch in Patienten mit vorangegangener Infektion mit Coxsackievirus B3 kommen  $\alpha$ -Myosin-spezifische T-Zellen vor (Gangaplara et al., 2012, Smith and Allen, 1991). Eine genetische Disposition wie HLA-DQ8 erhöht zudem die Wahrscheinlichkeit, eine autoimmune Myokarditis zu entwickeln (Taylor et al., 2004). Innerhalb der T-Zellen kann man mehrere Untergruppen unterscheiden. Die CD4-positiven T-Helferzellen wirken als Vermittler und stimulieren über Zytokinausschüttung die B-Zellaktivität und Antikörperproduktion. Die Bindung zwischen T-Zell-Rezeptor und HLA-II wird durch das Oberflächenprotein CD4 stabilisiert. T-Helferzellen können in TH1- und TH2- Zellen unterschieden werden. TH1-Zellen wirken über Interferon- $\gamma$ , Tumornekrosefaktor- $\alpha$  sowie Interleukin-2 inflammatorisch,

ihre Ausdifferenzierung wird in Myokarditiden durch Interleukin-12 gefördert (Okura et al., 1998). TH2-Zellen hemmen beispielsweise durch Ausschüttung von Interleukin-4 Makrophagen und wirken antiinflammatorisch (Königshoff and Brandenburger, 2012). Übertrug man  $\alpha$ - Myosin-spezifische CD4-positive T-Zellen in uninfizierte Versuchstiere entwickelten diese eine autoimmune Myokarditis, bei Übertragung von CD8-positiven T-Zellen war dies nicht der Fall (Okura et al., 1998). Eine so durch CD4-positive Zellen induzierte autoimmune Myokarditis PD1-negativer Versuchstiere hatte einen schwereren Verlauf als in PD1-positiven Versuchstieren. Rein durch CD8-positive T-Zellen vermittelte Myokarditiden nahmen in PD1-negativen Versuchstieren ebenfalls schwerere Verläufe mit erhöhten Konzentrationen proinflammatorischer Zytokine (Tarrío et al., 2012). CD8-positive zytotoxische T-Zellen wirken nicht wie die T- Helferzellen als Vermittler, sondern sind in der Lage, andere Zellen in die Apoptose zu treiben. Körperzellen präsentieren hierbei über HLA-I Proteinf фрагmente. Besitzt eine zytotoxische T-Zelle einen passenden T-Zell-Rezeptor, so stabilisiert das Oberflächenprotein CD8 die Bindung zwischen T-Zell-Rezeptor und HLA-I. Über die Ausschüttung von Perforin und Granzymen leitet die zytotoxische T-Zelle die Apoptose der Körperzelle ein (Königshoff and Brandenburger, 2012). Fehlen von CD8-positiven T-Zellen in Cocksackievirus B3 infizierten Mäusen ging mit einer erhöhten Überlebenszeit und geringeren Infiltraten im Myokard einher, wobei sowohl CD8-positive T-Zellen fehlten als auch weniger Makrophagen und NK-Zellen einwanderten. Die Viruslast war bei Fehlen von CD8-positiven T-Zellen erhöht, was ihre Rolle in der Viruselimination verdeutlicht (Henke et al., 1995).

Eine weitere wichtige Untergruppe der T-Zellen in Myokarditiden sind die regulatorischen T-Zellen ( $T_{reg}$ ), welche den Transkriptionsfaktor FoxP3 exprimieren (Cai et al., 2019).  $T_{reg}$  drosseln über die Ausschüttung von Interleukin-10 und TGF- $\beta$  proinflammatorische Prozesse. Eine erhöhte Aktivität von  $T_{reg}$  geht beispielsweise mit einer mildereren Ausprägung der

Chagas-Erkrankung im Myokard einher (Guedes et al., 2012). Es gibt Hinweise darauf, dass die Aktivität von  $T_{reg}$  durch IFN- $\gamma$  erhöht wird (Wang et al., 2006). Mit Coxsackievirus B3 infizierte Mäuse, denen man im Verlauf  $T_{reg}$  injizierte, zeigten eine verbesserte Kontraktionsfähigkeit des Myokards (Pappritz et al., 2013). In Patienten mit DCM ist zudem die Zahl an  $T_{reg}$  im Vergleich zu gesunden Herzen verringert (Tang et al., 2010). Naive CD4-positive Zellen können über den PD1-PD-L1-Signalweg dazu gebracht werden, zu  $T_{reg}$  zu differenzieren. Wenn dieser Signalweg nicht genutzt werden kann, kommt es zur verminderten Ausdifferenzierung von  $T_{reg}$  und verstärkten Entzündungsreaktionen (Francisco et al., 2009). Auch TH1-Zellen können über die Stimulation des PD1-PD-L1-Signalwegs in  $T_{reg}$  umdifferenzieren (Amarnath et al., 2011). Zugleich exprimieren  $T_{reg}$  PD1, eine Interaktion mit PD-L1 auf Endothelzellen verstärkt die Aktivität von  $T_{reg}$ , während die Interaktion von endotheliale PD-L1 mit CD8-positiven T-Zellen diese inaktiviert und die Endothelzellen nicht apoptotisch werden lässt (Lim et al., 2018, Rodig et al., 2003). In Patienten mit Organtransplantat verhindern  $T_{reg}$  Abstoßungsreaktionen, weshalb in vivo gezüchtete  $T_{reg}$  in der Prävention von Abstoßungsreaktionen getestet werden (Hara et al., 2001, Takasato et al., 2014).

Alle genannten T-Zell-Subpopulationen exprimieren einen T-Zell-Rezeptor sowie CD3 auf ihrer Oberfläche. T-Zell-Rezeptoren bestehen aus einer  $\alpha$ - sowie einer  $\beta$ - Kette, welche durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Beide Ketten haben einen konstanten und einen variablen Teil. Intrazellulär ist dem T-Zell- Rezeptor ein CD3-Protein angelagert. Der gesamte CD3-Komplex besteht aus einer  $\gamma$ -Kette, einer  $\delta$ -Kette, einer  $\eta$ - und zwei  $\epsilon$ -Ketten. T-Zell-Rezeptor und CD3 bilden gemeinsam mit der  $\zeta$  -Kette einen Komplex zur Erkennung spezifischer Antigene und intrazellulären Signalweiterleitung (Königshoff and Brandenburger, 2012, Call et al., 2004).

Auch in gesunden Probanden können  $\alpha$ -Myosin-spezifische T-Zellen nachgewiesen werden (Lv and Lipes, 2012), was die wichtige Rolle

weiterer auf die T-Zellen wirkenden immunmodulierender Mechanismen verdeutlicht.

### **1.3.2 Regulation und Immunmodulation im Myokard durch den PD1-PD-L1- Signalweg**

Autoimmune Myokarditiden beziehungsweise fehlregulierte Immunantworten können über verschiedene Mechanismen vom Körper unterdrückt werden. Einen wichtigen Mechanismus stellt hierbei der PD1-PD-L1-Signalweg dar.

Programmed cell death protein 1, kurz PD1 genannt, ist ein aus 288 Aminosäuren bestehendes, 31647 Dalton schweres Oberflächenprotein von T-Zellen, B-Zellen und myeloiden Zellen (Riley, 2009). Die Liganden von PD1, PD-L1 und PD-L2, werden auf körpereigenen Zellen verschiedener Organsysteme exprimiert. Die PD1- Aktivierung kann sowohl über die Bindung des T-Zell-Rezeptors als auch des B-Zell-Rezeptors ausgelöst werden (Agata et al., 1996). Durch Interaktion von PD1 und PD- L1/2 werden am intrazellulären Teil von PD1 ITAM und ITSM phosphoryliert. Bei Mutation im ITSM kommt es zum Funktionsverlust des PD1-Rezeptors, eine Mutation im ITAM bewirkt dies hingegen nicht (Chemnitz et al., 2004, Okazaki et al., 2001). Durch das phosphorylierte ITSM wird die Phosphatase SHP2 aktiv. SHP2 ist eine intrazelluläre Phosphatase, die an phosphorylierte Tyrosin-Enden von Enzymen bindet und die Phosphatgruppe abspaltet. Hierdurch werden auch EGF-, EPO- und Insulin-Rezeptoren deaktiviert, wodurch SHP2 eine große Rolle in der Zellproliferation einnimmt, Störungen führen zur Entstehung verschiedener Tumore (Zhang et al., 2015, Qu, 2000). Zudem dephosphoryliert SHP2 die Proteine PI3K und ZAP-70 sowie einen Teil des T-Zell-Rezeptors CD3 $\zeta$ , wodurch diese gehemmt werden und die weitere Signalkaskade unterbunden wird. Da diese Signalstoffe auch im Rahmen der T-Zell-Rezeptor-Aktivierung von Bedeutung sind, wirkt der PD1-PD-L1-Signalweg direkt hemmend auf die T-Zell-Rezeptor-

Signaltransduktion, bei Aktivierung von PD1 und dem T-Zell-Rezeptor wird das CD3 $\zeta$ -vermittelte Signal zu 70% inhibiert (Boussiotis, 2016, Kuhlmann and Jacobs, 2013, Sheppard et al., 2004). ZAP-70 ist eine intrazelluläre Tyrosin-Kinase, ein Fehlen von ZAP-70 führt zur Bildung funktionsunfähiger T-Zellen, eine schwere Immundefizienz ist die Folge (Elder et al., 1994, Wang et al., 2010a). PI3-Kinasen gehören zu einer Enzymfamilie, welche normalerweise Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP2) phosphoryliert, wodurch Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP3) entsteht. Dieses dient als second messenger und kann im Gegensatz zur inaktiven PIP2-Form an die Proteinkinase B binden, wodurch diese einer Konformationsänderung unterliegt und an Threonin 308 und Serin 473 phosphoryliert wird (Alessi et al., 1996). Hierfür wandert die Proteinkinase B an die Plasmamembran, wo die Phosphatase PDK1 lokalisiert ist, welche durch unterstützende Phosphorylierung an Threonin 308 die vollständige Aktivierung der Proteinkinase B bewirkt. Mutationen der PDK1 resultieren in der Inhibition des weiteren Signalwegs und in verschiedenen Krankheiten (Bayascas et al., 2008). Versuche mit PDK1-negativen Mäusen konnten zeigen, dass diese im Vergleich zu PDK-1-positiven Mäusen zwischen der fünften und elften Lebenswoche alle an Herzversagen verstarben. Zudem waren die isolierten Kardiomyozyten der PDK1-negativen Versuchstiere deutlich kleiner als die Kardiomyozyten der PDK1-positiven Kontrollgruppe und zeigten eine erhöhte Sensitivität gegenüber Hypoxie (Mora et al., 2003). In T-Zellen wird PDK1 nach Aktivierung des T-Zell-Rezeptors aktiv und phosphoryliert den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B (Oh and Ghosh, 2013). Die phosphorylierte und aktivierte Proteinkinase B phosphoryliert anschließend TSC1/2, einen Komplex, der aus Hamartin und Tuberin besteht. TSC1/2 ist namensgebend für die Tuberöse Sklerose, eine autosomal-dominant vererbte Erkrankung, bei der es durch die fehlende negative Rückkopplung zu verstärkter Zellproliferation und zahlreichen Tumoren kommt (Portocarrero et al., 2018). Die Deletion von TSC1/2 führt zu einer verstärkten Ausdifferenzierung von TH1- und TH17-Zellen

und wirkt so proinflammatorisch (Park et al., 2013). Die Proteinkinase B phosphoryliert zudem PRAS40, einen Bestandteil und Regulator der Serin-Threonin-Kinase mTOR. Die DNA-Transkription und Translation wachstumsrelevanter Proteine wird durch mTOR gefördert. Zudem wird die Neusynthese von Membranlipiden durch mTOR hochreguliert. Neben der Förderung anaboler Prozesse wie der Glykolyse inhibiert mTOR auch katabole Prozesse wie beispielsweise die Autophagie, indem sowohl die Transkription von für die Autophagie relevanter Proteine gehemmt wird als auch durch Phosphorylierung bereits gebildete Proteine inhibiert werden. Die Deletion von mTOR führt im Herzen zur Unfähigkeit, sich steigenden Drücken durch kompensatorische Hypertrophie anzupassen, was in der Entwicklung einer dilatativen Kardiomyopathie resultiert (Nitulescu et al., 2018, Bardhan et al., 2016, Huang and Manning, 2008, Sciarretta et al., 2014). Die Rolle von mTOR im Rahmen von myokardialer Inflammation ist komplex, Studien im Mausmodell zeigten eine verringerte Expression des proinflammatorischen Interleukin-6 und eine geringere Entzündungsreaktion bei Überexpression von mTOR, während Blockade von mTOR mittels Rapamycin in anderen Studien zu einer verringerten Entzündungsreaktion führte (Song et al., 2010, Chen et al., 2014). Die Deletion von mTOR verhindert die Ausdifferenzierung von TH1-, TH2- und TH17-Zellen, stattdessen entstehen  $T_{reg}$  (Delgoffe et al., 2009). Auch durch den PD1-PD-L1/2-induzierten Wegfall der mTOR-Aktivierung kommt es zu einer verminderten Proliferation der T-Zellen sowie zu einer Förderung der Ausdifferenzierung zu  $T_{reg}$ . Es wird vermutet, dass PD-L1 eine synergetische Wirkung zu TGF- $\beta$  aufweist, welches für die Ausdifferenzierung von  $T_{reg}$  essenziell ist (Francisco et al., 2009). Gleichzeitig wird die Ausdifferenzierung von T- Gedächtniszellen und T-Effektorzellen gehemmt. Durch die Hemmung des PIP3-Signalwegs kommt es zusätzlich zur Verminderung der Interleukin-2 Produktion sowie zum Rückgang der Bcl-2 Produktion. Bcl-2 ist eine großteils antiapoptotisch wirkende mitochondriale Enzymfamilie, durch deren Hemmung PD1 einen wichtigen Stellenwert in der

Apoptoseeinleitung von T-Zellen hat (Constantinidou et al., 2019, Bardhan et al., 2016). In Mäusen kann eine gestörte Expression von PD1 gravierende Folgen für die Versuchstiere haben. Homozygot PD1-negative Versuchstiere zeigten im Vergleich zu PD1-positiven Tieren sieben Tage nach Impfung mit Ovalbumin einen signifikant erhöhten Troponin-I-Spiegel im Blut, erhöhte Entzündungsmediatoren wie Tumornekrosefaktor- $\alpha$  und das Chemokin CCL3 sowie ein histologisch schwereres Bild einer Myokarditis (Tarrío et al., 2012). Zudem konnte gezeigt werden, dass PD1-negative BALB/c- Mäuse nach zweimaliger Impfung mit spezieeigenen  $\alpha$ -Myosin-Schwerketten öfter eine autoimmune Myokarditis entwickelten als PD1-positive Mäuse (Tarrío et al., 2012). Bei PD1-negativen Mäusen zeigte sich eine erhöhte Inzidenz von autoimmunen Myokarditiden, wobei 70% der Versuchstiere im Alter von zehn Wochen an einer lymphozytären Myokarditis mit folgendem Herzversagen verstarben (Wang et al., 2010b). Auch PD-L1-negative Mäuse entwickeln öfter eine schwere autoimmune Myokarditis als PD-L1-positive Versuchstiere (Lucas et al., 2008). PD-L1-negative MRL-Fas/pr-Mäuse zeigten eine mediane Überlebenszeit zwischen neun und elf Wochen, in männlichen Versuchstieren trat die Erkrankung später auf als in weiblichen (Lucas et al., 2008). Sowohl komplett PD-L1-defiziente Versuchstiere als auch Versuchstiere mit PD-L1-Defizit auf nicht-hämatopoetischen Zellen zeigten schwerere Myokarditis-Verläufe (Grabie et al., 2007). Im Mausmodell ließ sich eine erhöhte Expression von PD-L1 auf kardialen Endothelzellen bei Myokarditis feststellen, die Expression von PD-L2 auf Makrophagen und dendritischen Zellen war nicht erhöht (Grabie et al., 2007). Die Expression von PD-L1 wird vermutlich durch IFN- $\gamma$  gesteuert, da Mäuse mit defektem IFN- $\gamma$  keine erhöhte PD-L1-Expression bei Myokarditis zeigten (Grabie et al., 2007). In post-mortem untersuchten Biopsien von Patienten, die an einer Checkpointinhibitor-assoziierten Myokarditis verstarben, wurde eine erhöhte PD-L1- Expression in Myozyten beschrieben (Johnson et al., 2016). In einer Studie zur Expression von PD1 und PD-L1 im Herzen bei

Infektion mit *Trypanosoma cruzi* konnte eine Erhöhung beider Proteine auf CD4-positiven T-Zellen, CD8-positiven T-Zellen sowie NK-T-Zellen festgestellt werden (Fonseca et al., 2018). Die Ausschüttung von IFN- $\gamma$  durch CD8-positiven T-Zellen scheint bei chronischer Chagas-Erkrankung einen protektiven Effekt zu haben, mögliche Erklärungen hierfür sind die gesteigerte PD-L1-Expression und die Aktivierung von T<sub>reg</sub> (Silverio et al., 2012).

Wang et al. (2010b) führen als mögliche Begründung des schwereren Myokarditisverlaufs bei PD-L1-negativen Mäusen im Vergleich zu PD1-negativen Mäusen Myeloid-Suppressor-Zellen an. Myeloid-Suppressor-Zellen sind unreife Zellen der myeloischen Reihe, welche die T-Zell-vermittelte Immunantwort unterdrücken können. Die Gruppe der Myeloid-Suppressor-Zellen ist sehr heterogen (Gabilovich, 2017). Es wird spekuliert, dass das exprimierte PD-L1 über einen PD1-abhängigen sowie über einen PD1-unabhängigen Mechanismus antiinflammatorisch wirkt, bei Wegfall von PD1 kann der unabhängige Mechanismus weiterhin die Immunantwort drosseln (Wang et al., 2010b). Demgegenüber stehen Forschungsergebnisse von Tarrío et al., welche eine histologisch schwerere Myokarditis mit mehr infiltrierenden CD8-positiven T-Zellen in PD1-negativen Mäusen als in PD-L1-negativen Mäusen beobachten konnten, auch hier entwickelten jedoch beide Versuchstiergruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe histologisch schwerere Myokarditiden (Tarrío et al., 2012). PD1-negative BALB/c-Mäuse entwickeln zudem eine dilatative Kardiomyopathie mit einer erhöhten Anzahl von Antikörpern, welche gegen Troponin I gerichtet sind. Diese Antikörper könnten durch eine dauerhafte Stimulation und Öffnung von spannungsabhängigen L-Typ Calcium-Kanälen für die Dilatation verantwortlich sein (Nishimura et al., 2001, Okazaki et al., 2003). Das Fehlen von PD1 beziehungsweise PD-L1 im Mausmodell steht somit mit häufigeren und schwereren autoimmunen Myokarditisverläufen sowie mit dilatativen Kardiomyopathien und Herzversagen in Zusammenhang. Bei Abstoßungsreaktionen nach Herztransplantation wird im Mausmodell

sowohl interstitiell als auch vaskulär mehr PD-L1 als in gesunden Versuchstieren exprimiert. Eine Blockade von PD-L1 mit monoklonalen Antikörpern führte zu einer Verschlimmerung des histologischen Bildes mit gesteigerter T-Zell-Einwanderung ins Interstitium, die Gefäße zeigten keine Veränderungen (Kaul et al., 2015).

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass durch die Interaktion von PD1 und PD-L1/2 die Immunantwort gehemmt und überschießende, für den Körper schädliche Immunantworten verhindert werden. Beispielsweise entwickeln PD1-negative Versuchstiere im Mausmodell häufiger eine autoimmune Myokarditis als PD1-positive Tiere (Tarrío et al., 2012). Neben der natürlichen Expression von PD-L1/2 in körpereigenen Zellen rückt zurzeit immer mehr die Expression von PD-L1/2 in Tumorzellen in den Vordergrund. Tumorzellen nutzen den Mechanismus der negativen Immunsystemstimulation, um der T-Zell-induzierten Apoptose zu entgehen. Wenn eine CD8-positive T-Zelle die Tumorzelle als fremd erkennt, schüttet die CD8-positive T-Zelle das zytotoxische Enzym Granzym sowie Perforin aus. Granzym gelangt durch das porenbildende Perforin in die Tumorzelle, wo es über Aktivierung von Caspase zur Fragmentierung der DNA führt. Zudem führt Granzym zur Spaltung des mitochondrialen Protein BID, dessen Fragmente die Ausschüttung von Cytochrom c bewirken. Die Folge ist die Apoptose der Tumorzelle (Luo et al., 1998, Yang et al., 2018). Durch die Aktivierung des PD1-PD-L1-Signalwegs findet diese Apoptoseeinleitung nicht statt (Juneja et al., 2017).

## **1.4 Zielsetzung**

In der vorliegenden Arbeit wird die Expression von PD1 und PD-L1 im Rahmen von akuten und chronischen lymphozytären, akuten eosinophilen und Riesenzell- myokarditiden sowie in akuten zellulären Abstoßungsreaktionen des Grads 2R untersucht. Vermutet wird, dass in allen Fällen sowohl eine erhöhte Expression von PD1 als auch von PD-L1 im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden kann und die Expression bei akuten Myokarditiden am höchsten ist. Zudem soll der Zusammenhang zwischen der Anzahl CD3-positiver und CD68-positiver Immunzellen im Myokard und der PD1- beziehungsweise PD-L1-Expression ermittelt werden. Um mögliche Einflussfaktoren auf die Expression von PD1 und PD-L1 zu identifizieren, werden klinische Daten wie Alter, Geschlecht, Symptombdauer beziehungsweise Zeit nach Transplantation und der Nachweis von viralen Nukleinsäuren im Myokard und im Blut einbezogen. Durch die Ermittlung des Zusammenhangs von PD1/PD-L1- Expression und linksventrikulärer Ejektionsfraktion soll eine Aussage über die Auswirkung der PD1-PD-L1-Expression auf das klinische Erscheinungsbild des Patienten getroffen werden.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Endomyokardbiopsien**

Myokardbiopsien wurden für die Diagnostik von Myokarditiden beziehungsweise Kardiomyopathien in vierprozentigem gepufferten Formalin zugesandt und routinemäßig in Paraffin eingegossen. Für die infektionspathologische Untersuchung wurden Endomyokardbiopsien in RNAlater sowie in einigen Fällen zusätzlich Blutproben zur Erregerdiagnostik eingesandt.

### **2.2 Histologische Untersuchungen**

Die Präparate wurden im Rahmen der Routinediagnostik von verschiedenen Ärzten des Instituts für Pathologie und Neuropathologie unter Aufsicht von Frau Professor Dr. K. Klingel untersucht und die Diagnosen gestellt. Hierfür wurden die 1995 und 1999 von der World Health Organisation und der World Heart Federation veröffentlichten Klassifikationen, die Dallas-Klassifikation sowie die ISHLT-Diagnosekriterien angewandt. Als Routinefärbungen wurden nachfolgende histologische und immunhistochemische Färbungen sowie molekularbiologische Untersuchungen von Mitarbeitern des Instituts für Pathologie und Neuropathologie durchgeführt. Die Schnitte wurden routinemäßig mit einer HE-Färbung, einer Giemsa-Färbung, einer Kongorotfärbung und einer Masson-Trichrom-Färbung angefärbt. Die Verwendung der nicht mehr für die Diagnostik benötigten Restmaterialien für diese Dissertationsschrift wurden von der Ethikkommission Nr.336/2019BO2 genehmigt.

### **2.3 Immunhistochemische Färbungen**

Im Rahmen der Routinediagnostik wurden CD3-positive T-Zellen und CD68-positive Makrophagen mit Hilfe von immunhistochemischen Färbungen an 5 µm dicken Paraffinschnitten dargestellt. Nach

Vorbehandlung wurden die Endomyokardschnitte mit einem monoklonalen Kaninchen anti-Human-CD3 Antikörper (Firma ROCHE, Klon 2FGV6, 1:300) oder einem monoklonalen Maus anti-CD68 Antikörper (Firma DAKO, Klon KP1, 1:500) in PBS inkubiert. Zudem wurden für die Färbung von PD1- positiven Zellen monoklonale Maus anti-PD1 Antikörper (Firma DAKO, Klon NAT105, 1:50) verwendet. PD-L1-positive Zellen wurden mit anti-PD-L1 Antikörpern (Firma ROCHE, Klon 22C3, 2,96µg/ml) angefärbt. Die anschließende Detektion der Schnitte erfolgte mit Hilfe eines Ventana iView DAB Nachweiskit (Nexes System, Ventana Medical Systems, Illkirch, Frankreich), im Anschluss wurde eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin und eine Eindeckung mit Entellan durchgeführt.

Die verwendeten Antikörper und ihre jeweiligen Epitope sind in Tabelle 3 dargestellt.

**Tabelle 3: Immunhistochemische Färbungen**

Zelltyp	Epitop	Antikörper	Verdünnung
T-Zellen	CD3	Firma ROCHE, Klon 2FGV6, monoklonal	1:300
Makrophagen, Monozyten	CD68	Firma DAKO, Klon KP1, monoklonal	1:500
T-Zellen, B-Zellen, Monozyten	PD1	Firma DAKO, Klon NAT105, monoklonal	1:50
Myozyten, T-Zellen, B-Zellen, dendritische Zellen, Monozyten	PD-L1	Firma ROCHE, Klon22C3, monoklonal	c=2,96µg/ml

Die histologischen und immunhistologischen Untersuchungen erlauben die Differenzierung der Myokarditiden in lymphozytäre Myokarditiden, Riesenzell- myokarditiden und eosinophile Myokarditiden.

#### **2.4 Molekularbiologische Erregerdiagnostik**

Die molekularbiologische Untersuchung wurde im Rahmen der Routinediagnostik von Mitarbeitern im Institut für Pathologie und Neuropathologie der Universität Tübingen durchgeführt. Ziel der molekularbiologischen Untersuchung war es, spezifische Nukleinsäuren verschiedener kardiotoxischer Erreger im Myokard und im Blut nachzuweisen. Hierfür wurde die vorhandene DNA beziehungsweise RNA unter Verwendung von Proteinase-K und Phenol/ Chloroform aus den Myozyten extrahiert. Zum Nachweis von Enteroviren (einschließlich Coxsackieviren der Gruppe A und B sowie Echoviren), PVB19, EBV, Adenoviren, hCMV, HHV6, HHV7 und Borrelia spp. wurde eine nested (RT-) Polymerasekettenreaktion durchgeführt. Zur Kontrolle wurden Oligonukleotidsequenzen aus dem Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase Gen verwendet. Durch anschließende Genomsequenzierung wurde bei Nachweis viraler Nukleinsäure der exakte Virustyp bestimmt. Die editierten Sequenzierungsergebnisse wurden mit dem BioEdit-Programm oder der BLAST- Suche in der NCBI-Datenbank abgeglichen.

#### **2.5 Auswertung immunhistochemischer Färbungen**

Die angefärbten CD3-, CD68-, PD1- und PD-L1-positiven Präparate wurden unter einem Zeiss Standard 25 Lichtmikroskop ausgewertet. Es wurde die Zellzahl pro 1mm<sup>2</sup> ausgezählt, wobei jeweils 3 x 1mm<sup>2</sup> zufällig gewählte Flächen gezählt wurden. Bei Zellzahlen größer 200 Zellen/mm<sup>2</sup> wurde die Zählung zur Vermeidung von Zählfehlern und dadurch bedingten Verfälschungen auf 200 Zellen/mm<sup>2</sup> beschränkt.

Für die Anzahl CD3-positiver T-Zellen sowie CD68-positiver Makrophagen wurden ein CD3-Score und ein CD68-Score mit Werten von 0 bis 5 vergeben. Ein CD3- beziehungsweise CD68-Score von 0 entspricht hierbei einer Zellzahl von 0-6 Zellen/mm<sup>2</sup> und wurde somit allen Präparaten zugeordnet, in denen keine Entzündung sichtbar war. Der Score 1 bedeutet eine Zellzahl zwischen 7 und 20 Zellen/mm<sup>2</sup>. Waren zwischen 21 und 50 Zellen/mm<sup>2</sup> vorhanden wurde der Score 2 vergeben, bei Zellzahlen zwischen 51 und 100 Zellen/mm<sup>2</sup> der Score 3. Zellzahlen zwischen 101 und 200 Zellen/mm<sup>2</sup> entsprachen einem Score von 4. Alle Präparate, in denen die Zählung über 200 Zellen/mm<sup>2</sup> ergeben hätte und die Zählung zur Vermeidung von Fehlern nicht fortgeführt wurde, erhielten den Score 5.

Für die Beurteilung der Expression von PD1 im gesamten Präparat wurde ein PD1- Score angewandt, welcher Zahlen von 0 bis 3, jeweils in 1er-Schritten aufsteigend, vergibt. Die Zahl 0 entspricht einem Präparat, in welchem der Quotient aus PD1- positiven Zellen und CD3-positiven Zellen unter ein Prozent betrug. Der PD1-Score 1 bedeutet eine Anfärbung durch PD1-Antikörper von ein bis zehn Prozent der Anzahl CD3-positiver Zellen. Eine Färbung von über 10% und unter 25% aller CD3-positiven Zellen entsprach einem PD1-Score von 2, eine Anfärbung von  $\geq 25\%$  wurde als PD1- Score 3 gewertet.

Für die Beurteilung der Expression von PD-L1 im gesamten Präparat wurde ein Score entwickelt, welcher Zahlen von 0 bis 3, jeweils in 1er-Schritten aufsteigend, vergibt. Die Zahl 0 entspricht einem Präparat, in welchem PD-L1 nicht angefärbt werden konnte. Der PD-L1-Score 1 bedeutet eine schwache, nur leicht angedeutete Färbung. Der PD-L1-Score 2 wurde vergeben, wenn  $\leq 25\%$  aller Myozyten eine klare Färbung zeigten. Färbungen von über 25% aller Myozyten wurden als PD-L1-Score 3 gewertet.

## **2.6 Klinische Parameter**

### **2.6.1 Erkrankungsdauer**

Die Erkrankungsdauer stellt den Zeitraum von Beginn der klinischen Symptome bis zur Entnahme der Biopsie dar. Im Falle der Patienten nach Herztransplantation wurde die Erkrankungsdauer mit dem vergangenen Zeitraum seit Transplantation gleichgesetzt.

### **2.6.2 Ejektionsfraktion**

Die Ejektionsfraktion stellt das pro Herzschlag ausgeworfene Blutvolumen im Verhältnis zur Ventrikelfüllung am Ende der Diastole in Prozent dar. Hierbei wurde speziell die linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF) gemessen. Als Messverfahren stehen die transthorakale Echokardiographie, die Magnetresonanztomografie, die Laevokardiografie sowie die Radionuklid-Ventrikulografie zur Verfügung, wobei die von den jeweiligen Kliniken gewählte Methode nicht erfasst wurde. Der Normbereich der LVEF liegt für Männer zwischen 52-72%, für Frauen zwischen 54-74% sofern diese mit Hilfe einer zweidimensionalen Echokardiographie ermittelt wurde (Lang et al., 2015).

## **2.7 Patientenkollektiv**

### **2.7.1 Patienten**

Die Studie umfasste Patienten mit den Diagnosen akute lymphozytäre Myokarditis, akute eosinophile Myokarditis, Riesenzellmyokarditis, chronische lymphozytäre Myokarditis sowie Patienten nach Herztransplantation mit akuter zellulärer Abstoßungsreaktion Grad 2R. In die Studie wurden nur Patienten eingeschlossen, bei welchen in der Routinediagnostik eine vollständige histologische, immunhistochemische sowie molekularpathologische Untersuchung der jeweiligen Myokardbiopsien durchgeführt wurde.

### **2.7.2 Kontrollgruppen**

Als Kontrollgruppe für die akuten und chronischen Myokarditis-Patienten wurden Biopsien von Patienten mit diagnostizierter hypertensiver Herzerkrankung sowie DCM ohne Entzündung gewählt. Die Kontrollgruppe der Patienten mit akuter zellulärer Abstoßungsreaktion Grad 2R bestand aus unauffälligen Biopsien nach Herztransplantation ohne zelluläre Abstoßung entsprechend Grad 0R.

### **2.8 Statistik**

Für die statistische Analyse wurden die Programme SPSS 26 sowie Microsoft Excel 2010 verwendet. Alle gezeigten Darstellungen wurden mit Hilfe dieser Programme angefertigt. Das Signifikanzniveau wurde auf 5% festgelegt. Die PD1-/PD-L1-Expression von Patienten mit akuter lymphozytärer Myokarditis, akuter eosinophiler Myokarditis, Riesenzellmyokarditis, chronischer Myokarditis und die PD1-/PD-L1-Expression der Kontrollgruppe wurde mit einem Kruskal-Wallis-Test verglichen, für einen anschließenden paarweisen Vergleich wurde ein Mann-Whitney-Test durchgeführt. Für den Vergleich der PD1-/PD-L1-Expression der Patienten mit akuter zellulärer Abstoßungsreaktion Grad 2R und der PD1-/PD-L1-Expression der Kontrollgruppe wurde ein Mann-Whitney-Test angewandt. Als zweiter Schritt wurde die PD1-Expression mit der PD-L1-Expression korreliert, um herauszufinden, ob eine erhöhte PD1-Expression mit einer erhöhten PD-L1-Expression einhergeht. Hierfür wurden der Korrelationskoeffizient nach Spearman sowie Kendall Tau bestimmt. Der Korrelationskoeffizient nach Spearman sagt aus, wie stark der Zusammenhang zwischen zwei Variablen ist. Er kann Werte von -1 (maximal negative Korrelation) bis +1 (maximal positive Korrelation) annehmen. Für die Beurteilung der Korrelationsstärke von PD1-Score und PD-L1-Score wurden Spearman-Korrelationskoeffizienten zwischen 0,0 und  $\leq \pm 0,2$  als keine Korrelation gewertet. Werte größer  $\pm 0,2$  und  $\leq \pm 0,5$  galten als mäßige Korrelation der PD1-Expression mit

der PD-L1-Expression,  $\pm 0,5 < x \leq \pm 0,8$  wurde als deutliche Korrelation gewertet. Alle Werte über  $\pm 0,8$  galten als starke Korrelation der PD1-Expression mit der PD-L1-Expression. Kendall Tau macht wie der Korrelationskoeffizient nach Spearman eine Aussage über die Korrelationsstärke der PD1-Expression mit der PD-L1-Expression, seine Aussagekraft ist in kleinen Stichproben stärker, weshalb er stets mitbestimmt wurde. In einem dritten Schritt wurden der CD3-Score und der CD68-Score in allen Myokarditiden miteinander korreliert. Ziel war es herauszufinden, inwiefern hohe Zahlen CD3-positiver Zellen mit erhöhten Zahlen CD68-positiver Zellen einhergehen. Hierfür wurden der Korrelationskoeffizient nach Spearman und Kendall Tau verwendet. Zudem wurden der CD3-Score und der CD68-Score von Patienten mit Myokarditiden mit einem Kruskal-Wallis-Test verglichen und ein anschließender paarweiser Vergleich mit Hilfe eines Mann-Whitney-Tests durchgeführt. Der Zusammenhang zwischen einer hohen Anzahl CD3-positiver beziehungsweise CD68-positiver Zellen mit dem PD1- und PD-L1-Score wurde in allen Myokarditiden durch eine Korrelation und durch die Bestimmung von Spearmans Korrelationskoeffizienten und Kendall Tau überprüft. Als vierter Schritt wurde der Zusammenhang zwischen den folgenden Faktoren und der PD1-/PD-L1-Expression untersucht:

- Alter
- Geschlecht
- Symptombdauer beziehungsweise Zeit nach Transplantation
- Linksventrikuläre Ejektionsfraktion
- Viraler Nukleinsäurenachweis im Myokard
- Viraler Nukleinsäurenachweis im Blut

Ziel war es herauszufinden, ob die genannten Variablen Geschlecht, Alter, Symptombdauer beziehungsweise Zeit nach Transplantation, viraler Nukleinsäure- nachweis im Myokard und viraler Nukleinsäurenachweis im Blut Einfluss auf die PD1-/PD-L1-Expression haben. Umgekehrt sollte

durch den Zusammenhang zwischen LVEF und PD1-/PD-L1-Expression eine Aussage über die klinische Konsequenz einer erhöhten PD1-/PD-L1-Expression getroffen werden, da eine erniedrigte LVEF mit einer reduzierten Überlebenswahrscheinlichkeit einhergeht (Kindermann et al., 2008). Hierfür wurden für die Korrelationen der metrischen sowie ordinalen Variablen Alter, LVEF und Symptombdauer beziehungsweise Zeit nach Transplantation mit der PD1-/PD-L1-Expression die Korrelationskoeffizienten nach Spearman sowie Kendall Tau bestimmt. Für die Korrelation der nominalen Variablen Geschlecht sowie Virusnachweis in Myokard und Blut mit der PD1-/PD-L1-Expression wurden der Kontingenzkoeffizient und Cramer-V bestimmt sowie ein Chi-Quadrat-Test nach Pearson durchgeführt. Cramer-V, Chi-Quadrat und der Kontingenzkoeffizient treffen Aussagen über den Zusammenhang zwischen den nominalen Daten Geschlecht, viraler Nukleinsäurenachweis im Myokard und viraler Nukleinsäurenachweis im Blut und der PD1-/PD-L1-Expression. Im Gegensatz zum Korrelationskoeffizienten nach Spearman und Kendall Tau kann Cramer-V nur Werte zwischen 0 und 1 annehmen. Somit gibt Cramer-V nur an, wie stark ein Zusammenhang ist, kann jedoch keine Aussage über die Richtung des Zusammenhangs machen. Für die Beurteilung der Korrelationsstärke der nominalen Variablen Geschlecht, viraler Nukleinsäure- nachweis im Myokard und viraler Nukleinsäurenachweis im Blut mit der PD1-/PD-L1- Expression wurden Werte für Cramer-V unter 0,1 als kein Zusammenhang, zwischen 0,1 und 0,3 als schwacher Zusammenhang, zwischen 0,3 und 0,5 als mäßiger Zusammenhang und für Werte größer 0,5 als starker Zusammenhang gewertet. Im Anschluss wurden jeweils sieben Imputationen durchgeführt und mit dem neuen imputierten Datensatz eine erneute Korrelation durchgeführt. Für alle Korrelationen wurde die asymptotische Signifikanz beurteilt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Zusammensetzung der Stichprobe

Insgesamt wurden 112 Patienten im Alter von zehn bis 81 Jahren in die Studie eingeschlossen. Die Patienten wiesen sieben verschiedene Diagnosen auf, welche in Abbildung 1 verdeutlichend dargestellt werden. Die Anzahl von Patienten mit akuter Myokarditis betrug 40 Personen (35,71%), hiervon zeigten 15 Patienten (13,39%) eine akute lymphozytäre Myokarditis, 16 Patienten (14,29%) eine akute eosinophile Myokarditis und neun Patienten (8,04%) eine Riesenzellmyokarditis. 17 Patienten (15,18%) hatten eine abgeheilte, differenzialdiagnostisch chronische lymphozytäre Myokarditis, welche im Folgenden immer als chronische Myokarditis bezeichnet wird. Die Kontrollgruppe der Myokarditispatienten bestand aus 21 Personen (18,75%) mit hypertensiven Herzerkrankungen oder DCM ohne Entzündung. 14 Patienten (12,50%) mit akuter zellulärer Abstoßungsreaktion Grad 2R wurden in die Studie eingeschlossen, die Kontrollgruppe bestand aus 20 Personen (17,86%) mit Zustand nach Herztransplantation, die jedoch keine Abstoßungsreaktion zeigten.

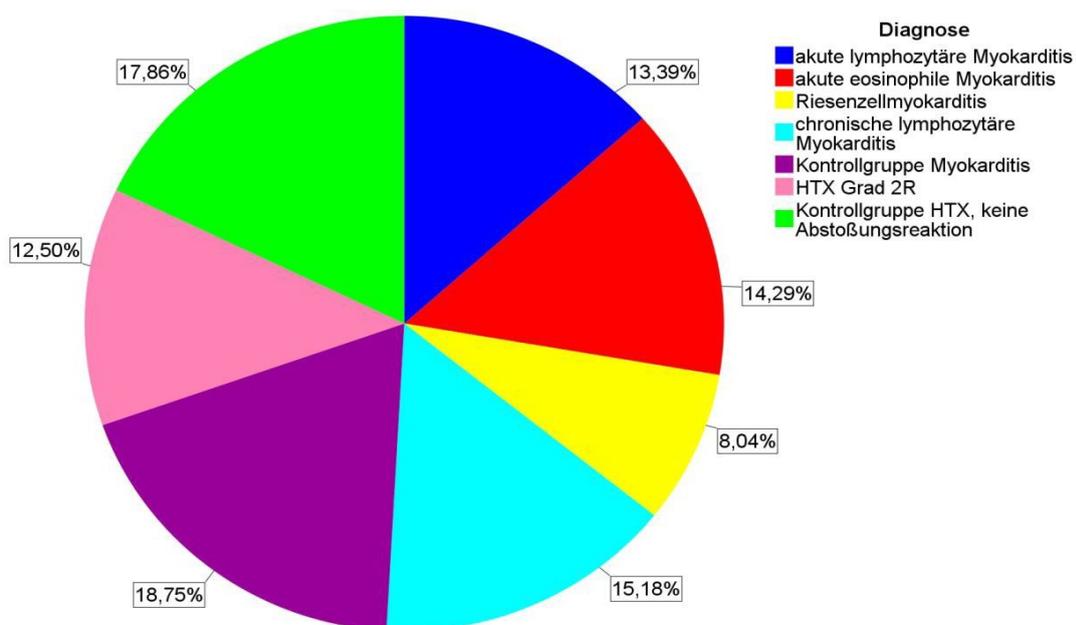


Abbildung 1: Zusammensetzung der Stichprobe

## **3.2 Untersuchung bei Patienten mit Myokarditis**

### **3.2.1 Charakteristika des untersuchten Kollektivs - Alter und Geschlecht**

#### Akute lymphozytäre Myokarditis

Innerhalb der Patienten mit akuter lymphozytärer Myokarditis waren neun Patienten (60%) männlich, sechs Patientinnen (40%) waren weiblich. Der Mittelwert des Alters der Patienten mit akuter lymphozytärer Myokarditis betrug 37,53 Jahre mit einer Standardabweichung von 18,04. Der älteste Patient mit einer akuten lymphozytären Myokarditis war 60 Jahre, der jüngste 14 Jahre alt. Der Median des Alters der Patienten mit akuter lymphozytärer Myokarditis betrug 41 Jahre mit einem Interquartilsabstand von 39.

Innerhalb der an akuter lymphozytärer Myokarditis erkrankten Patienten zeigten vier Patienten (26,67%) maximal sieben Tage Symptome, weitere vier Patienten waren acht bis vierzehn Tage symptomatisch. Ein Patient (6,67%) mit akuter lymphozytärer Myokarditis war 15 bis 30 Tage lang symptomatisch. Für sechs Patienten (40%) mit akuter lymphozytärer Myokarditis lagen hierzu keine Daten vor.

Sechs Patienten (40%) mit akuter lymphozytärer Myokarditis hatten eine LVEF von unter 40%. Fünf Patienten (33,33%) mit akuter lymphozytärer Myokarditis wiesen eine LVEF größer 40% und kleiner 50% auf, für vier Patienten (26,67%) lagen hierzu keine Daten vor. Von den Patienten mit akuter lymphozytärer Myokarditis und einer LVEF kleiner 40% hatte ein Patient (6,67%) eine LVEF  $\leq 20\%$ .

Innerhalb der Patienten mit akuter lymphozytärer Myokarditis wurde in acht Patienten (53,33%) Nukleinsäure kardiotoxischer Erreger im Myokard nachgewiesen, bei fünf positiv getesteten Patienten (33,33%) fand sich DNA von PVB19, jeweils bei einem Patienten (6,67%) EBV DNA, Coxsackievirus B1 RNA und DNA von Borrelia afzelii.

In drei Patienten (20%) mit akuter lymphozytärer Myokarditis wurde EBV

DNA im Blut nachgewiesen, in den Blutproben zweier Patienten (13,33%) konnte HHV7 DNA nachgewiesen werden. Ein Patient (6,67%) mit akuter lymphozytärer Myokarditis hatte hCMV DNA im Blut. Von fünf Patienten (33,33%) mit akuter lymphozytärer Myokarditis waren keine Blutproben vorhanden.

#### Akute eosinophile Myokarditis

Acht Patienten (50%) mit akuter eosinophiler Myokarditis waren männlich, acht Patientinnen weiblich. Der Mittelwert des Alters der Patienten mit akuter eosinophiler Myokarditis lag bei 48 Jahren mit einer Standardabweichung von 16,09, der jüngste Patient war 22 Jahre, der älteste Patient 72 Jahre alt. Der Median des Alters der Patienten mit akuter eosinophiler Myokarditis lag bei 50 Jahren mit einem Interquartilsabstand von 27,25.

Vier (25%) der an akuter eosinophiler Myokarditis erkrankten Patienten zeigten maximal sieben Tage, drei Patienten (18,75%) acht bis vierzehn Tage und ein Patient (6,25%) 15 bis 30 Tage Symptome. Sechs Patienten (37,5%) mit akuter eosinophiler Myokarditis waren über 30 Tage symptomatisch, für zwei Patienten (12,5%) lagen hierzu keine Daten vor.

Unter den Patienten mit akuter eosinophiler Myokarditis lag die LVEF von sechs Patienten (37,5%) unter 40%, vier Patienten (25%) hatten eine LVEF von mindestens 40%, jedoch weniger als 50%. Vier Patienten (25%) mit akuter eosinophiler Myokarditis hatten eine LVEF von mindestens 50%, für zwei Patienten (12,5%) lagen hierzu keine Daten vor. Vier Patienten (25%) mit akuter eosinophiler Myokarditis hatten eine  $LVEF \leq 20\%$ .

Bei vier Patienten (25%) mit akuter eosinophiler Myokarditis gelang der Nachweis von EBV DNA im Myokard.

Innerhalb der Patienten mit akuter eosinophiler Myokarditis wurde in den

Blutproben zweier Patienten (12,5%) EBV DNA, in zwei Patienten EBV und HHV7 DNA und in einem Patienten (6,25%) EBV und HHV6 DNA nachgewiesen. Für drei Patienten (18,75%) mit akuter eosinophiler Myokarditis waren keine Blutproben vorhanden.

### Riesenzellmyokarditis

Von den an Riesenzellmyokarditis erkrankten Patienten waren vier Patienten (44,44%) männlich, fünf Patientinnen (55,56%) waren weiblich. Der Mittelwert des Alters der Patienten mit Riesenzellmyokarditis betrug 54,67 Jahre mit einer Standardabweichung von 12,75, der älteste Patient war 78 Jahre, der jüngste 35 Jahre alt. Der Median des Alters der Patienten mit Riesenzellmyokarditis betrug 55 Jahre mit einem Interquartilsabstand von 18,5.

Innerhalb der an Riesenzellmyokarditis erkrankten Patienten zeigte ein Patient (11,11%) seit maximal sieben Tagen, ein weiterer Patient seit acht bis vierzehn Tagen Symptome. Fünf Patienten (55,56%) zeigten über 30 Tage Symptome, für zwei Patienten (22,22%) lagen hierzu keine Daten vor.

Vier Patienten (44,44%) mit Riesenzellmyokarditis hatten ein LVEF von unter 40%. Bei einem Patienten (11,11%) mit Riesenzellmyokarditis lag die LVEF bei mindestens 40%, jedoch unter 50%, zwei Patienten (22,22%) hatten eine LVEF von mindestens 50% und größer, für zwei Patienten (22,22%) lagen hierzu keine Daten vor. Drei Patienten (33,33%) mit Riesenzellmyokarditis hatten eine LVEF  $\leq$  20%.

In keinem Patienten mit Riesenzellmyokarditis konnten Nukleinsäuren kardiotoxischer Erreger im Myokard oder im Blut nachgewiesen werden, von allen Patienten waren Blutproben vorhanden.

### Chronische lymphozytäre Myokarditis

Neun Patienten (52,94%) mit chronischer lymphozytärer Myokarditis waren männlich, acht Patientinnen (47,06%) weiblich. Der Mittelwert des Alters lag bei 48,82 Jahren mit einer Standardabweichung von 15,725. Der älteste Patient mit chronischer lymphozytärer Myokarditis war 73 Jahre, der jüngste 17 Jahre alt, der Median des Alters lag bei 51 Jahren mit einem Interquartilsabstand von 19,5.

Unter den an chronischer lymphozytärer Myokarditis erkrankten Patienten hatten neun Patienten (52,94%) über einen Monat Symptome, ein Patient (5,88%) kam mit akuter Dyspnoe, für die restlichen sieben Patienten (41,18%) lagen hierzu keine Daten vor.

Neun Patienten (52,94%) mit chronischer lymphozytärer Myokarditis zeigten eine LVEF von unter 40%. Bei einem Patienten (5,88%) mit chronischer Myokarditis lag die LVEF bei mindestens 40%, jedoch unter 50%. Zwei Patienten (11,76%) mit chronischer lymphozytärer Myokarditis hatten eine LVEF von mindestens 50% oder größer. Für fünf chronische lymphozytäre Myokarditis-Patienten (29,41%) lagen hierzu keine Daten vor. Unterteilt man die neun Patienten mit chronischer lymphozytärer Myokarditis und einer LVEF von unter 40% nochmals genauer, betrug bei fünf Patienten (29,41%) die LVEF  $\leq 20\%$ .

Bei an chronischer lymphozytärer Myokarditis erkrankten Patienten fand sich am häufigsten PVB19 DNA, welche im Myokard von drei Patienten (17,65%) gefunden wurde. Bei einem Patienten (5,88%) mit chronischer lymphozytärer Myokarditis wurde HHV6 DNA im Myokard nachgewiesen.

Innerhalb der Patienten mit chronischer Myokarditis konnten drei Nachweise (17,65%) von HHV7 DNA und zwei Nachweise (11,76%) von EBV DNA im Blut erbracht werden, für sechs Patienten (35,29%) lagen keine Blutproben vor.

### Kontrollgruppe

Innerhalb der Kontrollgruppe für die akuten und chronischen Myokarditis-Patienten, welche aus Patienten mit hypertensiver Herzerkrankung sowie DCM ohne Entzündung bestand, waren 14 Patienten (66,67%) männlich und sieben Patientinnen (33,33%) weiblich. Der Mittelwert des Alters der Kontrollgruppe lag bei 61,05 Jahren mit einer Standardabweichung von 14,08, der älteste Patient war 81 Jahre, der jüngste 21 Jahre alt. Der Median des Alters innerhalb der Kontrollgruppe lag bei 66 Jahren mit einem Interquartilsabstand von 16,5.

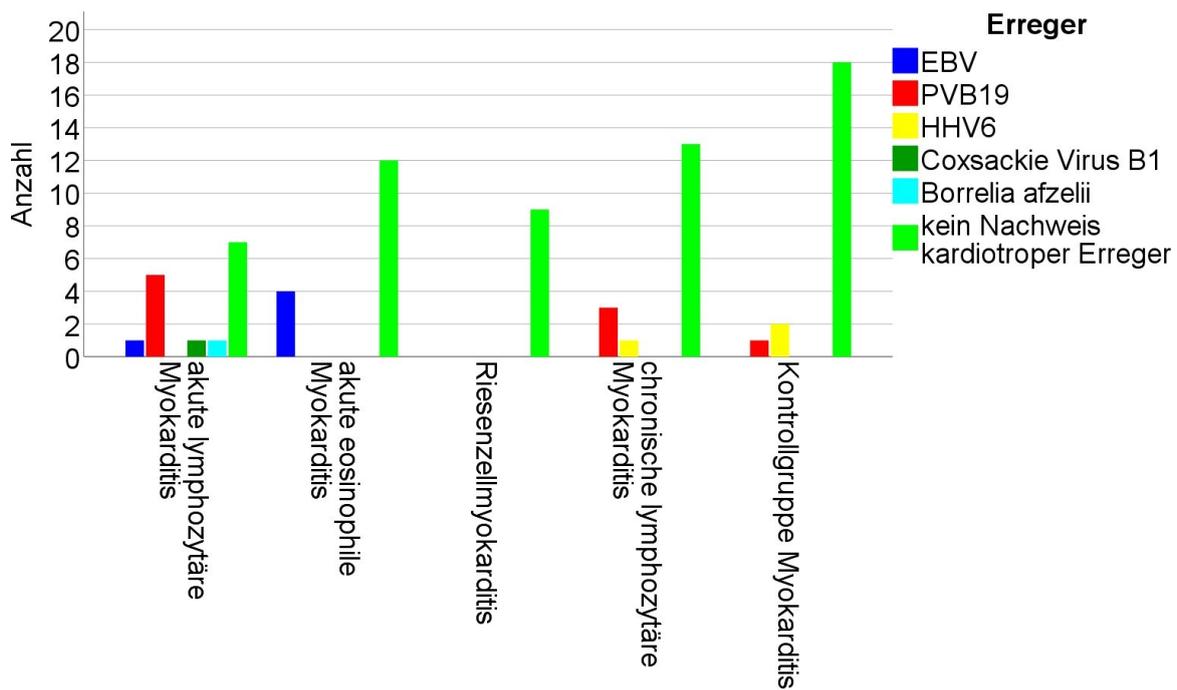
In der Kontrollgruppe lagen für sieben Patienten Daten zur Dauer der Symptome vor. Hierbei gaben vier Patienten (19,05%) der Kontrollgruppe seit Monaten bestehende Symptome an, ein Patient (4,76%) zeigte seit ein bis sieben Tagen, ein Patient seit acht bis vierzehn Tagen und ein Patient seit 15 bis 30 Tagen Symptome. Für die übrigen 14 Patienten der Kontrollgruppe (66,67%) lagen hierzu keine Daten vor.

In der Kontrollgruppe zeigten 14 Patienten (66,67%) eine LVEF von unter 40%, zwei Patienten (9,52%) lagen bei mindestens 40%, jedoch unter 50%. Bei zwei Patienten (9,52%) der Kontrollgruppe betrug die LVEF mindestens 50%, für drei Patienten (14,29%) lagen hierzu keine Daten vor. Sieben Patienten (33,33%) der Kontrollgruppe hatten eine LVEF  $\leq$  20%.

In der Kontrollgruppe konnte in zwei Patienten (9,52%) HHV6 DNA und in einem Patienten (4,76%) PVB19 DNA im Myokard nachgewiesen werden.

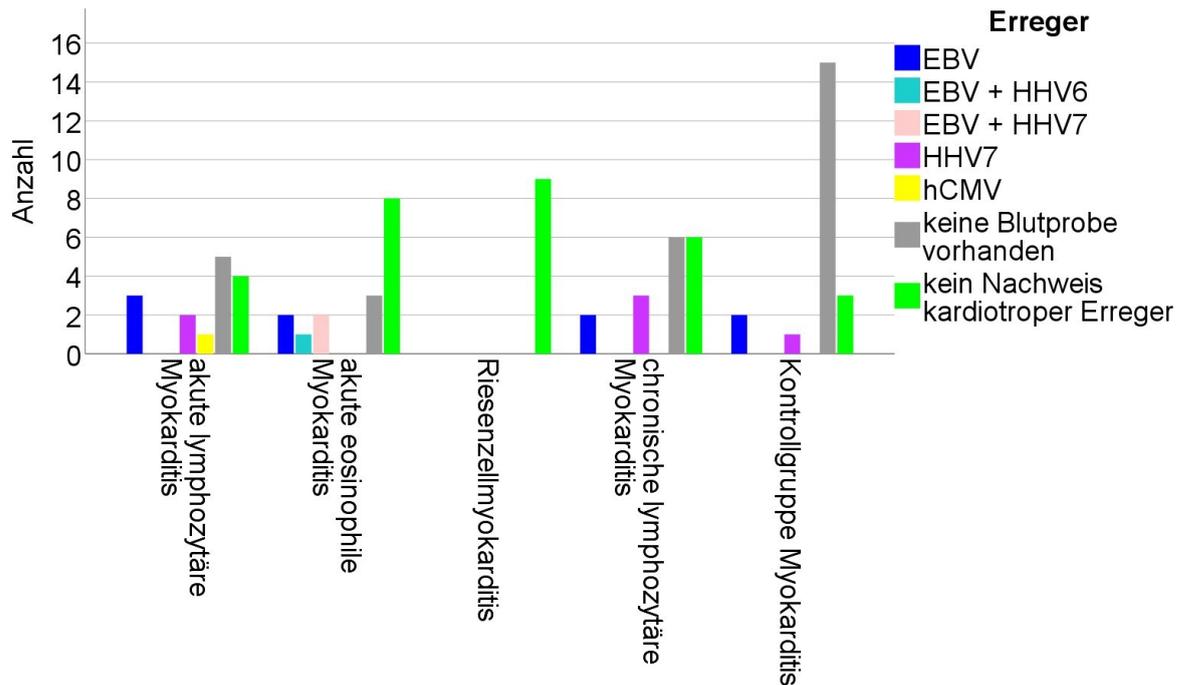
Zwei Patienten (9,52%) der Kontrollgruppe zeigten EBV DNA im Blut, ein Patient (4,76%) HHV7 DNA. Von 15 Patienten (71,43%) waren keine Blutproben vorhanden.

Im Myokard wurde demnach am häufigsten PVB19 DNA gefunden. Die genauen Verteilungen sind in Abbildung 2 dargestellt.



**Abbildung 2: Nachweis von Nukleinsäuren kardiotroper Erreger im Myokard bei Myokarditispatienten und Kontrollpatienten**

Im Blut kam EBV DNA in allen akuten Myokarditiden sowie in der Kontrollgruppe am häufigsten vor. In den Patienten mit chronischer Myokarditis dominierte HHV7 DNA im Blut. Die exakten Verteilungen werden durch Abbildung 3 veranschaulicht.



**Abbildung 3: Nachweis von Nukleinsäuren kardiotroper Erreger im Blut bei Myokarditispatienten und Kontrollpatienten**

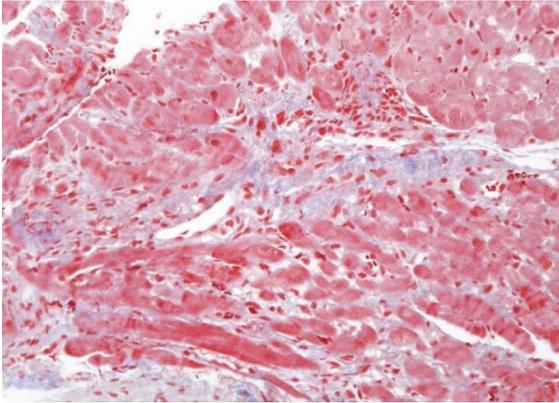
### 3.2.2 Expression von CD3, CD68, PD1 und PD-L1 in Myokarditiden

Für die Einteilung in akute und chronische Myokarditis wurden die CD3-positiven T- Zellen und die CD68-positiven Makrophagen quantifiziert und die Ausprägung der Infiltration des Myokards mit Hilfe des CD3- sowie des CD68-Scores eingeteilt. Eine akute Myokarditis lag vor, wenn eine Zellzahl von über sieben CD3-positiven T-Zellen sowie insgesamt mindestens 14 Leukozyten pro mm<sup>2</sup> mit bis zu 4 Makrophagen pro mm<sup>2</sup> gezählt wurden (Caforio et al., 2013). Unter der Fragestellung, ob die PD1- und PD-L1-Expression im Myokard im Rahmen von verschiedenen Myokarditistypen Unterschiede aufweist, wurden immunhistochemische Färbungen durchgeführt und die PD1- und PD-L1-Expression mit Hilfe der PD1- und PD-L1-Scores unterteilt.

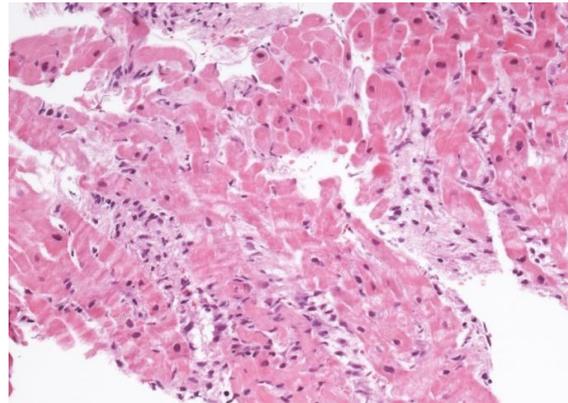
### Akute lymphozytäre Myokarditis

Insgesamt wurde einem Patienten (6,67%) mit akuter lymphozytärer Myokarditis der CD3-Score 2 zugeordnet, sechs Patienten (40%) erhielten den CD3-Score 3, zwei Patienten (13,33%) den CD3-Score 4 und sechs Patienten (40%) den CD3-Score 5. Der Median des CD3-Scores für Patienten mit akuter lymphozytärer Myokarditis lag bei 4, der Interquartilsabstand betrug 2. Zwei Patienten (13,33%) wurde der CD68-Score 3 zugeordnet, fünf Patienten (33,33%) zeigten den Score 4. Acht Patienten (53,33%) erhielten den CD68-Score 5. Der Median des CD68-Scores für Patienten mit akuter lymphozytärer Myokarditis betrug 5 mit einem Interquartilsabstand von 1. Neun Patienten (60%) mit akuter lymphozytärer Myokarditis erhielten den PD1-Score 1, fünf Patienten (33,33%) den Score 2, ein Patient (6,67%) erhielt den PD1-Score 3. Im Median hatten Patienten mit akuter lymphozytärer Myokarditis einen PD1-Score von 1, der Interquartilsabstand betrug 1. Elf Patienten (73,33%) mit akuter lymphozytärer Myokarditis zeigten den PD-L1-Score 1, drei Patienten (20%) erhielten den Score 2 und ein Patient (6,67%) bekam den Score 3 zugeordnet. Der Median des PD-L1-Scores aller Patienten mit akuter lymphozytärer Myokarditis lag bei 1, der Interquartilsabstand betrug ebenfalls 1.

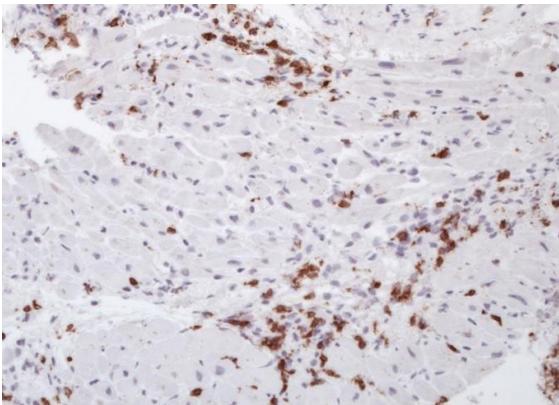
Abbildung 4 zeigt beispielhaft histologische Gewebeschnitte einer akuten lymphozytären Myokarditis. Abbildung 4a zeigt die Trichrom-Färbung, in der sich bläuliche Fibroseareale zeigen. Die Myozyten erscheinen in der Trichrom-Färbung rötlich. In Abbildung 4b erkennt man nekrotische Myozyten und eine deutliche Infiltration des Myokards durch Immunzellen. Bei diesen infiltrierenden Immunzellen handelt es sich, wie in Abbildung 4c+d ersichtlich, um dunkelbraun angefärbte CD3-positive T-Zellen sowie massenhaft CD68-positive Makrophagen. Abbildung 4e zeigt die Expression von PD1 in zahlreichen Immunzellen, Abbildung 4f die Expression von PD-L1 in Myozyten, welche bei Betrachtung des gesamten Präparats einem PD-L1-Score von 2 entspricht.



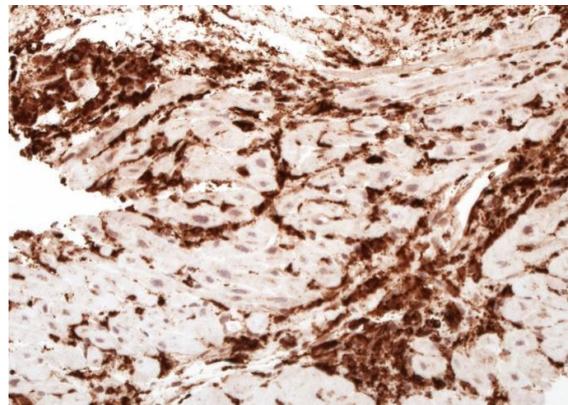
**a) Masson-Trichrom**



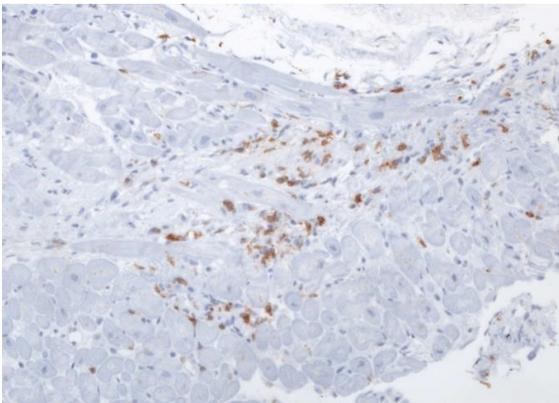
**b) Hämatoxylin-Eosin**



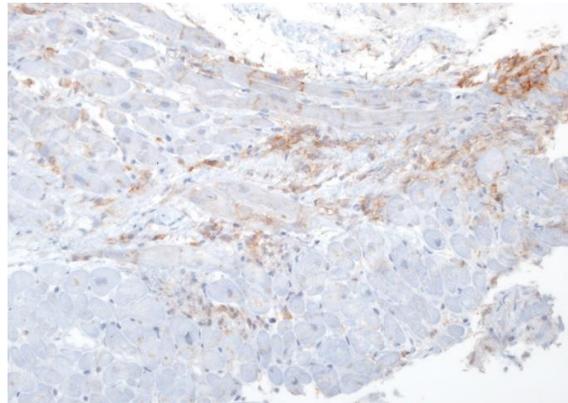
**c) CD3+ T-Zellen**



**d) CD68+ Makrophagen**



**e) PD1+ Zellen**



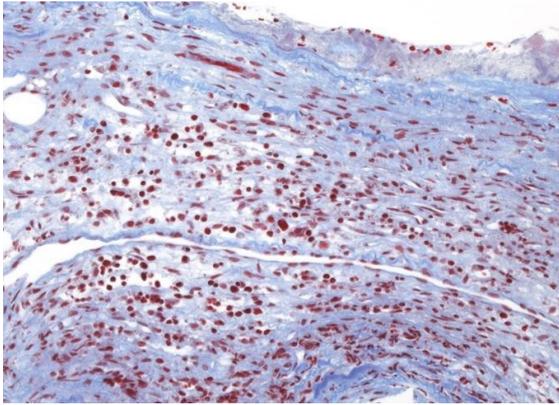
**f) PD-L1+ Zellen**

**Abbildung 4: Akute lymphozytäre Myokarditis;  
Originalvergrößerung x 200**

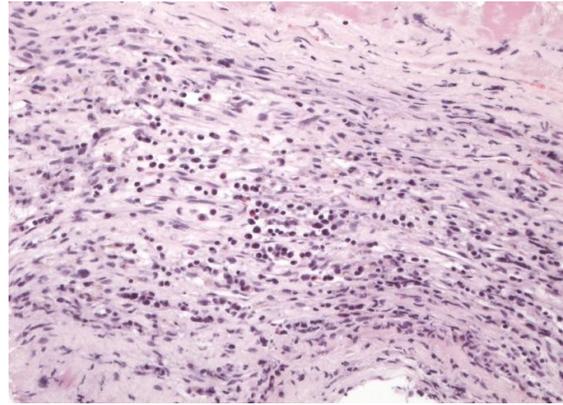
### Akute eosinophile Myokarditis

Acht Patienten (50%) mit akuter eosinophiler Myokarditis zeigten den CD3-Score 3, ein Patient (6,25%) den CD3-Score 4, sieben Patienten (43,75%) den CD3-Score 5. Der Median des CD3-Scores für Patienten mit akuter eosinophiler Myokarditis lag bei 3,5, der Interquartilsabstand betrug 2. Vier Patienten (25%) mit akuter eosinophiler Myokarditis hatten einen CD68-Score von 4, zwölf Patienten (75%) zeigten den Score 5. Der Median des CD68-Scores in allen Patienten mit akuter eosinophiler Myokarditis war 5, der Interquartilsabstand betrug 0,75. Ein Patient (6,25%) mit akuter eosinophiler Myokarditis zeigte den PD1-Score 0, neun Patienten (56,25%) den Score 1 und fünf Patienten (31,25%) den Score 2. Einem Patienten (6,25%) mit akuter eosinophiler Myokarditis wurde der PD1-Score 3 zugeordnet. Der Median des PD1-Scores aller Patienten mit akuter eosinophiler Myokarditis betrug 1, der Interquartilsabstand war ebenfalls 1. Von den Patienten mit akuter eosinophiler Myokarditis hatten drei Patienten (18,75%) den PD-L1-Score 0 und acht Patienten (50%) den Score 1. Vier Patienten (25%) mit akuter eosinophiler Myokarditis zeigten den Score 2, ein Patient (6,25%) den Score 3. Im Median erreichten Patienten mit akuter eosinophiler Myokarditis einen PD-L1-Score von 1, der Interquartilsabstand betrug 1.

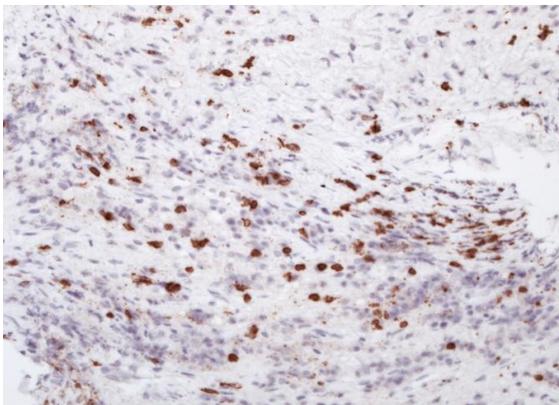
Abbildung 5 zeigt eine eosinophile Myokarditis mit einem gemischtzelligen Infiltrat aus CD3-positiven T-Zellen, Makrophagen und eosinophilen Granulozyten, welche sich in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung in Abbildung 5b rot darstellen. In Abbildung 5a fällt ein ausgeprägter bindegewebiger Umbau des Myokards auf, Abbildung 5c und d zeigen die Infiltration durch CD3-positive T-Zellen und viele CD68-positive Makrophagen. Wie in Abbildung 5e ersichtlich, wird PD1 von einigen Immunzellen exprimiert, die PD-L1-Expression der Myozyten ist fokal in Abbildung 5f erkennbar und entspricht bei Betrachtung des gesamten Präparats dem PD-L1-Score 2.



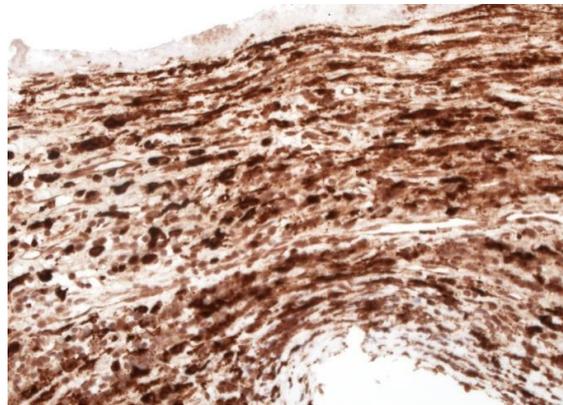
**a) Masson-Trichrom**



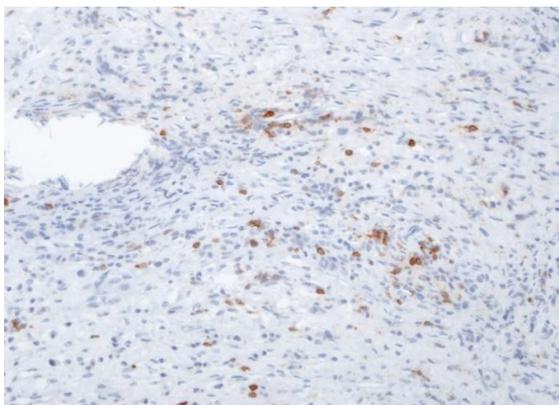
**b) Hämatoxylin-Eosin**



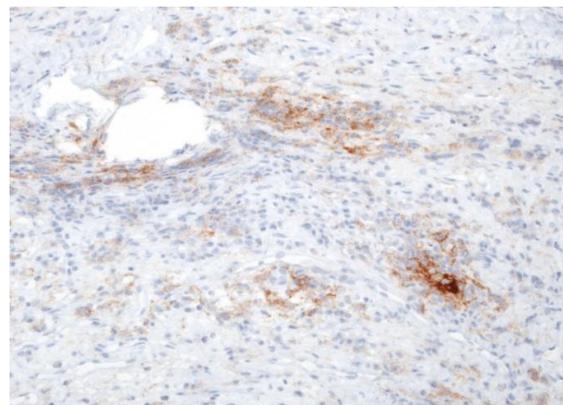
**c) CD3+ T-Zellen**



**d) CD68+ Makrophagen**



**e) PD1+ Zellen**



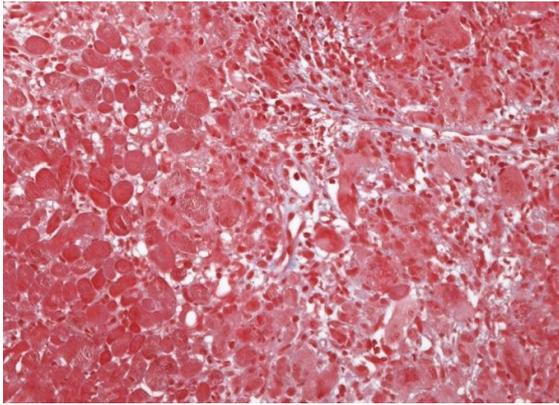
**f) PD-L1+ Zellen**

**Abbildung 5: Akute eosinophile Myokarditis; Originalvergrößerung x 200**

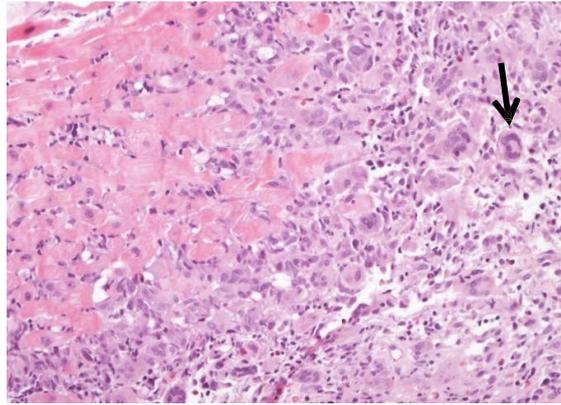
### Riesenzellmyokarditis

Der CD3-Score 3 wurde einem Patienten (11,11%) mit Riesenzellmyokarditis zugeordnet, die restlichen acht Patienten (88,89%) erhielten den CD3-Score 5. Der Median des CD3-Scores lag für Patienten mit Riesenzellmyokarditis bei 5, der Interquartilsabstand betrug 0. Zudem zeigten alle Patienten mit Riesenzellmyokarditis den CD68-Score 5. Der Median des CD68-Scores betrug in Patienten mit Riesenzellmyokarditis 5 mit dem Interquartilsabstand 0. Von den Patienten mit Riesenzellmyokarditis erhielt ein Patient (11,11%) den PD1-Score 1, sechs Patienten (66,67%) den Score 2 und zwei Patienten (22,22%) den Score 3. Im Median zeigten Patienten mit Riesenzellmyokarditis einen PD1-Score von 2, der Interquartilsabstand betrug 0,5. Drei Patienten (33,33%) mit Riesenzellmyokarditis hatten den PD-L1-Score 1, fünf Patienten (55,56%) den Score 2 und ein Patient (11,11%) den Score 3. Der Median des PD-L1-Scores aller Patienten mit Riesenzellmyokarditis lag bei 2, der Interquartilsabstand betrug 1.

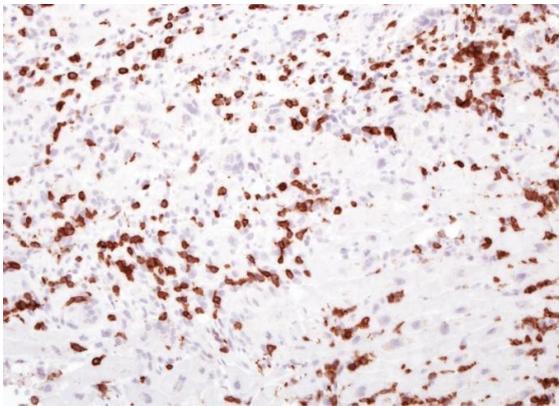
In Abbildung 6a+b ist der typische Befund einer Riesenzellmyokarditis mit lymphozytenreichem Infiltrat sowie mehrkernigen Riesenzellen (Pfeil) dargestellt. Bei diesen Riesenzellen handelt es sich um mehrkernige Makrophagen, deren massive Infiltration in Abbildung 6d verdeutlicht wird. In Abbildung 6c zeigt sich eine ausgeprägte Infiltration von CD3-positiven T-Zellen, allein im dargestellten Bildabschnitt sind über 200 bräunlich angefärbte Zellen erkennbar. In Abbildung 6e sind die PD1-exprimierenden Immunzellen braun angefärbt. Die in Abbildung 6f erkennbare Anfärbung von PD-L1 in Myozyten wirkt im Vergleich zu den auf Seite 37 und Seite 39 dargestellten akuten lymphozytären und eosinophilen Myokarditiden schwächer, jedoch gleichmäßiger über das gesamte Präparat verteilt und entspricht unter Zusammenschau des gesamten Präparats dem PD-L1-Score 2.



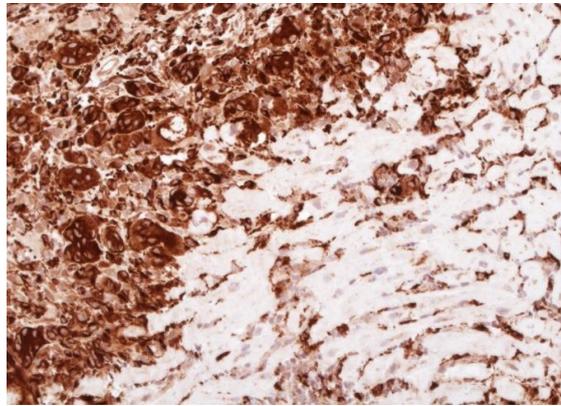
**a) Masson-Trichrom**



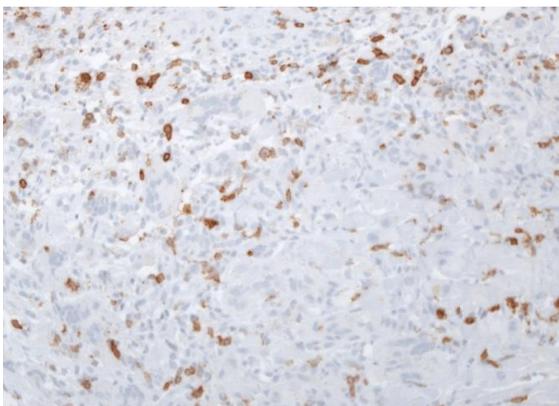
**b) Hämatoxylin-Eosin**



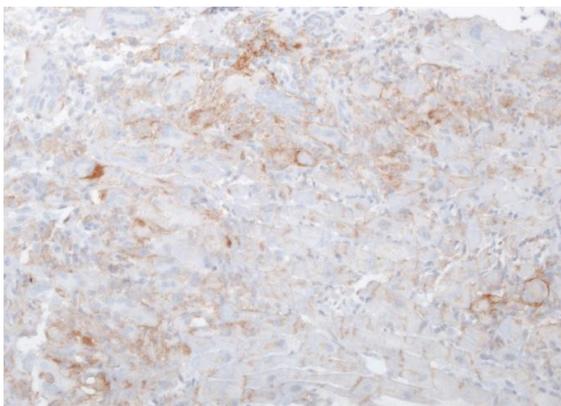
**c) CD3+ T-Zellen**



**d) CD68+ Makrophagen**



**e) PD1+ Zellen**



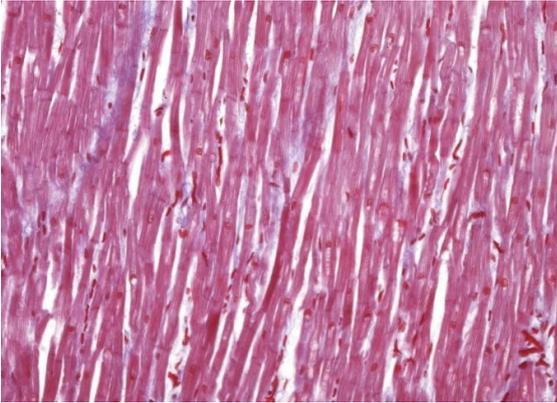
**f) PD-L1+ Zellen**

**Abbildung 6: Riesenzellmyokarditis: Originalvergrößerung x 200**

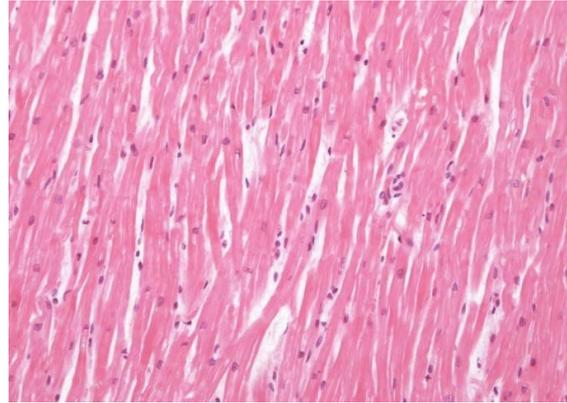
### Chronische lymphozytäre Myokarditis

In der Gruppe der Patienten mit chronischer lymphozytärer Myokarditis zeigten zwölf Patienten (70,59%) den CD3-Score 0, fünf Patienten (29,41%) den CD3-Score 1. Der Median des CD3-Scores in Patienten mit chronischer lymphozytärer Myokarditis betrug 0, der Interquartilsabstand 1. Fünf Patienten (29,41%) mit chronischer lymphozytärer Myokarditis wurde der CD68- Score 0 zugeordnet, elf Patienten (64,71%) zeigten den CD68-Score 1 und ein Patient (5,88%) erhielten den CD68-Score 2. Die Patienten mit chronischer lymphozytärer Myokarditis hatten einen Median sowie Interquartilsabstand des CD68-Scores von 1. 16 Biopsien (94,12%) der Patienten mit chronischer lymphozytärer Myokarditis hatten einen PD1-Score von 0, ein Patient (5,88%) bekam den Score 2. Der Median sowie der Interquartilsabstand des PD1-Scores von Patienten mit chronischer lymphozytärer Myokarditis lagen bei 0. Acht Patienten (47,06%) mit chronischer lymphozytärer Myokarditis hatten den PD- L1-Score 0, neun Patienten (52,94%) den Score 1. Sowohl der Median als auch der Interquartilsabstand des PD-L1-Scores bei Patienten mit chronischer lymphozytärer Myokarditis betragen 1.

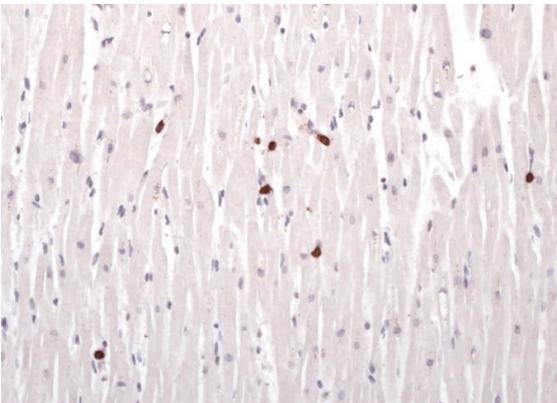
Die in Abbildung 7 dargestellte chronische lymphozytäre Myokarditis zeigt in der Trichrom-Färbung bläulich gefärbte, eher gering ausgeprägte fibrotische Areale und im Vergleich zu den akuten Myokarditiden eine geringe Infiltration von Immunzellen. Wie in Abbildung 7c ersichtlich wird, finden sich hierbei jedoch über 7 CD3-positive T-Zellen pro mm<sup>2</sup>, wodurch die WHF-Klassifikation einer Myokarditis erfüllt wird. Zudem zeigen sich in Abbildung 7d viele infiltrierende CD68-positive Makrophagen. In Abbildung 7e+f zeigt sich im Vergleich zu den auf Seite 37, 39 und 41 dargestellten akuten Myokarditiden keine Expression von PD-L1 in Myozyten sowie nur eine einzelne PD1-positive Immunzelle im fibrotischen Areal.



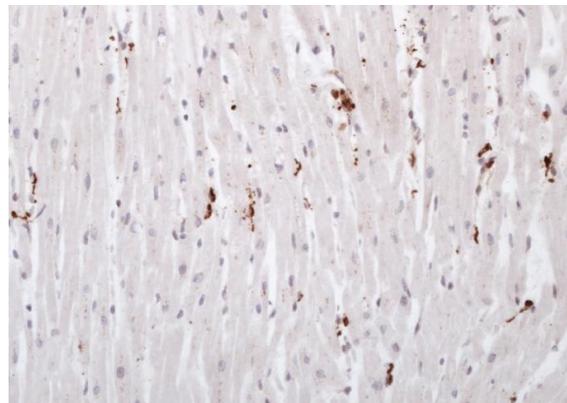
**a) Masson-Trichrom**



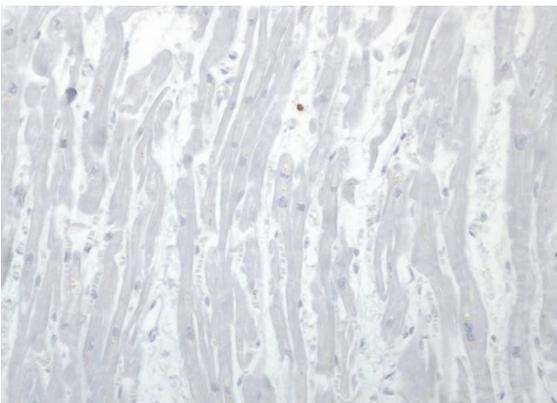
**b) Hämatoxylin-Eosin**



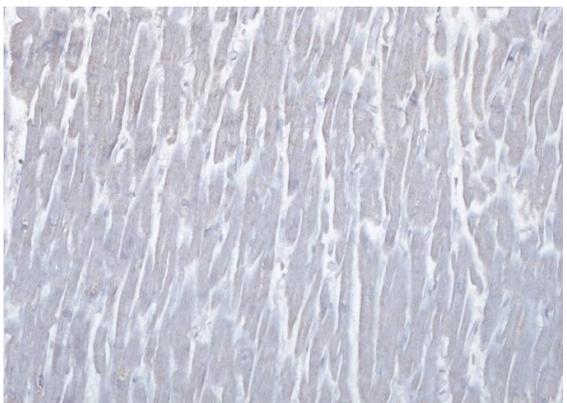
**c) CD3+ T-Zellen**



**d) CD68+ Makrophagen**



**e) PD1+ Zellen**



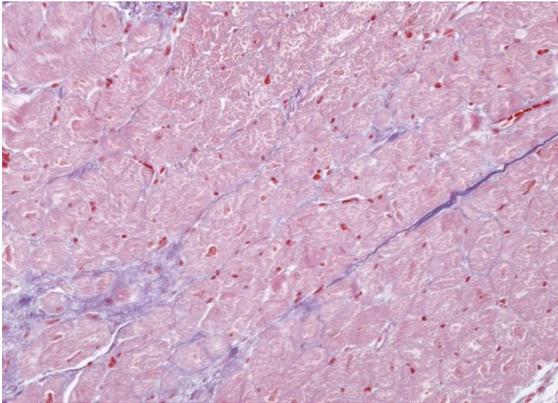
**f) PD-L1+ Zellen**

**Abbildung 7: Chronische lymphozytäre Myokarditis;  
Originalvergrößerung x 200**

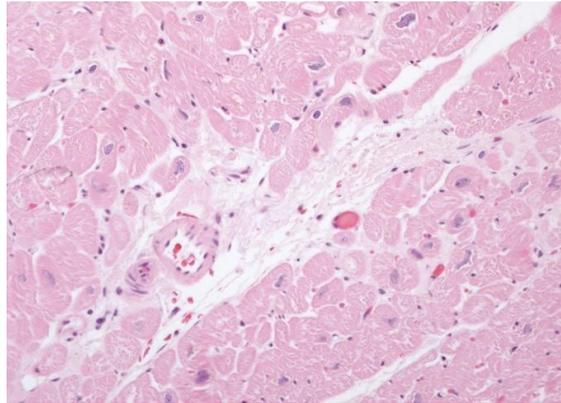
### Kontrollgruppe

Die Zahl CD3-positiver T-Zellen sowie CD68-positiver Makrophagen lag in der aus Patienten mit hypertensiver Herzerkrankung oder DCM ohne Entzündung bestehenden Kontrollgruppe unterhalb der definierten Kriterien einer Myokarditis. Alle Patienten wiesen demnach weniger als 14 Leukozyten mit weniger als 7 CD3-positiven T-Zellen pro mm<sup>2</sup> auf, alle Patienten der Kontrollgruppe erhielten den CD3-Score 0 (0-6 Zellen/mm<sup>2</sup>). Sechs Patienten (28,57%) der Kontrollgruppe zeigten den CD68-Score 0 (0-6 Zellen/mm<sup>2</sup>), 15 Patienten (71,43%) der Kontrollgruppe hatten den Score 1 (7-20 Zellen/mm<sup>2</sup>). Der Median sowie der Interquartilsabstand des CD68-Scores für alle Patienten der Kontrollgruppe betragen 1. In der Kontrollgruppe hatte die überwiegende Anzahl von 17 Patienten (80,95%) den PD1-Score 0, vier Patienten der Kontrollgruppe erhielten den Score 2 (19,05%), was einer Anfärbung mit PD1-Antikörpern von 11-25% aller CD3-positiven Zellen entsprach. Der Median sowie der Interquartilsabstand der Kontrollgruppe betragen 0. Die Kontrollgruppe bestand aus neun Patienten (42,86%) mit dem PD-L1-Score 0 und zwölf Patienten (57,14%) mit dem Score 1. Der Median und der Interquartilsabstand des PD-L1-Scores in der Kontrollgruppe betragen 1.

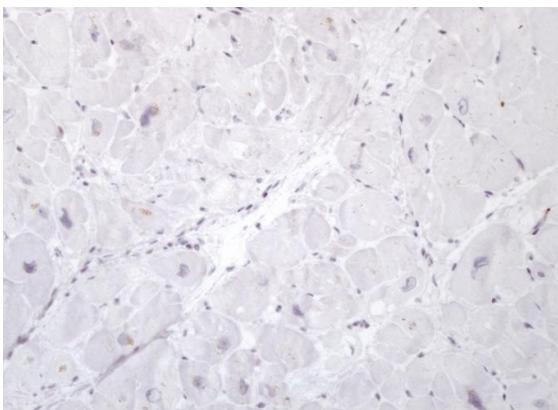
In Abbildung 8 ist vergleichend ein Myokardpräparat ohne Entzündungszeichen dargestellt. Die Myozyten zeigen Kaliberschwankungen, zudem zeigen sich in der Trichrom-Färbung bläuliche Fibroseareale, was für eine DCM typisch ist. Die Abwesenheit von entzündlichem Infiltrat, insbesondere die in Abbildung 8c nicht darstellbaren CD3-positiven T-Zellen, sprechen gegen die Diagnose einer Myokarditis, in Abbildung 8d finden sich nur vereinzelt CD68-positiv Makrophagen. In Abbildung 8e und f ist keine Expression von PD1 und PD-L1 sichtbar, was darauf schließen lässt, dass PD1 und PD-L1 ausschließlich in Zusammenhang mit Entzündungsereignissen im Myokard exprimiert werden.



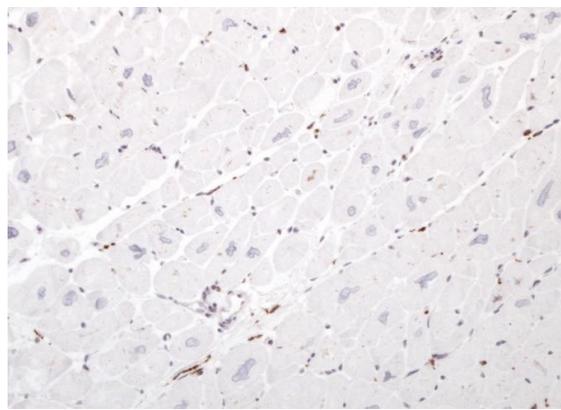
**a) Masson-Trichrom**



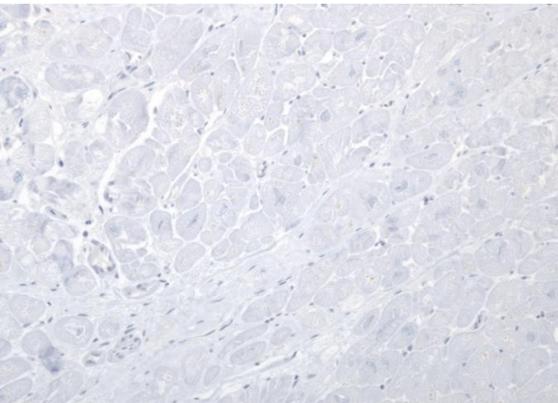
**b) Hämatoxylin-Eosin**



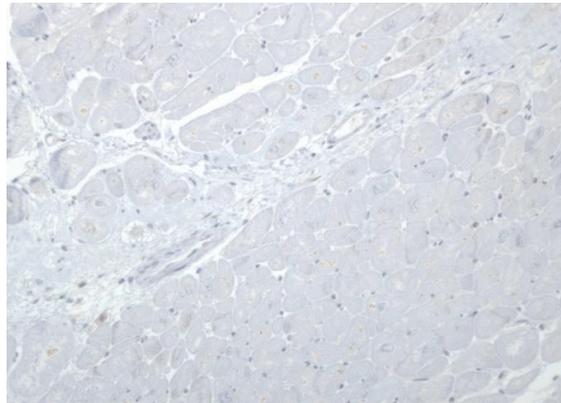
**c) CD3+ T-Zellen**



**d) CD68+ Makrophagen**



**e) PD1+ Zellen**



**f) PD-L1+ Zellen**

**Abbildung 8: Dilatative Kardiomyopathie; Originalvergrößerung x 200**

### Vergleich der CD3- und CD68- positiven Zellen in Myokarditiden

Der Kruskal-Wallis Test zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen dem CD3- Score sowie dem CD68-Score in akuten lymphozytären Myokarditiden, akuten eosinophilen Myokarditiden, chronischen lymphozytären Myokarditiden, Riesenzellmyokarditiden und der Kontrollgruppe mit jeweils  $p < 0,001$ . Ein anschließender paarweiser Vergleich zeigte, dass alle akuten Myokarditiden im Vergleich zu chronischen lymphozytären Myokarditiden signifikante Unterschiede des CD3- und CD68-Scores mit jeweils  $p < 0,001$  aufwiesen. Zudem zeigten alle akuten Myokarditiden im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant höhere CD3- und CD68- Scores mit jeweils  $p < 0,001$ . Es bestanden keine signifikanten Unterschiede des CD3- sowie des CD68-Scores zwischen akuten lymphozytären und akuten eosinophilen Myokarditiden (CD3-Score:  $p = 0,892$ , CD68-Score:  $p = 0,247$ ). Auch zwischen akuten lymphozytären Myokarditiden und Riesenzellmyokarditiden bestand kein signifikanter Unterschied des CD3- und CD68-Scores (CD3-Score:  $p = 0,055$ , CD68-Score:  $p = 0,064$ ). Zwischen akuten eosinophilen Myokarditiden und Riesenzellmyokarditiden konnte kein signifikanter Unterschied des CD3- und CD68-Scores gezeigt werden (CD3-Score:  $p = 0,074$ , CD68-Score:  $p = 0,329$ ). Auch zwischen chronischen lymphozytären Myokarditiden und der Kontrollgruppe konnten keine Unterschiede des CD3- und CD68-Scores gezeigt werden (CD3-Score:  $p = 0,128$ , CD68-Score:  $p = 0,862$ ). Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 9 und 10 dargestellt.

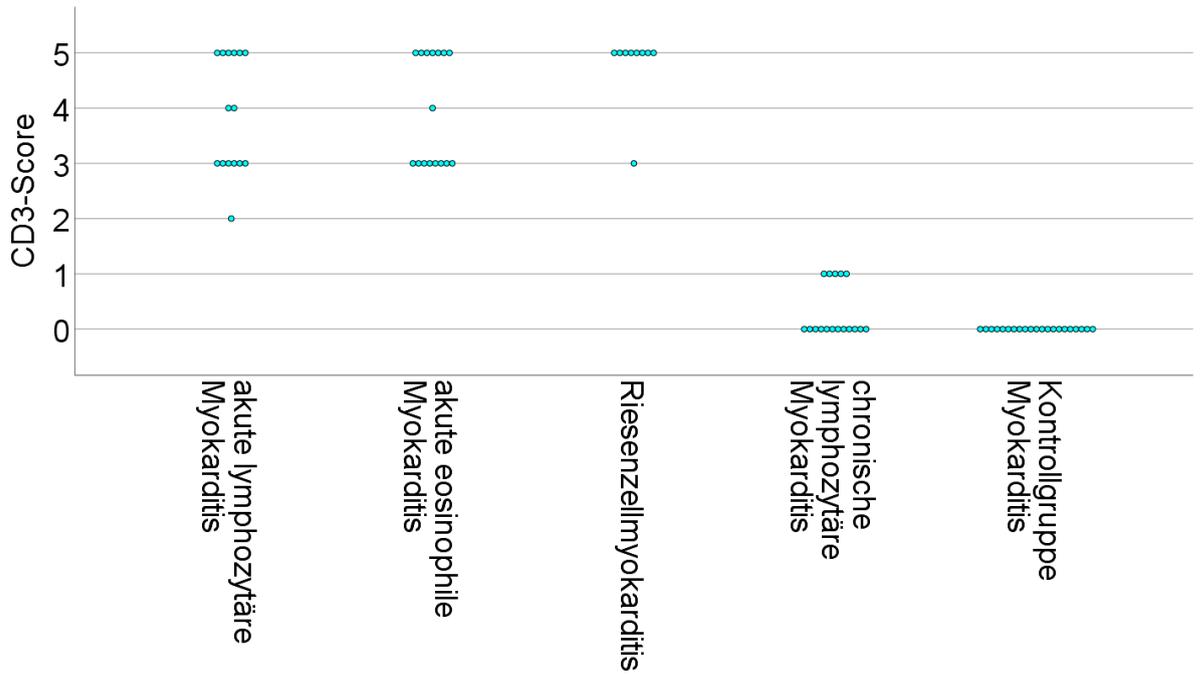


Abbildung 9: CD3-Score bei Myokarditispatienten und Kontrollpatienten

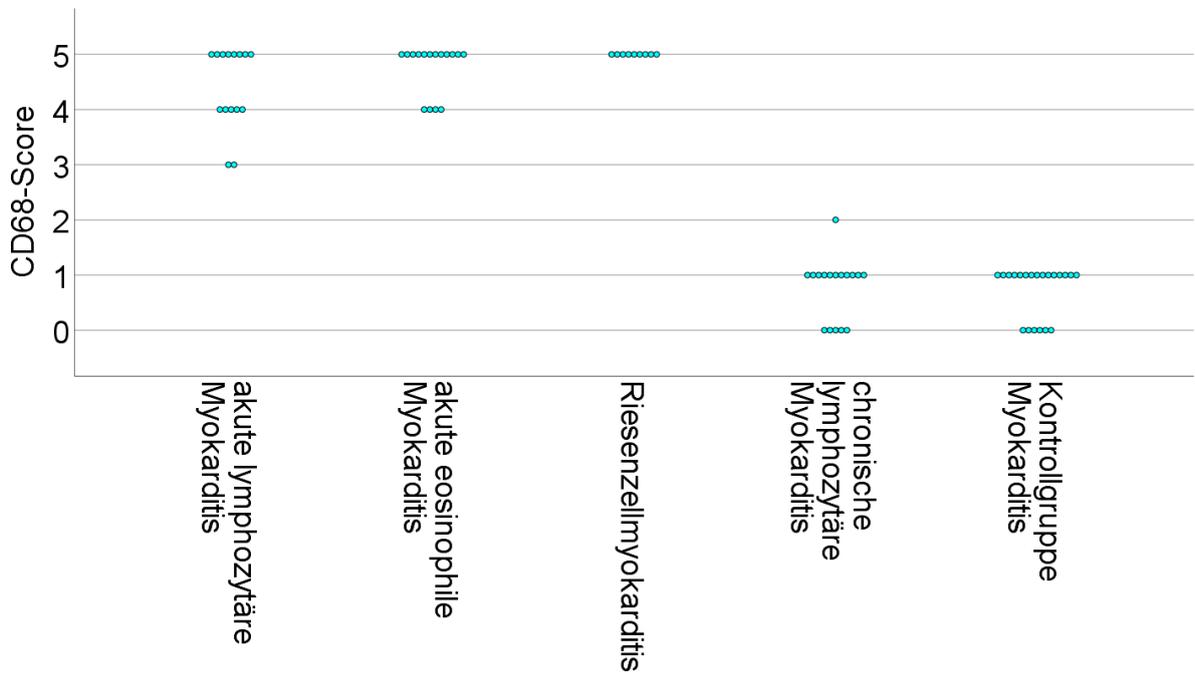


Abbildung 10: CD68-Score bei Myokarditispatienten und Kontrollpatienten

Der CD3-Score in allen Patienten mit akuten lymphozytären, akuten eosinophilen, chronischen lymphozytären und Riesenzellmyokarditiden zeigte eine stark positive, signifikante Korrelation mit dem CD68-Score (Korrelationskoeffizient nach Spearman: 0,915,  $p < 0,001$ , Kendall Tau: 0,866,  $p < 0,001$ ). Die Korrelation zwischen CD3- und CD68-Score bestand auch in den alleinig betrachteten akuten lymphozytären Myokarditiden (Korrelationskoeffizient nach Spearman: 0,928,  $p < 0,001$ , Kendall Tau: 0,873,  $p < 0,001$ ), akuten eosinophilen Myokarditiden (Korrelationskoeffizient nach Spearman: 0,562,  $p = 0,023$ , Kendall Tau: 0,548,  $p = 0,029$ ) sowie in alleinig betrachteten chronischen lymphozytären Myokarditiden (Korrelationskoeffizient nach Spearman: 0,502,  $p = 0,04$ , Kendall Tau: 0,49,  $p = 0,45$ ). In Patienten mit Riesenzellmyokarditis war eine Korrelation der CD3- und CD68-Scores nicht aussagekräftig, da alle Patienten mit Riesenzellmyokarditis einen CD68-Score von 5 hatten.

#### Vergleich der PD1-Scores in Myokarditiden

Der Kruskal-Wallis-Test zeigte einen signifikanten Unterschied des PD1-Scores zwischen akuten und chronischen Myokarditis-Patienten und der Kontrollgruppe mit einer asymptotischen Signifikanz von  $p < 0,001$ . Ein anschließender paarweiser Vergleich zeigte einen signifikanten Unterschied des PD1-Scores zwischen Patienten mit akuter lymphozytärer Myokarditis und Patienten mit Riesenzellmyokarditis ( $p = 0,035$ ). Zudem bestand ein signifikanter Unterschied der PD1-Scores zwischen Patienten mit akuter lymphozytärer Myokarditis und Patienten mit chronischer lymphozytärer Myokarditis ( $p < 0,001$ ). Auch zwischen Patienten mit akuter lymphozytärer Myokarditis und Patienten der Kontrollgruppe konnte ein signifikanter Unterschied der PD1-Scores festgestellt werden ( $p < 0,001$ ).

Es bestand ein signifikanter Unterschied der PD1-Scores zwischen Patienten mit akuter eosinophiler Myokarditis und Patienten mit Riesenzellmyokarditis ( $p = 0,023$ ) sowie zwischen Patienten mit akuter



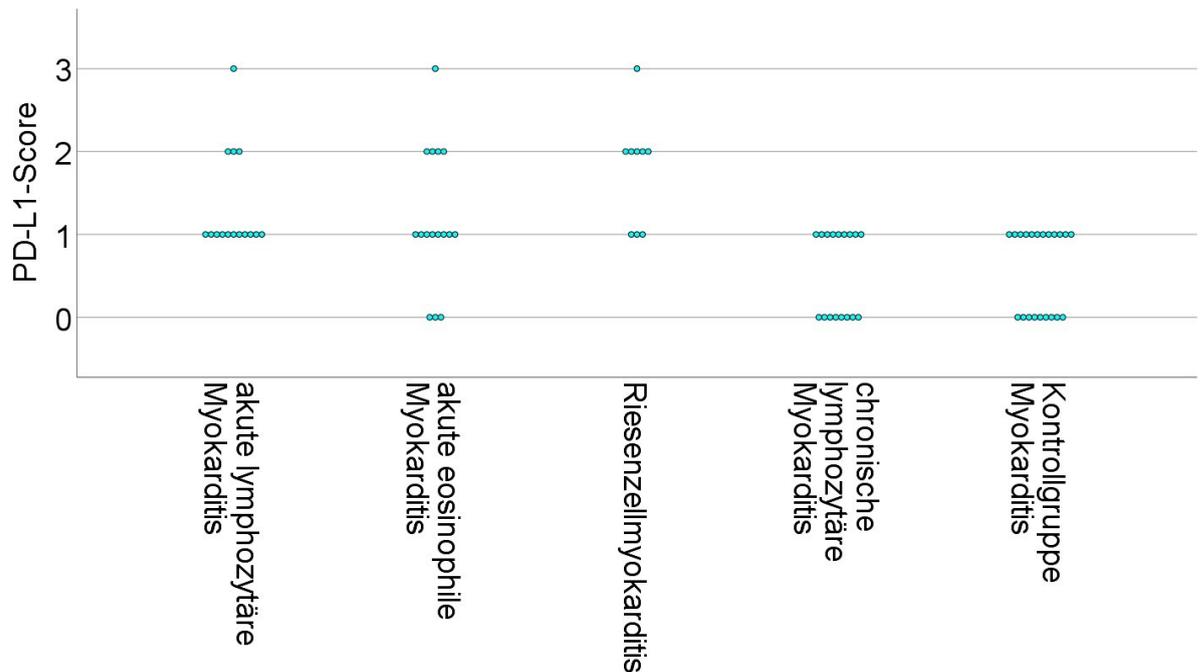
### Vergleich der PD-L1-Scores in Myokarditiden

Mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests konnte ein signifikanter Unterschied des PD-L1-Scores zwischen den Myokarditistypen sowie der Kontrollgruppe mit einer asymptotischen Signifikanz von  $p < 0,001$  gezeigt werden. Ein anschließender paarweiser Vergleich zeigte einen signifikanten Unterschied des PD-L1-Scores zwischen Patienten mit akuter lymphozytärer Myokarditis und Patienten mit chronischer lymphozytärer Myokarditis ( $p = 0,002$ ). Zudem bestand ein signifikanter Unterschied des PD-L1-Scores zwischen Patienten mit akuter lymphozytärer Myokarditis und Patienten der Kontrollgruppe ( $p = 0,003$ ).

Zwischen Patienten mit akuter eosinophiler Myokarditis und chronischer lymphozytärer Myokarditis bestand ein signifikanter Unterschied der PD-L1-Scores ( $p = 0,028$ ), auch zwischen Patienten mit akuter eosinophiler Myokarditis und Patienten der Kontrollgruppe konnte ein signifikanter Unterschied gezeigt werden ( $p = 0,029$ ).

Zwischen Patienten mit Riesenzellmyokarditis und Patienten mit chronischer lymphozytärer Myokarditis bestand ein signifikanter Unterschied des PD-L1-Scores ( $p < 0,001$ ), ebenso zwischen Patienten mit Riesenzellmyokarditis und Patienten der Kontrollgruppe ( $p < 0,001$ ).

Bezüglich des PD-L1-Scores konnte kein Unterschied zwischen Patienten mit chronischer lymphozytärer Myokarditis und Patienten der Kontrollgruppe gezeigt werden ( $p = 0,839$ ). Auch zwischen akuten lymphozytären und akuten eosinophilen Myokarditiden konnte kein Unterschied der PD-L1-Scores gezeigt werden ( $p = 0,654$ ). Die PD-L1-Scores von akuten lymphozytären Myokarditiden unterschieden sich nicht signifikant von den PD-L1-Scores der Riesenzellmyokarditiden und auch die PD-L1-Scores von akuten eosinophilen Myokarditiden zeigten keine signifikanten Unterschiede zu den PD-L1-Scores von Riesenzellmyokarditiden. Abbildung 12 zeigt die genauen PD-L1-Scorewerte aller Patienten mit Myokarditis sowie der Kontrollgruppe.



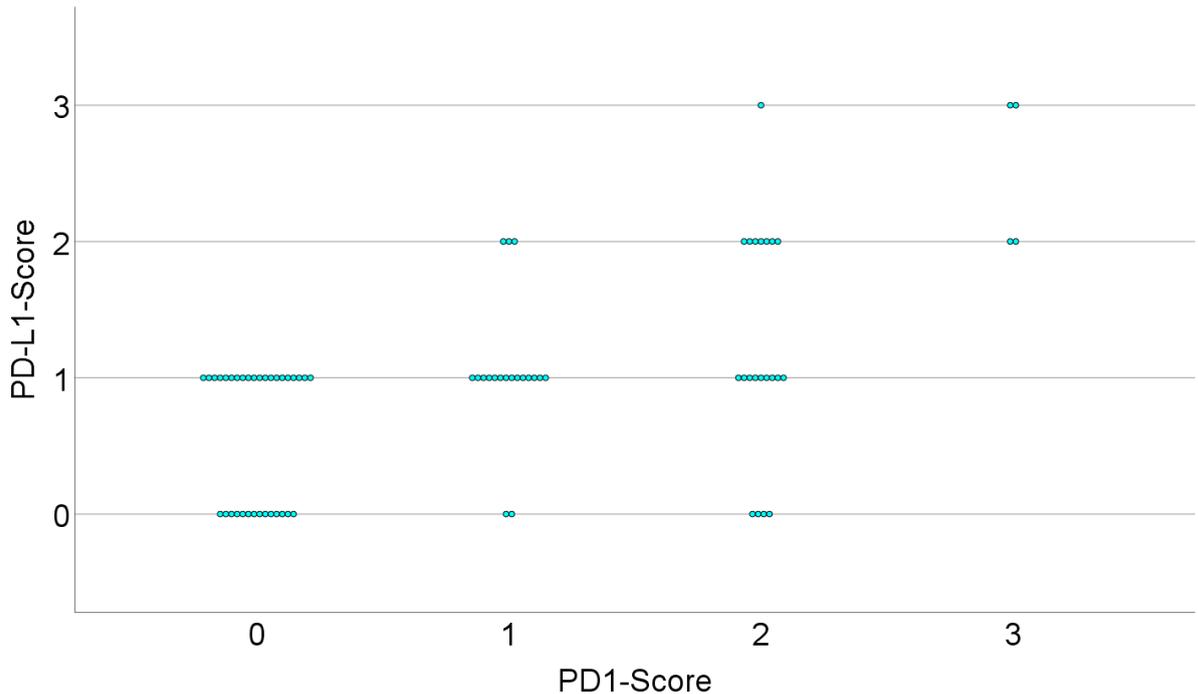
**Abbildung 12: PD-L1-Score bei Myokarditispatienten und Kontrollpatienten**

Korrelation von PD1-Score und PD-L1-Score bei Patienten mit Myokarditis

Betrachtete man alle Patienten mit akuten und chronischen Myokarditiden sowie die Kontrollgruppe zusammen, so konnte eine signifikante Korrelation zwischen PD1- und PD-L1-Score gezeigt werden ( $p < 0,001$ ). Auch in Patienten mit akuten lymphozytären und akuten eosinophilen Myokarditiden bestand eine signifikante Korrelation zwischen PD1- und PD-L1-Score. Bei ausschließlicher Betrachtung der Patienten mit Riesenzellmyokarditis, chronischer lymphozytärer Myokarditis und Patienten der Kontrollgruppe zeigte sich keine signifikante Korrelation zwischen PD1- und PD-L1-Score. Die Daten sind in Tabelle 4 und Abbildung 13 dargestellt.

**Tabelle 4: Korrelation von PD1- und PD-L1-Score in Myokarditiden**

Korrelation von PD1- und PD-L1-Score	Korrelationskoeffizient nach Spearman	p	Kendall Tau	p	Bedeutung
In allen Patienten mit Myokarditis und allen Patienten der Kontrollgruppe	0,505	<b>&lt;0,001</b>	0,463	<b>&lt;0,001</b>	Deutlich positive Korrelation, statistisch signifikant
In akuten lymphozytären Myokarditiden	0,522	<b>0,046</b>	0,513	<b>0,044</b>	Deutlich positive Korrelation, statistisch signifikant
In akuten eosinophilen Myokarditiden	0,708	<b>0,002</b>	0,676	<b>0,003</b>	Deutlich positive Korrelation, statistisch signifikant
In Riesenzell-myokarditiden	0,100	0,798	0,093	0,777	Keine Korrelation, nicht signifikant
In chronischen lymphozytären Myokarditiden	-0,265	0,304	-0,265	0,289	Mäßig negative Korrelation, nicht signifikant
In der Kontrollgruppe	-0,315	0,164	-0,315	0,159	Mäßig negative Korrelation, nicht signifikant



**Abbildung 13: Korrelation von PD1- und PD-L1-Score bei Myokarditispatienten und Kontrollpatienten**

Korrelation von CD3-/CD68-Score und PD1/PD-L1-Score in Myokarditiden

Der PD1-Score zeigte eine deutlich signifikante Korrelation mit dem CD3-Score in akuten und chronischen lymphozytären, eosinophilen und Riesenzellmyokarditiden (Korrelationskoeffizient nach Spearman: 0,716,  $p < 0,001$ , Kendall Tau: 0,647,  $p < 0,001$ ).

In allen Patienten mit akuten Myokarditiden und chronischer lymphozytärer Myokarditis zeigte sich eine deutlich positive, signifikante Korrelation zwischen PD1-Score und dem CD68-Score (Korrelationskoeffizient nach Spearman: 0,746,  $p < 0,001$ , Kendall Tau: 0,676,  $p < 0,001$ ).

Der PD-L1-Score korrelierte in allen gemeinsam betrachteten Patienten mit akuten Myokarditiden und chronischer lymphozytärer Myokarditis deutlich positiv mit dem CD3-Score (Korrelationskoeffizient nach Spearman: 0,658,  $p < 0,001$ , Kendall Tau: 0,582,  $p < 0,001$ ).

Es bestand eine deutlich positive, signifikante Korrelation zwischen PD-L1-Score und dem CD68-Score in allen untersuchten akuten und chronischen Myokarditiden (Korrelationskoeffizient nach Spearman: 0,542,  $p < 0,001$ , Kendall Tau: 0,485,  $p < 0,001$ ).

### **3.2.3 Einflussfaktoren auf den PD1-Score bei Patienten mit Myokarditis**

Tabelle 5 zeigt die Einflussfaktorenanalyse auf den PD1-Score. Hierbei wurde der Kontingenzkoeffizient mit KK abgekürzt. Die p-Werte beziehen sich auf den links davon stehenden Wert, im Falle von Cramer-V und  $\chi^2$  bezieht sich der rechts von  $\chi^2$  gelegene p-Wert sowohl auf Cramer-V als auch auf  $\chi^2$ , da diese stets identisch waren.

3.2.3.1. Einflussfaktoren auf den PD1-Score bei Patienten mit akuten und chronischen Myokarditiden und der Kontrollgruppe  
Es zeigte sich eine signifikante, mäßig negative Korrelation zwischen PD1-Score und der Dauer der Symptome, welche sich jedoch im imputierten Datensatz nicht mehr zeigen ließ. Für die Variablen Alter, Geschlecht, viraler Nukleinsäurenachweis im Myokard sowie im Blut und LVEF konnten auch nach Imputation keine signifikanten Korrelationen gezeigt werden.

**Tabelle 5: Einflussfaktoren auf akute und chronische Myokarditiden und die Kontrollgruppe - PD1-Score**

Parameter	N	Korrelationskoeffizient nach Spearman	p	Kendall Tau	p	Bedeutung
Alter	78	-0.127	0,267	-0,087	0,324	Keine Korrelation, nicht signifikant
LVEF	62	0,009	0,947	0,008	0,946	Keine Korrelation, nicht signifikant
Symptombdauer	47	-0,427	<b>0,003</b>	-0,390	<b>0,003</b>	Mäßig negative Korrelation, statistisch signifikant

Parameter	N	KK	p	CramerV	Chi <sup>2</sup>	p	Bedeutung
Geschlecht	78	0,087	0,899	0,087	0,590	0,899	Kein Zusammenhang, nicht signifikant
Virale Nukleinsäure im Myokard	78	0,102	0,848	0,102	0,804	0,848	Schwacher Zusammenhang, nicht signifikant
Virale Nukleinsäure im Blut	49	0,307	0,165	0,322	5,096	0,165	Mäßiger Zusammenhang, nicht signifikant

### 3.2.3.2. Einflussfaktoren auf den PD1-Score bei Patienten mit akuter lymphozytärer Myokarditis, akuter eosinophiler Myokarditis und Riesenzellmyokarditis

Sowohl im Originaldatensatz als auch im imputierten Datensatz zeigten die für sich betrachteten akuten lymphozytären Myokarditiden, akuten eosinophilen Myokarditiden und die Riesenzellmyokarditiden keine signifikante Korrelation zwischen PD1-Score und den Parametern Alter, Geschlecht, viraler Nukleinsäurenachweis im Myokard sowie im Blut, LVEF und Symptombdauer.

### 3.2.3.3. Einflussfaktoren auf den PD1-Score bei Patienten mit chronischer lymphozytärer Myokarditis

In chronischen lymphozytären Myokarditiden bestanden sowohl im Originaldatensatz als auch im imputierten Datensatz keine signifikanten Korrelationen zwischen dem PD1-Score und den Parametern Alter, Geschlecht, viraler Nukleinsäurenachweis im Myokard sowie im Blut und LVEF. Die Symptombdauer zeigte im Originaldatensatz eine negative Korrelation mit dem PD1-Score (Korrelationskoeffizient nach Spearman=-1,0,  $p < 0,001$ ), welche jedoch im imputierten Datensatz nicht mehr gezeigt werden konnte.

## **3.2.4. Einflussfaktoren auf den PD-L1-Score bei Patienten mit Myokarditis**

### 3.2.4.1. Einflussfaktoren auf den PD-L1-Score bei Patienten mit akuten und chronischen Myokarditiden und der Kontrollgruppe

Weder im Originaldatensatz noch nach Imputation zeigten sich signifikante Korrelationen zwischen PD-L1-Score und den Parametern Alter, Geschlecht, Dauer der Symptome, viraler Nukleinsäurenachweis im Myokard sowie im Blut und LVEF. Tabelle 6 veranschaulicht die Daten (der p-Wert war für  $\chi^2$  und Cramer-V identisch).

#### 3.2.4.2. Einflussfaktoren auf den PD-L1-Score bei Patienten mit akuter lymphozytärer Myokarditis, akuter eosinophiler Myokarditis und Riesenzellmyokarditis

Die Korrelation von PD-L1-Score und dem Parameter Alter zeigte in akuten lymphozytären Myokarditiden eine signifikante, deutlich positive Korrelation (Korrelationskoeffizient nach Spearman=0,574,  $p=0,025$ , Kendall Tau = 0,493,  $p=0,027$ ). Alle weiteren Korrelationen des PD-L1-Scores mit den Parametern Geschlecht, viraler Nukleinsäurenachweis im Myokard sowie im Blut, Symptombdauer und LVEF erbrachten in Patienten mit akuter lymphozytärer Myokarditis weder im Originaldatensatz noch im imputierten Datensatz signifikante Ergebnisse.

In Patienten mit akuter eosinophiler Myokarditis verfehlte die Korrelation zwischen PD-L1-Score und dem Parameter viraler Nukleinsäurenachweis im Myokard knapp das Signifikanzniveau (KK=0,555  $p=0,068$ , Cramer-V=0,667,  $\chi^2=7,111$ ,  $p=0,068$ ). Die Korrelationen zwischen PD-L1-Score und den Parametern Alter, Geschlecht, viraler Nukleinsäurenachweis im Blut, LVEF und Symptombdauer waren für Patienten mit akuter eosinophiler Myokarditis weder im Originaldatensatz noch im imputierten Datensatz signifikant.

Sowohl im Originaldatensatz als auch im imputierten Datensatz zeigten die für sich betrachteten Riesenzellmyokarditiden keine signifikante Korrelation zwischen PD-L1-Score und den Parametern Alter, Geschlecht, viraler Nukleinsäurenachweis im Myokard sowie im Blut, LVEF und Symptombdauer.

#### 3.2.4.3. Einflussfaktoren auf den PD-L1-Score bei Patienten mit chronischer lymphozytärer Myokarditis

In Patienten mit chronischer lymphozytärer Myokarditis bestand ein signifikanter Zusammenhang zwischen PD-L1-Score und Geschlecht (KK=0,547,  $p=0,007$ , Cramer-V=0,653,  $\chi^2=7,244$ ,  $p=0,007$ ). Zwischen PD-L1-Score und den Parametern Alter, viralem Nukleinsäurenachweis

im Myokard sowie im Blut, LVEF und Symptombdauer bestanden im Originaldatensatz und im imputierten Datensatz für chronische lymphozytäre Myokarditiden keine signifikanten Korrelationen.

**Tabelle 6: Einflussfaktoren auf akute und chronische Myokarditiden und die Kontrollgruppe - PD-L1-Score**

Parameter	N	Korrelationskoeffizient nach Spearman	p	Kendall Tau	p	Bedeutung
Alter	78	-0,009	0,937	-0,006	0,943	Keine Korrelation, nicht signifikant
LVEF	62	0,108	0,403	-0,097	0,401	Keine Korrelation, nicht signifikant
Symptombdauer	47	-0,154	0,301	-0,138	0,291	Keine Korrelation, nicht signifikant

Parameter	N	KK	p	CramerV	Chi <sup>2</sup>	p	Bedeutung
Geschlecht	78	0,238	0,198	0,245	4,671	0,198	Schwacher Zusammenhang, nicht signifikant
Virale Nukleinsäure im Myokard	78	0,109	0,817	0,109	0,934	0,817	Schwacher Zusammenhang, nicht signifikant
Virale Nukleinsäure im Blut	49	0,207	0,535	0,211	2,185	0,535	Schwacher Zusammenhang, nicht signifikant

### **3.3. Untersuchung bei Patienten nach Herztransplantation**

#### **3.3.1. Charakteristika des untersuchten Kollektivs - Alter und Geschlecht**

##### Akute zelluläre Abstoßungsreaktion Grad 2R

Unter den Patienten mit akuter zellulärer Abstoßungsreaktion Grad 2R waren neun männliche Patienten (64,29%) und fünf weibliche Patientinnen (35,71%), das mittlere Alter des Kollektivs lag bei 25,5 Jahren mit einer Standardabweichung von 16,89. Der Median aller Patienten mit akuter zellulärer Abstoßungsreaktion Grad 2R lag bei 18 Jahren, der Interquartilsabstand betrug 13,25. Der älteste Patient mit akuter zellulärer Abstoßungsreaktion Grad 2R war 65 Jahre, der jüngste 14 Jahre alt.

Insgesamt waren sechs der Patienten (42,86%) mit akuter zellulärer Abstoßungsreaktion Grad 2R weniger als ein Jahr transplantiert, bei sechs Patienten (42,86%) lag die Herztransplantation mindestens ein Jahr, jedoch weniger als fünf Jahre zurück. Bei zwei Patienten (14,29%) mit akuter zellulärer Abstoßungsreaktion Grad 2R lag die Herztransplantation mindestens fünf, jedoch weniger als zehn Jahre zurück.

Bei fünf Patienten (35,71%) mit akuter zellulärer Abstoßungsreaktion Grad 2R wurde eine LVEF von mindestens 50% angegeben. In einem Patienten (7,14%) mit akuter zellulärer Abstoßungsreaktion Grad 2R lag die LVEF über 40% aber unter 50%. In fünf Patienten (35,71%) mit akuter zellulärer Abstoßungsreaktion Grad 2R lag die LVEF unter 40%, wovon drei Patienten (21,43%) eine LVEF von  $\leq 20\%$  hatten. Von den restlichen drei Patienten (21,43%) mit akuter zellulärer Abstoßungsreaktion Grad 2R lagen diesbezüglich keine Messwerte vor.

In sechs Patienten (42,86%) mit akuter zellulärer Abstoßungsreaktion Grad 2R konnte ein positiver Nachweis viraler Nukleinsäuren im Myokard erbracht werden, wobei in fünf Fällen (35,71%) EBV DNA und in einem Fall (7,14%) HHV6 DNA nachgewiesen wurde.

Ebenfalls bei sechs Patienten (42,86%) mit akuter zellulärer Abstoßungsreaktion Grad 2R fand sich virale Nukleinsäure im Blut, in drei Fällen (21,43%) wurden keine Blutproben übersandt. Bei den Patienten mit akuter zellulärer Abstoßungsreaktion Grad 2R konnte in vier Patienten (28,57%) EBV DNA, in einem Patienten (7,14%) EBV und HHV7 DNA und in einem weiteren Patienten HHV6 und HHV7 DNA im Blut nachgewiesen werden.

### Kontrollgruppe

Innerhalb der Kontrollgruppe, welche aus Patienten nach Herztransplantation ohne akute zelluläre Abstoßung entsprechend Grad 0R bestand, waren 13 Patienten (65%) männlich und sieben (35%) weiblich, der Mittelwert des Alters lag bei 43,65 Jahren mit einer Standardabweichung von 20,54 Jahren. Der Median des Alters der Kontrollgruppe war 52, der Interquartilsabstand betrug 33,25. Der älteste Patient der Kontrollgruppe war 72 Jahre, der jüngste zehn Jahre alt.

Drei Patienten (15%) der Kontrollgruppe waren weniger als ein Jahr transplantiert, bei ebenfalls drei Patienten lag die Herztransplantation mindestens ein Jahr, jedoch weniger als fünf Jahre zurück. Bei fünf Patienten (25%) der Kontrollgruppe lag die Transplantation fünf bis maximal zehn Jahre zurück, weitere zwei Patienten (10%) hatten ihr Transplantat seit über zehn aber unter 15 Jahren. Bei drei Patienten (15%) lag die Transplantation über 15 Jahre zurück, in vier Fällen waren keine Daten über den Transplantationszeitpunkt verfügbar.

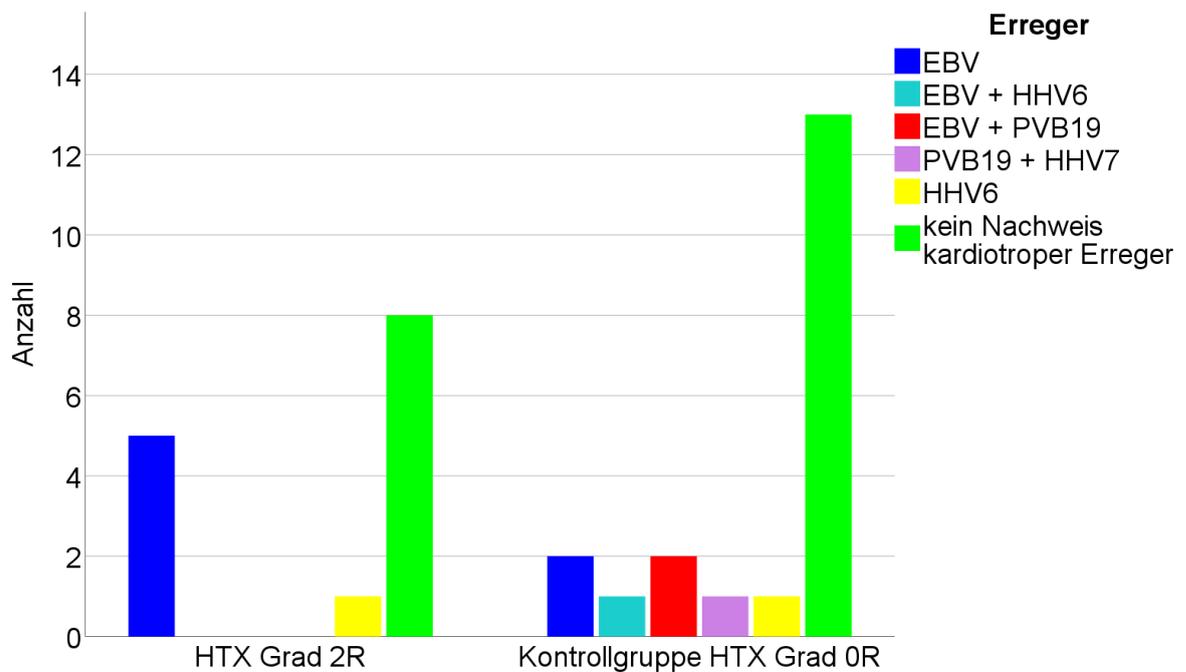
Für alle Patienten der Kontrollgruppe lagen keine Daten zur LVEF vor.

In der Kontrollgruppe konnte im Myokard von sieben Patienten (35%) virale Nukleinsäure nachgewiesen werden. EBV DNA wurde in der Kontrollgruppe im Myokard von fünf Patienten nachgewiesen, in zwei dieser Fälle (10%) wurde zusätzlich PVB19 DNA, in einem Fall (5%) zusätzlich HHV6 DNA nachgewiesen. Ein weiterer Patient der Kontrollgruppe wies HHV6 DNA im Myokard auf, ein Patient PVB19 und

HHV7 DNA.

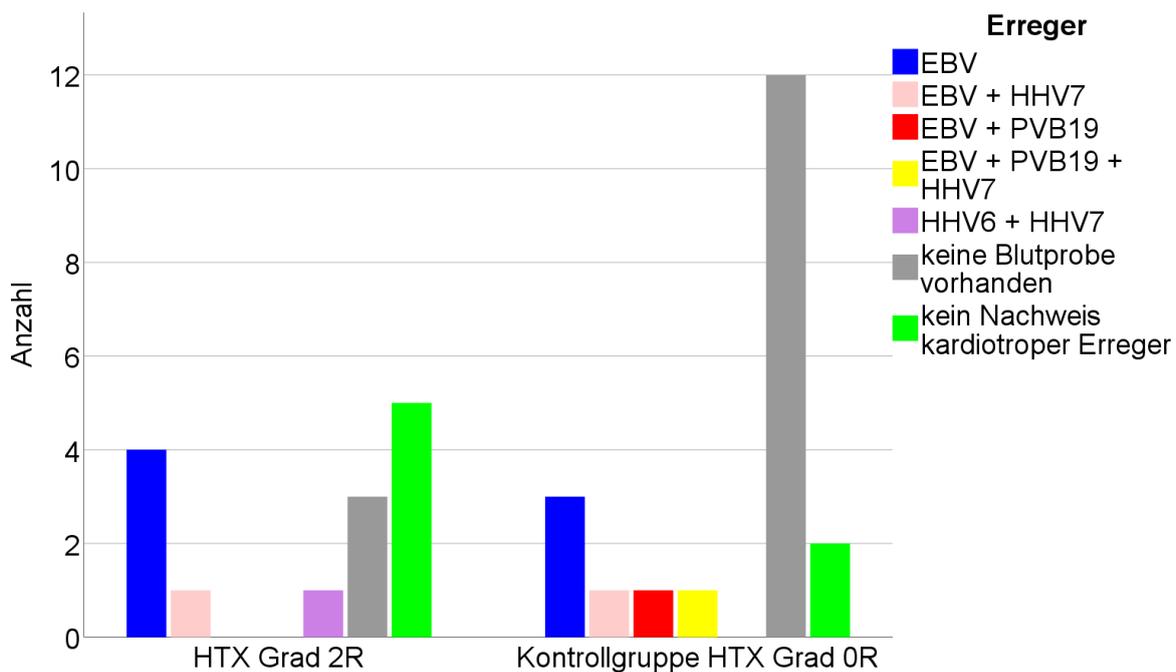
Sechs Patientenblutproben (30%) der Kontrollgruppe wiesen virale Nukleinsäure auf, in zwölf Fällen (60%) waren keine Blutproben vorhanden. In der Kontrollgruppe wurde in allen Patienten mit positivem DNA Nachweis im Blut EBV DNA identifiziert, wobei jeweils in einem Patienten (5%) zusätzlich PVB19 DNA, HHV7 DNA und in einem Patienten alle drei genannten viralen Nukleinsäuren nachgewiesen wurden.

Die häufigste im Myokard nachweisbare Nukleinsäure war somit in beiden Gruppen EBV, die Ergebnisse sind in Abbildung 14 veranschaulichend dargestellt.



**Abbildung 14: Nachweis von Nukleinsäuren kardiotroper Erreger im Myokard bei Patienten nach Herztransplantation**

Die Verteilungen der viralen Nukleinsäuren im Blut sind in Abbildung 15 dargestellt, das vorherrschende Virus war EBV.



**Abbildung 15: Nachweis von Nukleinsäuren kardiotroper Erreger im Blut bei Patienten nach Herztransplantation**

### **3.3.2. Expression von PD1 und PD-L1 im Myokard bei Patienten nach Herztransplantation**

Es wurden immunhistochemische Färbungen durchgeführt, um die PD1- und PD-L1- Expression im Myokard im Rahmen von akuten zellulären Abstoßungsreaktionen Grad 2R mit der Expression von PD1 und PD-L1 in Herztransplantaten ohne Abstoßungsreaktion zu vergleichen. Die PD1- und PD-L1-Expression wurde mit Hilfe des PD1- und PD-L1-Scores quantifiziert.

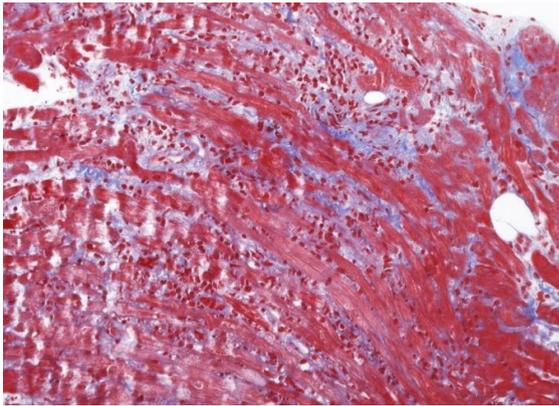
#### Akute zelluläre Abstoßungsreaktion Grad 2R

Einem Patienten (7,14%) mit akuter zellulärer Abstoßungsreaktion Grad 2R wurde der PD1-Score 1 zugeordnet, acht Patienten (57,15%) wurden mit dem Score 2 eingestuft. Fünf Patienten (35,71%) mit akuter zellulärer Abstoßungsreaktion Grad 2R erhielten den PD1-Score 3. Der Median des PD1-Scores der Patienten mit akuter zellulärer Abstoßungsreaktion

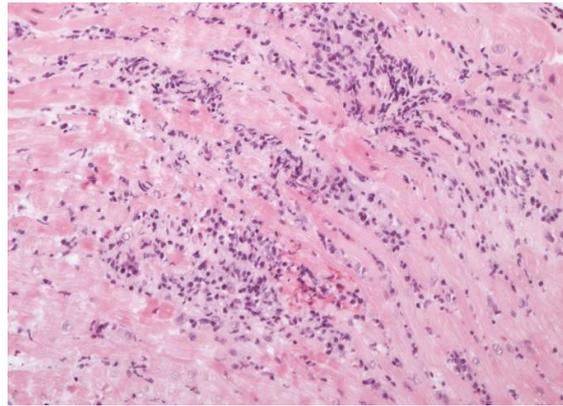
Grad 2R war 2, der Interquartilsabstand betrug 1.

Fünf Patienten (35,71%) mit akuter zellulärer Abstoßungsreaktion Grad 2R zeigten einen PD-L1-Score von 0, neun Patienten (64,29%) zeigten den Score 1. Der Median des PD-L1-Scores für Patienten mit akuter zellulärer Abstoßungsreaktion Grad 2R lag bei 1, der Interquartilsabstand betrug 1.

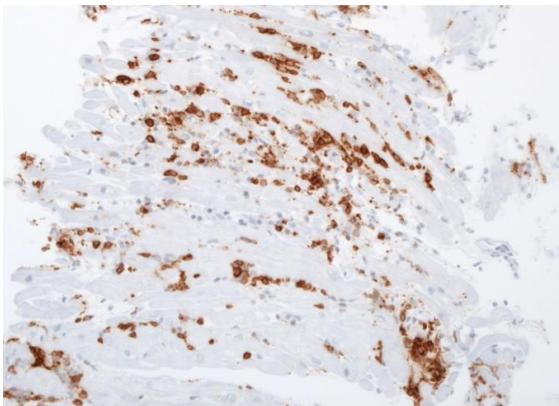
Abbildung 16a zeigt bläulich angefärbte fibrotische Areale mit deutlicher Infiltration zahlreicher Immunzellen sowie zahlreiche nekrotische Myozyten. Die infiltrierenden Zellen liegen, wie in Abbildung 16b ersichtlich, meist herdförmig vor, entsprechend einer Abstoßungsreaktion Grad 2R. Die immunhistochemischen Bilder 16c+d+e zeigen sehr viele braun gefärbte CD3-positive T-Zellen, CD68-positive Makrophagen sowie eine deutliche Anfärbung von PD1 in Immunzellen. In Abbildung 16f ist eine schwache Anfärbung von PD-L1 in Myozyten ersichtlich, entsprechend dem PD-L1- Score 1.



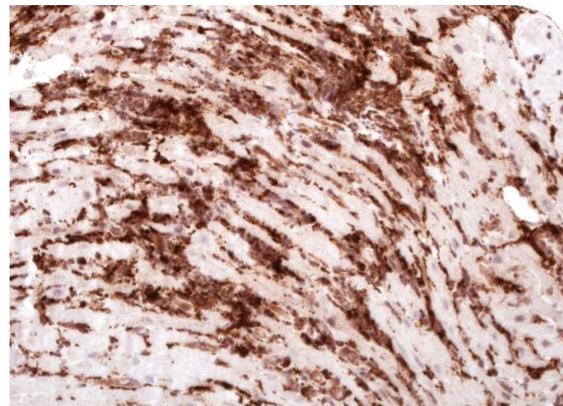
**a) Masson-Trichrom**



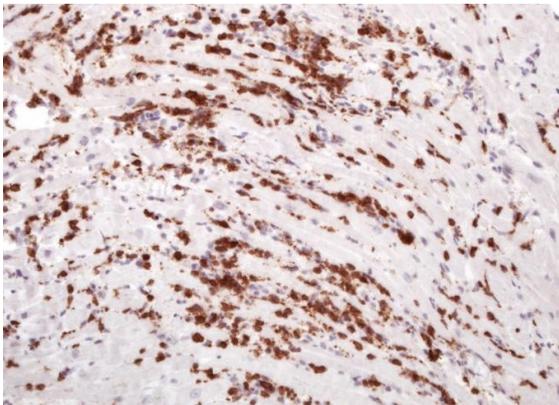
**b) Hämatoxylin-Eosin**



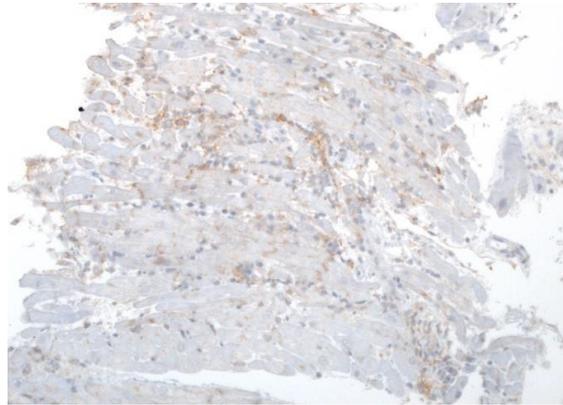
**c) CD3+ T-Zellen**



**d) CD68+ Makrophagen**



**e) PD1+ Zellen**



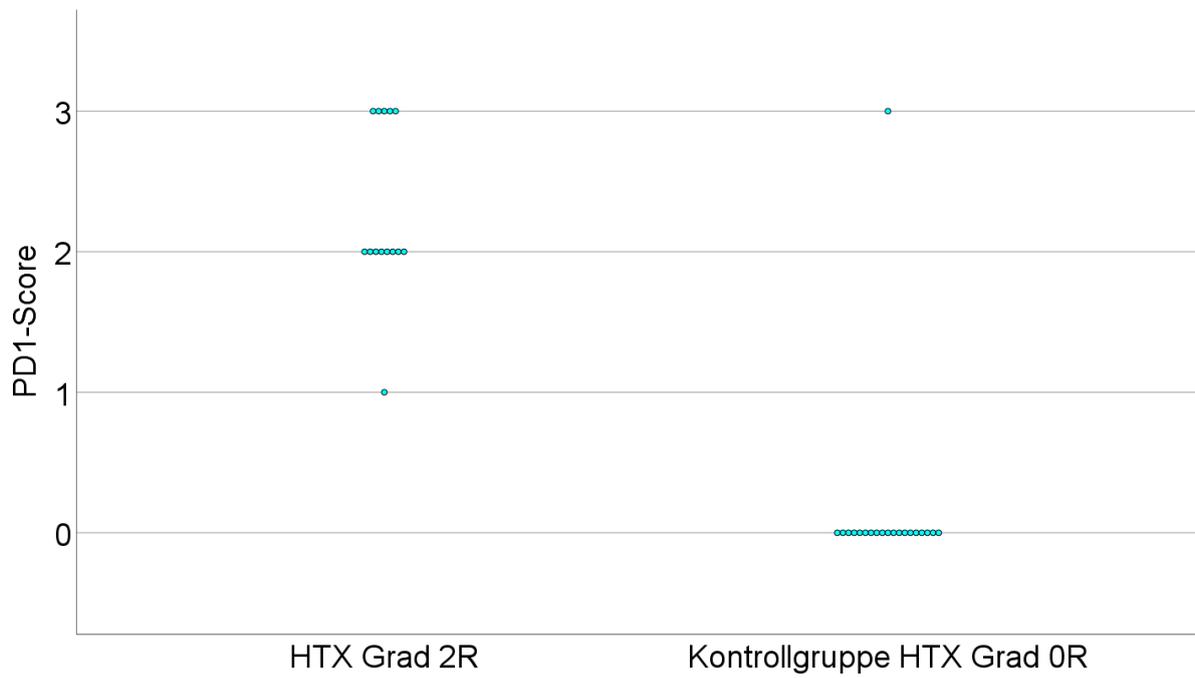
**f) PD-L1+ Zellen**

**Abbildung 16: Akute zelluläre Abstoßungsreaktion Grad 2R;  
Originalvergrößerung x 200**

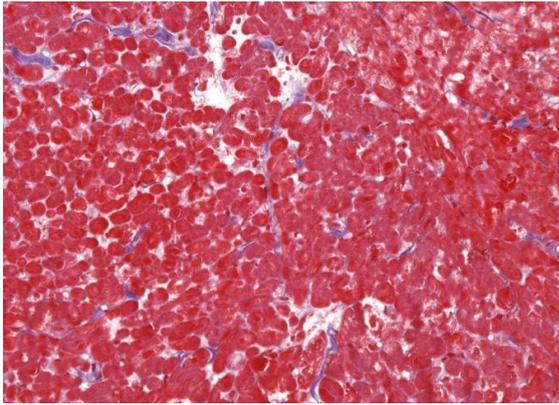
### Kontrollgruppe

In der Kontrollgruppe hatten 19 Patienten (95%) den PD1-Score 0, ein Patient (5%) hatte den PD1-Score 3. Der Median sowie der Interquartilsabstand des PD1-Scores der Kontrollgruppe betragen 0. Der Mann-Whitney-U-Test zeigte einen signifikanten Unterschied des PD1-Scores zwischen Patienten mit akuter zellulärer Abstoßungsreaktion Grad 2R und der Kontrollgruppe mit  $p < 0,001$ . Die genauen PD1-Scorewerte für alle Patienten mit Herztransplantat sind in Abbildung 17 dargestellt. Innerhalb der Kontrollgruppe erhielten alle 20 Patienten den PD-L1-Score 0.

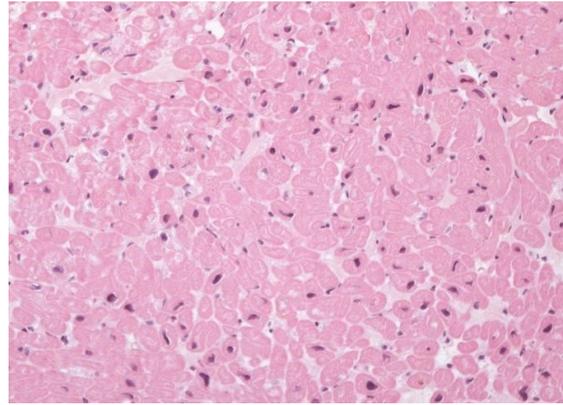
Im Vergleich zu Abbildung 16 zeigt das in Abbildung 18a+b auf der übernächsten Seite dargestellte Präparat eines Patienten der Kontrollgruppe keine Entzündungszeichen, keine Myozytennekrosen und einen geringeren Grad der Fibrosierung. Auch die immunhistochemischen Färbungen in Abbildung 18c-f zeigen keine infiltrierenden Immunzellen, weder PD1 noch PD-L1 konnten immunhistochemisch nachgewiesen werden. Ein transplantiertes Herz ohne akute Abstoßungsreaktion zeigt somit im Vergleich zu einer akuten zellulären Abstoßungsreaktion Grad 2R keine Expression von PD1 und PD-L1.



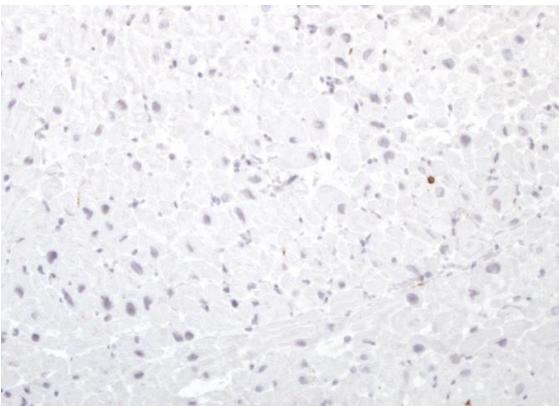
**Abbildung 17: PD1-Score bei Patienten mit akuter zellulärer Abstoßungsreaktion Grad 2R und Kontrollpatienten**



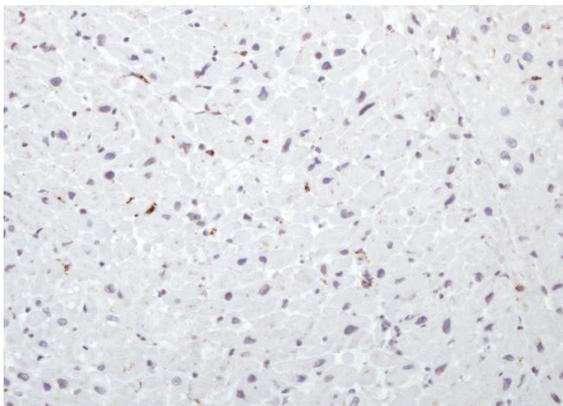
**a) Masson-Trichrom**



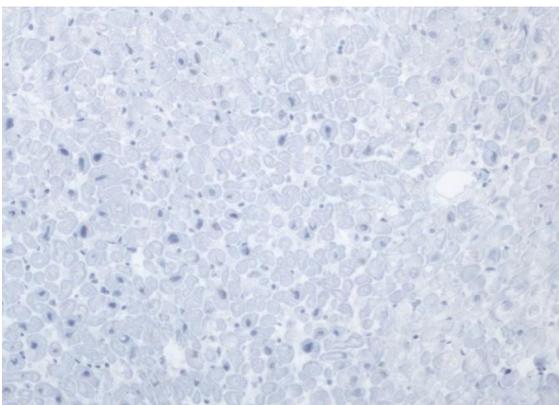
**b) Hämatoxylin-Eosin**



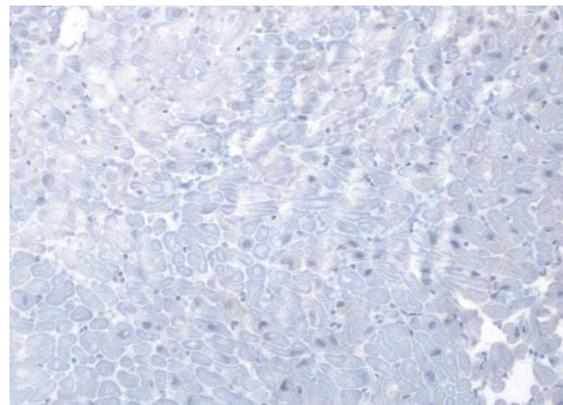
**c) CD3+ T-Zellen**



**d) CD68+ Makrophagen**



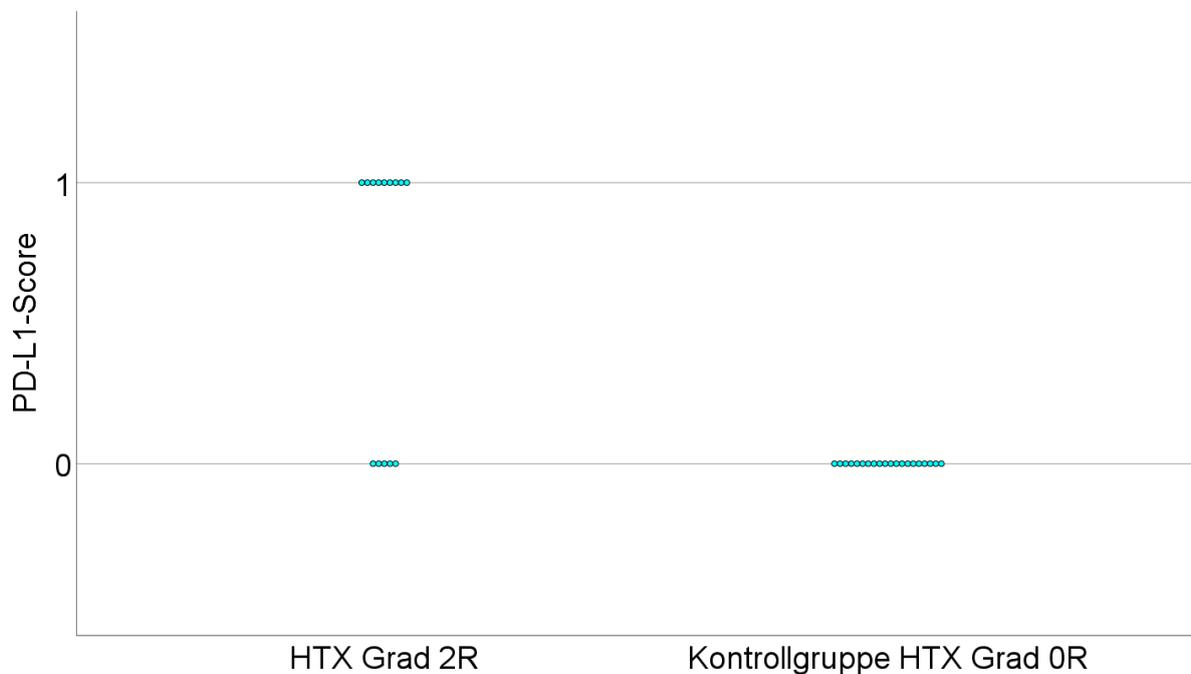
**e) PD1+ Zellen**



**f) PD-L1+ Zellen**

**Abbildung 18: Biopsie nach Herztransplantation ohne Abstoßungsreaktion entsprechend Grad 0R;  
Originalvergrößerung x 200**

Der Vergleich der PD-L1-Scores der Patienten mit akuter zellulärer Abstoßungsreaktion Grad 2R und der Patienten der Kontrollgruppe mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests ergab einen signifikanten Unterschied mit  $p=0,001$ . Die genauen PD-L1-Scorewerte für alle Patienten mit Herztransplantat sind in Abbildung 19 dargestellt.



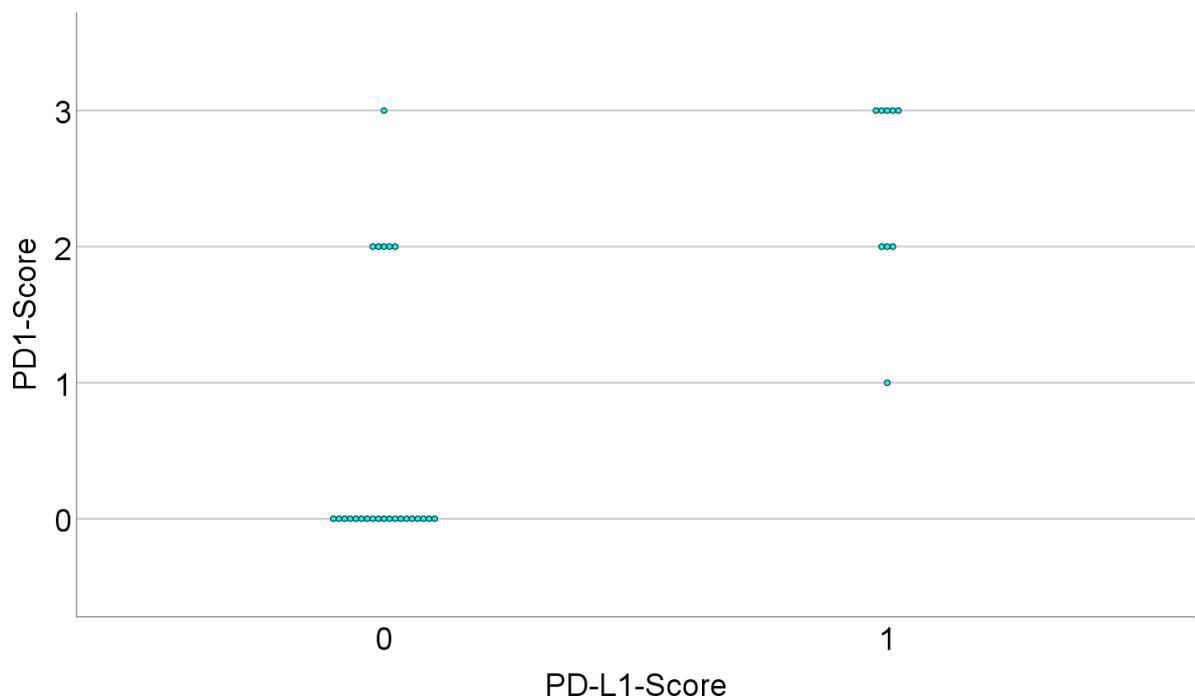
**Abbildung 19: PD-L1-Score bei Patienten mit akuter zellulärer Abstoßungsreaktion Grad 2R und Kontrollpatienten**

#### Korrelation von PD1- und PD-L1-Score bei Patienten nach Herztransplantation

Betrachtet man alle Patienten mit Herztransplantation konnte eine signifikante deutlich positive Korrelation zwischen PD1- und PD-L1-Score mit  $p<0,001$  gezeigt werden. Bei ausschließlicher Auswertung der Patienten mit akuter zellulärer Abstoßungsreaktion Grad 2R zeigte sich keine signifikante Korrelation für den PD1- und den PD-L1-Score. Eine Korrelation von PD1- und PD-L1-Score in ausschließlich Patienten der Kontrollgruppe war nicht aussagekräftig, da der PD-L1-Score eine Konstante darstellte. Tabelle 7 und Abbildung 20 zeigen die Ergebnisse.

**Tabelle 7: Korrelation von PD1- und PD-L1-Score bei Patienten nach Herztransplantation**

Korrelation von PD1- und PD-L1-Score	Korrelationskoeffizient nach Spearman	p	Kendall Tau	p	Bedeutung
In Patienten mit akuter zellulärer Abstoßungsreaktion Grad 2R und Patienten ohne Abstoßungsreaktion	0,707	<b>&lt;0,001</b>	0,669	<b>&lt;0,001</b>	Deutlich positive Korrelation, statistisch signifikant
In Patienten mit akuter zellulärer Abstoßungsreaktion Grad 2R	0,506	0,054	0,482	0,058	Deutlich positive Korrelation, nicht signifikant



**Abbildung 20: Korrelation von PD1- und PD-L1-Score bei Patienten mit akuter zellulärer Abstoßungsreaktion Grad 2R und Kontrollpatienten**

### 3.3.3. Einflussfaktoren auf den PD1-Score bei Patienten nach Herztransplantation

Es zeigte sich eine signifikante, mäßig negative Korrelation zwischen PD1-Score und dem Alter der Patienten. Zudem bestand eine signifikante, mäßig negative Korrelation zwischen dem PD1-Score und der vergangenen Zeit nach Transplantation. Zwischen dem PD1-Score und den Variablen Geschlecht, viralem Nukleinsäurenachweis im Myokard und im Blut sowie LVEF konnten keine signifikanten Korrelationen gefunden werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 dargestellt (der p-Wert war für Chi<sup>2</sup> und Cramer-V identisch).

**Tabelle 8: Einflussfaktoren auf Patienten nach Herztransplantation - PD1-Score**

Parameter	N	Korrelationskoeffizient nach Spearman	p	Kendall Tau	p	Bedeutung
Alter	34	-0,392	<b>0,022</b>	-0,305	<b>0,027</b>	Mäßig negative Korrelation, statistisch signifikant
LVEF	11	-0,177	0,603	-0,152	0,609	Keine Korrelation, nicht signifikant
Zeit nach HTX	30	-0,477	<b>0,008</b>	-0,395	<b>0,013</b>	Mäßig negative Korrelation, statistisch signifikant

Parameter	N	KK	p	CramerV	Chi <sup>2</sup>	p	Bedeutung
Geschlecht	34	0,131	0,898	0,132	0,593	0,898	Schwacher Zusammenhang, nicht signifikant
Virale Nukleinsäure im Myokard	34	0,168	0,804	0,170	0,988	0,804	Schwacher Zusammenhang, nicht signifikant
Virale Nukleinsäure im Blut	19	0,404	0,294	0,442	3,713	0,294	Mäßiger Zusammenhang, nicht signifikant

Die erneute Korrelation des PD1-Scores mit imputiertem Datensatz mit den Parametern LVEF und viralem Nukleinsäurenachweis im Blut ergab keine signifikanten Ergebnisse. Zwischen dem PD1-Score und dem Parameter Zeit nach Transplantation konnte auch im imputierten Datensatz eine signifikante Korrelation gezeigt werden (Korrelationskoeffizient nach Spearman=-0,491,  $p=0,005$ , Kendall Tau=0,407,  $p=0,023$ ).

Für die allein betrachteten Patienten mit akuter zellulärer Abstoßungsreaktion Grad 2R konnten keine signifikanten Korrelationen des PD1-Scores zu den getesteten Parametern Alter, Geschlecht, LVEF, viralem Nukleinsäurenachweis im Myokard sowie im Blut und Zeit nach Transplantation gefunden werden, auch die erneute Korrelation mit imputiertem Datensatz ergab bei allen getesteten Parametern keine signifikanten Ergebnisse.

### **3.3.4. Einflussfaktoren auf den PD-L1-Score bei Patienten nach Herztransplantation**

Bei den gemeinsam betrachteten Patienten mit akuter zellulärer Abstoßungsreaktion Grad 2R und 0R konnte kein Zusammenhang zwischen dem PD-L1-Score und den Parametern Alter, LVEF, viraler Nukleinsäurenachweis im Myokard sowie im Blut und Geschlecht nachgewiesen werden. Die Korrelation zwischen PD-L1-Score und vergangener Zeit nach Transplantation verfehlte das Signifikanzniveau knapp. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 auf der folgenden Seite dargestellt (der p-Wert war für Chi<sup>2</sup> und Cramer-V identisch). Die erneute Korrelation des PD-L1-Scores mit den Parametern LVEF und viralem Nukleinsäurenachweis im Blut ergab auch im imputierten Datensatz keine signifikanten Ergebnisse. Im imputierten Datensatz zeigte sich jedoch eine signifikante, mäßig negative Korrelation zwischen dem PD-L1-Score und der vergangenen Zeit nach Transplantation (Korrelationskoeffizient nach Spearman=-0,370, p=0,04, Kendall Tau=-0,336, p=0,065).

Für Patienten mit akuter zellulärer Abstoßungsreaktion Grad 2R konnten sowohl mit den Originaldaten als auch mit imputiertem Datensatz keine signifikanten Zusammenhänge zwischen den getesteten Parametern Alter, Geschlecht, Zeit nach Transplantation, LVEF, viraler Nukleinsäurenachweis im Myokard sowie im Blut und dem PD-L1-Score identifiziert werden.

**Tabelle 9: Einflussfaktoren auf Patienten nach Herztransplantation  
- PD-L1- Score**

Parameter	N	Korrelations- koeffizient nach Spearman	p	Kendall Tau	p	Bedeutung
Alter	34	-0,190	0,281	-0,159	0,274	Keine Korrelation, nicht signifikant
LVEF	11	0,396	0,227	0,383	0,210	Mäßig positive Korrelation, nicht signifikant
Zeit nach HTX	30	-0,361	0,05	-0,328	0,052	Mäßig negative Korrelation, nicht signifikant

Parameter	N	KK	p	CramerV	Chi <sup>2</sup>	p	Bedeutung
Geschlecht	34	0,114	0,503	0,115	0,449	0,503	Schwacher Zusammenhang, nicht signifikant
Virale Nuklein- säure im Myokard	34	0,076	0,655	0,077	0,200	0,655	Kein Zusammenhang, nicht signifikant
Virale Nuklein- säure im Blut	19	0,012	0,960	0,012	0,003	0,960	Kein Zusammenhang, nicht signifikant

## **4. Diskussion**

### **4.1. Expression von PD1 und PD-L1 in Patienten mit Myokarditiden und in Patienten nach Herztransplantation**

Es konnte gezeigt werden, dass die PD1- und PD-L1-Expression in allen akuten Myokarditistypen im Vergleich zu chronischen lymphozytären Myokarditiden und zur Kontrollgruppe signifikant erhöht waren. Die erhöhte Expression von PD1 und PD-L1 in akuten Myokarditiden könnte Folge der Entzündung und des Versuchs des Myokards sein, die teils überschießende Immunantwort zu drosseln. Studien zu PD1- negativen Mäusen, welche alle gravierendere Myokarditiden entwickelten als PD1-positive Versuchstiere, sprechen für die negativ immunmodulierende Rolle des PD1- PD-L1-Signalwegs (Tarrío et al., 2012, Wang et al., 2010b). Vergleichbares konnte auch für PD-L1-negative Versuchstiere gezeigt werden (Lucas et al., 2008). Eine Erhöhung der PD1- und PD-L1-Expression wurde bislang nicht in menschlichen Myokarditispräparaten untersucht. Studien an Ratten konnten eine erhöhte PD1- und PD-L1-Expression im Myokard nach ischämischen Ereignissen mit Reperfusion zeigen, was nahelegt, dass Entzündungsmediatoren, welche beim Zelluntergang freigesetzt werden, über parakrine Verteilungsmechanismen Einfluss auf die PD1- und PD-L1-Expression nehmen (Baban et al., 2015). Welche Zytokine hierbei involviert sind, ist noch nicht abschließend geklärt, ein starker Einfluss von Interferonen auf die Expression von PD-L1, insbesondere von Interferon- $\gamma$ , sowie ein geringerer Einfluss auf die PD-L2-Expression scheint wahrscheinlich (García-Díaz et al., 2017). Interferon- $\gamma$ -defekte Mäuse zeigten in Studien trotz Myokarditis keine erhöhte PD-L1-Expression (Grabie et al., 2007).

Die höchsten PD1-Scores fanden sich in Riesenzellmyokarditiden, diese waren im Vergleich zu allen anderen Myokarditistypen sowie zur Kontrollgruppe signifikant höher. Auch die PD-L1-Scores waren in Riesenzellmyokarditiden im Vergleich zu Patienten mit chronischer lymphozytärer Myokarditis sowie zu Patienten der Kontrollgruppe signifikant höher, der Unterschied zu akuten lymphozytären und

eosinophilen Myokarditiden war nicht signifikant. In einem post-mortem untersuchten Patienten, welcher nach Ipilimumabgabe eine steroidrefraktäre Riesenzellmyokarditis entwickelte, konnte gezeigt werden, dass dessen Myokardbiopsien im Vergleich zu Leber- und Milzbiopsien eine erhöhte PD1- und PD-L1-Expression zeigten (Reuben et al., 2017). Diese Studie verglich zwar nicht die PD1- und PD-L1-Expression des Patienten mit Riesenzellmyokarditis mit anderen lymphozytären Myokarditiden, jedoch zeigen die Ergebnisse, dass die PD1- und PD-L1-Expression nicht nur in akuten lymphozytären Myokarditiden, sondern auch in Riesenzellmyokarditiden erhöht ist. Yamaguchi et al. beschrieben dagegen in einem Fallbericht einen an Riesenzellmyokarditis erkrankten Patienten mit nur einem PD1-positiven Lymphozyten auf 253 CD3-positive Lymphozyten. Im Vergleich zeigte eine an lymphozytärer Myokarditis erkrankte Patientin 78 PD1-positive Zellen auf 164 CD3-positive Lymphozyten; die Autoren der Studie merken jedoch an, dass es sich im beschriebenen Fall um eine seltene Ausnahme handeln muss (Yamaguchi et al., 2020). Berücksichtigt man die Hypothese, dass der Körper die PD1- und PD-L1-Expression bei Myokarditiden hochreguliert, um überschießende autoimmune Reaktionen zu dämpfen, scheint deren erhöhte Expression in Riesenzellmyokarditiden auf Grund des klinisch meist fulminanten Verlaufs sinnvoll. Die Expression von PD1 und PD-L1 war in akuten lymphozytären und eosinophilen Myokarditiden im Vergleich zu chronischen lymphozytären Myokarditiden und der Kontrollgruppe signifikant erhöht. Zwischen akuten lymphozytären und akuten eosinophilen Myokarditiden bestand kein Unterschied der PD1- und PD-L1-Expression. Bisher liegen noch keine Studien zur Expression von PD1 und PD-L1 in akuten eosinophilen Myokarditiden vor, eine erhöhte Expression könnte jedoch in Zusammenhang mit der bei Hypersensitivitätsreaktionen gesteigerten Zytokin-ausschüttung wie beispielsweise Interferon- $\gamma$  oder Interleukin-4 stehen (Rose, 2011).

Zwischen Patienten mit chronischer lymphozytärer Myokarditis und der

Kontrollgruppe, bestehend aus Patienten mit hypertensiver Herzerkrankung und DCM, konnte kein Unterschied der PD1- und PD-L1-Scores festgestellt werden. Der Körper scheint die erhöhte Expression von PD1 und PD-L1 nur für eine gewisse Zeit aufrechterhalten zu können, was auf eine sich verändernde Expression von Zytokinen im Laufe der Myokarditis zurückzuführen sein könnte. Seko et al. konnten zeigen, dass die Expression von Interleukin-1 $\beta$ , Interleukin-6, TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  innerhalb der ersten Woche nach Coxsackievirus B3 Infektion im Myokard von Mäusen anstieg, Interleukin-2, Interleukin-4 und Interleukin-10 wurden dagegen erst nach fünf bis sieben Tagen exprimiert, als bereits massive Infiltrate im Myokard vorlagen (Seko et al., 1997). Zudem zeigten andere Studien, dass Interleukin-1 $\beta$  maßgeblich an der Progression einer akuten in eine chronische Myokarditis beteiligt ist; eine Blockade von Interleukin-1 $\beta$  führte zu einer Reduktion der Entzündung und verhinderte den Übergang einer Coxsackievirus B3 induzierten akuten Myokarditis in eine chronische Myokarditis (Kraft et al., 2019). Dagegen konnten durch Coxsackievirus B3 ausgelöste akute Myokarditiden in Mäusen, welche sonst ausheilten, durch Gabe von Interleukin-1 und TNF- $\alpha$  in eine chronische Myokarditis überführt werden (Lane et al., 1992). Diese Veränderung der Zytokinausschüttung im Verlauf einer Myokarditis könnte die PD1- beziehungsweise PD-L1-Expression herunterregulieren. Eine Verringerung von PD1 war zudem mit zunehmender Symptombdauer zu beobachten (siehe 4.4). In Kontrast zu diesen Ergebnissen stehen Erkenntnisse zum Verhalten der PD1-Expression im Rahmen von chronischen viralen Infektionen; hier konnte eine erhöhte PD1-Expression auf CD4-positiven sowie CD8-positiven T-Zellen beobachtet werden. Eine Variante von LCMV induzierte in Mäusen chronische Infektionen, welche daraufhin eine starke Expression von PD1 auf CD4-positiven T-Zellen zeigten, die Expression von PD1 auf CD8-positiven T-Zellen sank dagegen im Laufe der Erkrankung (Crawford et al., 2014). Dagegen blieb die Expression von PD1 in CD8-positiven T-Zellen von Mäusen nach einer Infektion mit dieser LCMV

Variante in anderen Studien erhöht (Barber et al., 2006, Blackburn et al., 2009). Im Rahmen einer chronischen viralen Infektion zeigte sich zudem eine erhöhte Expression von PD-L1 auf Splenozyten (Barber et al., 2006). Die erhöhte Expression von PD1 und PD-L1 ging mit einer „Erschöpfung“ der T-Zellen einher (Barber et al., 2006, Crawford et al., 2014, Blackburn et al., 2009). Diese „exhausted T-cells“, kurz T<sub>ex</sub>-Zellen, verlieren mit der Zeit wichtige Funktionen wie die Produktionsfähigkeit von TNF- $\alpha$  und Interleukin-2, bei höherer PD1-Expression auch die Produktionsfähigkeit von Interferon- $\gamma$  (Odorizzi et al., 2015, Wei et al., 2013). Eine solche T-Zell-Erschöpfung konnte durch Blockade von PD-L1 kurzfristig für acht bis elf Wochen aufgehoben, jedoch nicht völlig unterbunden werden (Barber et al., 2006, Pauken et al., 2016). Auch PD1-negative Versuchstiere zeigten nach einiger Zeit unter chronischer viraler Infektion eine T-Zell-Erschöpfung, welche vermutlich auf eine kompensatorische Erhöhung von anderen inhibitorisch wirkenden Proteinen wie Lag-3 oder CD160 zurückzuführen ist (Odorizzi et al., 2015). Vermutlich ist diese beobachtete Herunterregulation des Immunsystems ein Mechanismus zum Schutz des Körpers vor einer überschießenden Immunantwort und einer zu starken Zerstörung körpereigener Zellen durch die eigene Immunabwehr (Schörnrich and Raftery, 2019). Während Barber et al., Blackburn et al. und Crawford et al. eine erhöhte Expression von PD1 beziehungsweise PD-L1 in LCMV-induzierten chronischen Infektionen bei Mäusen zeigen konnten, war in der hier präsentierten Arbeit kein Unterschied der PD1-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe gefunden worden. Eine mögliche Erklärung ist, dass in der hier vorliegenden Arbeit nur in gesamt 23,53% der untersuchten Patienten mit chronischen lymphozytären Myokarditiden virale Nukleinsäure im Myokard nachgewiesen werden konnte. Zudem erfolgte die Quantifizierung der T-Zellen in den Studien von Barber et al., Blackburn et al. sowie Crawford et al. mit Hilfe einer Durchflusszytometrie und nicht durch immunhistochemische Verfahren. In der hier vorliegenden Arbeit wurde in drei der vier Patienten mit chronischen

viralen lymphozytären Myokarditiden PVB19 DNA im Myokard nachgewiesen, die Kopienzahl lag zwischen 691 und 1128 Kopien pro  $\mu\text{g}$  myokardialer Nukleinsäure. Dies deutet auf eine Viruspersistenz hin, quantitative PCR-Analysen aktiver PVB19- Infektionen des Herzens zeigten höhere Kopienzahlen von über  $10^5$  Kopien pro  $\mu\text{g}$  myokardialer Nukleinsäure (Klingel et al., 2004, Bock et al., 2010). Die geringe Aktivität der Viren in den in dieser Arbeit betrachteten Proben chronisch lymphozytärer Myokarditiden könnte ein weiterer Grund für die geringe Expression von PD1 sein. Bisher liegen keine Studien zur Expression von PD-L1 bei Myokarditiden vor. Ausschließlich der auf Seite 71 beschriebene Fallbericht eines Patienten mit steroidrefraktärer Riesenzellmyokarditis konnte eine erhöhte Expression von PD-L1 im Myokard im Vergleich zu Leber- und Milzbiopsien desselben Patienten zeigen (Reuben et al., 2017).

Patienten mit akuter zellulärer Abstoßungsreaktion Grad 2R wiesen in der vorliegenden Arbeit im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikant erhöhte PD-L1- Expression auf. Diese Beobachtung stimmt mit Ergebnissen von Choudhary et al. überein, die ebenfalls eine steigende PD-L1-Expression in Abhängigkeit des Schweregrades von akuten zellulären Abstoßungsreaktionen beschrieben (Choudhary et al., 2020). Auch die PD1-Expression war bei Patienten mit akuter zellulärer Abstoßungsreaktion Grad 2R im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht. Dies wirft die Frage auf, ob die erhöhte PD1- und PD-L1-Expression eine Art Abwehrreaktion des Körpers darstellt, mit der die Abstoßungsreaktion vermindert werden soll, oder ob die erhöhte PD1- und PD-L1-Expression vielmehr die Abstoßungsreaktion erst auslöst oder verstärkt. Studien von d'Izarny et al. zeigten eine höhere Abstoßungsrate nach Checkpointinhibitorengabe, was erstere Hypothese untermauern würde, da der PD1-PD-L1-Signalweg wichtig für die generelle Akzeptanz des Transplantats zu sein scheint. Bei bereits begonnener Abstoßungsreaktion scheint der Körper die Expression von PD1 und PD-L1 noch zusätzlich heraufzuregulieren, vermutlich um die

Abstoßungsreaktion zu dämpfen. Ähnliche Ergebnisse konnten in Studien an Mäusen erbracht werden, welche eine gesteigerte PD-L1-Expression in Abstoßungsreaktionen zeigten, wobei eine erhöhte T-Zell-Infiltration nach Gabe von Checkpointinhibitoren beobachtet werden konnte (Kaul et al., 2015). Die Bedeutung des PD1-PD-L1-Signalwegs in Bezug auf die Akzeptanz von Herztransplantaten scheint hierbei sehr groß zu sein. Studien an Mäusen zeigten, dass Versuchstiere mit Herztransplantaten, deren HLA nicht mit denen der Versuchstiere selbst übereinstimmten, unter Therapie mit CTLA4- Antikörpern keine Abstoßungsreaktion zeigten. Injizierte man diesen Mäusen jedoch zusätzliche PD-L1-Antikörper, so entwickelten die Versuchstiere Abstoßungsreaktionen, welche ihre mittlere Überlebenszeit von über 100 Tagen auf nur 31,5 Tage sinken ließ (Tanaka et al., 2007).

Bei der Auswertung der Daten muss beachtet werden, dass keine Dokumentationen darüber vorlagen, ob die in die vorliegende Arbeit aufgenommenen Patienten zuvor bereits Abstoßungsreaktionen erlitten, was jedoch Einfluss auf die PD-L1-Expression haben könnte. So besteht ein Zusammenhang zwischen geringerer endothelialer PD-L1-Expression und vorangegangener, zwischenzeitlich jedoch wieder abgeflachter Grad 2R Abstoßung (Bracamonte-Baran et al., 2018).

#### **4.2. Zusammenhang von PD1- und PD-L1-Score bei Patienten mit Myokarditiden und Patienten nach Herztransplantation**

Es bestand eine signifikante Korrelation zwischen dem PD1- und dem PD-L1-Score bei gemeinsamer Betrachtung aller Patienten mit Myokarditiden sowie der Kontrollgruppe und bei allen Patienten nach Herztransplantation. Zudem bestand die Korrelation zwischen PD1- und PD-L1-Score in den für sich betrachteten Patienten mit akuter lymphozytärer Myokarditis und in Patienten mit akuter eosinophiler Myokarditis. Eine Erhöhung der PD1-Expression geht somit mit einer Erhöhung der PD-L1-Expression einher, was logisch erscheint, da weder PD1 noch PD-L1 allein eine Signalkaskade in Gang setzen können,

sofern man die Interaktion von PD1 und PD-L2 sowie die Hypothese eines PD1-unabhängigen Mechanismus der PD-L1- Aktivierung von Wang et al. (2010b) außer Acht lässt. Die fehlende Korrelation von PD1 und PD-L1 bei Patienten mit Riesenzellmyokarditiden sowie bei Patienten mit akuter zellulärer Abstoßungsreaktion Grad 2R ist vermutlich auf die geringen Gruppengrößen zurückzuführen.

#### **4.3. Zusammenhang des CD3-Scores und des CD68-Scores mit dem PD1- und PD-L1-Score**

Die Anzahl CD3- und CD68-positiver Immunzellen korrelierte in akuten lymphozytären und eosinophilen Myokarditiden, Riesenzellmyokarditiden und chronischen lymphozytären Myokarditiden miteinander. Es konnten keine signifikanten Unterschiede des CD3- und CD68-Scores in akuten lymphozytären, akuten eosinophilen und Riesenzellmyokarditiden festgestellt werden. Dies lässt darauf schließen, dass CD3-positive T-Zellen und CD68-positiv Makrophagen in allen akuten Myokarditiden in ähnlichem Verhältnis das Myokard infiltrieren. Studien zu genauen Verhältnissen von Immunzellen im Infiltrat verschiedener Myokarditistypen liegen bislang nicht vor. Prognostisch gehen erhöhte Zahlen CD3- positiver T-Zellen nicht mit einer schlechteren klinischen Prognose einher, erhöhte Zahlen CD68-positiver Makrophagen in nicht näher definierten inflammatorischen Kardiomyopathien sind dagegen prognostisch für Herztransplantation und Implantation eines ventrikulären Unterstützungssystems sowie Herztod und überlebten plötzlichen Herzstillstand (Michel and Ohlow, 2018).

Die Zahl CD3-positiver T-Zellen in Myokarditiden zeigte in der vorliegenden Arbeit eine deutlich positive Korrelation zum PD1- und PD-L1-Score, die Zahl CD68- positiver Makrophagen korrelierte ebenfalls deutlich positiv mit dem PD1- und dem PD-L1-Score. Je stärker die Inflammation, desto mehr PD1- und PD-L1 wird folglich exprimiert. Die Expression von PD1 und PD-L1 wird über Zytokine gesteuert, vor allem IFN- $\gamma$  ist für die PD-L1-Expression von Bedeutung (Garcia-Diaz et al.,

2017). Mäuse mit defektem IFN- $\gamma$  zeigten keine erhöhte PD-L1-Expression bei Myokarditiden (Grabie et al., 2007). Zudem geht eine Erhöhung von IFN- $\gamma$  mit erhöhter Infiltration von Immunzellen im Myokard einher, IFN- $\gamma$  ist somit gleichermaßen für die Infiltration von Immunzellen als auch für die Expression von PD-L1 verantwortlich (Grabie et al., 2007). In Biopsien von Patienten mit chronischer Trypanosoma cruzi Infektion konnte eine erhöhte IFN- $\gamma$ -Expression nachgewiesen werden und auch durch IFN- $\gamma$  induzierte Genprodukte wie HLA waren erhöht (Cunha-Neto et al., 2005, Abel et al., 2001). Zudem wurden in T-Zellen, welche aus Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz isolierten wurden, erhöhte Spiegel von für IFN- $\gamma$ -codierender mRNA nachgewiesen (Yndestad et al., 2003). IFN- $\gamma$  scheint jedoch eine protektive Funktion im Myokard zu haben, so zeigten IFN- $\gamma$ -defekte Mäuse erhöhte Spiegel von Interleukin-1 $\beta$  und Interleukin-4 und entwickelten chronische Myokarditiden, Perikarditiden und DCM nach Infektion mit Coxsackievirus B3 (Fairweather et al., 2004).

#### **4.4. Einflussfaktoren auf die PD1- und PD-L1-Expression bei Myokarditiden und Patienten nach Herztransplantation**

Im Originaldatensatz bestand eine signifikante mäßig negative Korrelation zwischen der Symptombdauer und dem PD1-Score in gemeinsam betrachteten Patienten mit Myokarditis und Patienten der Kontrollgruppe. Diese Korrelation zwischen der Symptombdauer und dem PD1-Score konnte auch in ausschließlich Patienten mit chronischer lymphozytärer Myokarditis gezeigt werden. Beide Korrelationen waren jedoch im imputierten Datensatz nicht signifikant. Mit zunehmender Dauer der Symptome sank demnach die PD1-Expression, was mit Studienergebnissen von Barber et al. in Bezug auf akute Infektionen übereinstimmt. Im Mausmodell konnte nach Infektion mit LCMV (Armstrong) anfänglich eine Erhöhung der PD1-Expression auf CD8-positiven T-Zellen beobachtet werden, welche jedoch schnell vom Körper herunterreguliert wurde. Hierbei wurde die PD1-Expression mit Hilfe einer

Durchflusszytometrie bestimmt. Bei chronischen Infektionen war dagegen keine Erniedrigung der PD1-Expression zu beobachten, es wurde eine konstant erhöhte PD1-Expression festgestellt und auch die PD-L1-Expression war auf Splenozyten erhöht (Barber et al., 2006). Je länger die Symptome von Patienten mit akuten Myokarditiden anhalten, desto mehr scheint der PD1-PD-L1-Signalweg für den Körper als Regulator der überschießenden Immunantwort an Bedeutung zu verlieren. Auch Patienten nach Herztransplantation zeigten eine negative Korrelation zwischen der vergangenen Zeit nach Transplantation und dem PD1-Score. Die Korrelation von PD-L1-Score und der vergangenen Zeit nach Transplantation verfehlte das Signifikanzniveau nur knapp, mit imputiertem Datensatz zeigte sich eine mäßig negative signifikante Korrelation. Je länger ein Patient ein Spenderherz hatte, desto geringer war demnach die Expression von PD1 und PD-L1. Bei Checkpointinhibitorengabe wird wiederum die Wahrscheinlichkeit einer Abstoßung mit zunehmender Zeit nach Transplantation geringer (d'Izarny-Gargas et al., 2020). Dies legt die Vermutung nahe, dass der PD1-PD-L1-Signalweg mit zunehmender Zeit nach Transplantation an Wichtigkeit für die Akzeptanz des Transplantats verliert und der Körper daher die Expression von PD1 und PD-L1 herabfährt.

In akuten lymphozytären Myokarditiden konnte zwischen dem Alter der Patienten und dem PD-L1-Score eine mäßig negative Korrelation gezeigt werden. Der Körper scheint die überschießende Immunantwort mit steigendem Alter entweder weniger stark über den PD1-PD-L1-Signalweg zu drosseln oder eine Interaktion von PD1 und PD-L1 führt mit steigendem Alter zu einer stärkeren intrazellulären Reaktion, wodurch weniger Bindungen zwischen PD1 und seinem Rezeptor für dieselbe intrazelluläre Wirkung benötigt werden. Studien zur Wirksamkeit von Checkpointinhibitoren in der Tumorthherapie zeigen, dass die Wirksamkeit der Checkpointinhibitoren mit steigendem Alter zunimmt, was die große Relevanz des PD1-PD-L1-Signalwegs auch im Alter deutlich macht (Kugel et al., 2018). Weshalb ältere Patienten nach Herztransplantation

eine geringe Expression von PD1 zeigten, kann nicht abschließend geklärt werden, vergleichbare Studien liegen nicht vor. Ein Vergleich des Alters der Patienten mit akuter zellulärer Abstoßungsreaktion Grad 2R und der Patienten der Kontrollgruppe mit Abstoßungsreaktion Grad 0R zeigte jedoch einen signifikanten Unterschied mit deutlich älteren Patienten in der Kontrollgruppe, was die negative Korrelation des PD1-Scores mit dem Alter bedingen könnte. Es bestand keine signifikante Korrelation des Alters mit dem PD1-Score bei Patienten mit akuter zellulärer Abstoßungsreaktion Grad 2R, was vermutlich auf die geringe Anzahl an Patienten zurückzuführen ist.

In Patienten mit chronischen lymphozytären Myokarditiden bestand ein signifikanter Zusammenhang zwischen PD-L1-Score und dem Geschlecht der Patienten, wobei Frauen höhere PD-L1-Scores zeigten als Männer. Im Allgemeinen ist die Datenlage zum Zusammenhang zwischen PD-L1-Expression und Geschlecht sehr gering, die Forschung konzentriert sich vor allem auf Malignome, welche auf Checkpointinhibitoren-Therapie ansprechen. Die Gabe von 17 $\beta$ -Estradiol erhöhte die PD-L1-Expression auf Endometrium- und Mammakarzinomzellen, wobei die PD-L1- mRNA-Transkription nicht erhöht war, vielmehr wurde der Abbau der PD-L1-mRNA verringert (Yang et al., 2017). Dagegen konnten höhere PD-L1-Expressionen in männlichen Patienten mit Adenokarzinomen der Lunge gezeigt werden (Chen et al., 2019). Studien an Mäusen, die keinen funktionsfähigen 17 $\beta$ -Estradiol-Rezeptor ausbilden konnten zeigten, dass diese auch eine geringere PD1-Expression aufwiesen als die Kontrollgruppe, zudem stieg die intrazelluläre PD1-Expression nach Gabe von Estradiol im Wildtyp an (Polanczyk et al., 2007). Im Menschen konnten hormonbedingte Expressionsunterschiede von PD1 auf CD4-positiven T- Zellen nachgewiesen werden, postmenopausale Frauen wiesen im Vergleich zu prämenopausalen Frauen und älteren Männer eine verringerte PD1-Expression in Blutzellen auf (Reitsema et al., 2019). Inwiefern hormonelle Faktoren wie beispielsweise Kontrazeptivaeinnahme oder Menopause

Einfluss auf die untersuchten Patientinnen hatten wurde nicht erfasst, die Altersverteilung war in männlichen und weiblichen Patienten jedoch vergleichbar, was eine über das Alter hinweg gemittelte hormonbedingt höhere Expression von PD-L1 in weiblichen Patientinnen annehmen lässt.

Es konnten keine Zusammenhänge zwischen PD1- oder PD-L1-Score und den Variablen LVEF, viraler Nukleinsäurenachweis im Myokard und im Blut gezeigt werden. Eine Hochregulation der Expression von PD1 durch verschiedene Viren konnte jedoch in einigen Studien beobachtet werden. Beispielsweise war die PD1- Expression auf spezifischen CD8-positiven T-Zellen in den ersten Tagen nach HSV-1-Infektion im Mausmodell erhöht (Channappanavar et al., 2012). Sowohl bei Patienten mit Abstoßungsreaktion Grad 2R als auch bei Patienten der Kontrollgruppe mit Abstoßungsreaktion Grad 0R wurde die DNA von EBV am häufigsten im Myokard nachgewiesen, bislang wurden jedoch keine Studien zum Zusammenhang der Expression von PD1 und PD-L1 und dem Nachweis von EBV DNA in Myokarditiden durchgeführt. Jedoch konnte in Untersuchungen an Biopsien von an Morbus Hodgkin erkrankten Patienten kein Zusammenhang zwischen dem Nachweis von EBV DNA und der Expression von PD1 gefunden werden (Paydas et al., 2015). Ein Zusammenhang zwischen einer EBV-Infektion und der PD-L1-Expression konnte dagegen in Reed-Sternberg-Zellen sowie in Magenkarzinomen gezeigt werden (Böger et al., 2016, Ozturk et al., 2020). Das von EBV exprimierte Membranprotein LMP1 kann über den AP1-Signalweg sowie über JAK-STAT die Promotoraktivität des PD-L1-codierenden Gens aktivieren (Green et al., 2012). Aus welchem Grund die Expression von PD-L1 in EBV-infizierten Zellen erhöht ist, ist nicht abschließend geklärt. Es wäre denkbar, dass das Virus die erhöhte Expression als Schutzmechanismus nutzt, damit CD8-positive T-Zellen seine Wirtszelle nicht zerstören. Studien im Mausmodell konnten zeigen, dass PD1-defiziente Versuchstiere im Vergleich zur Kontrollgruppe nach Adenovirusinfektion eine schnellere Virusclearance, jedoch auch

schwerere Hepatitiden zeigten (Iwai et al., 2003). Die erhöhte Expression von PD-L1 und Interaktion mit PD1 scheint somit die infizierte Zelle selbst davor zu schützen, von CD8-positiven T-Zellen erkannt und durch die Ausschüttung von Granzym und Perforin in die Apoptose getrieben zu werden und beugt dadurch einer zu starken Entzündungsreaktion vor (Schönrich and Raftery, 2019).

Da sich aus den Korrelationsanalysen für Patienten mit akuter zellulärer Abstoßungsreaktion Grad 2R keine Zusammenhänge zwischen den Variablen Alter, Geschlecht, LVEF, vergangener Zeit nach Transplantation und Virusnachweis im Myokard sowie im Blut ableiten ließen, bleibt die Frage, ob dies auf Lücken der Scores oder auf statistische Gründe zurückzuführen ist. Vor allem die geringe Patientenzahl scheint hierbei relevant zu sein. Zwar wurde mit Hilfe der sieben zuvor durchgeführten Imputationen versucht, Datenlücken zu schließen, die Gesamtzahl von 14 Patienten war jedoch trotz allem gering. Aus diesem Grund ist die Aussage, dass keine signifikanten Einflussfaktoren auf die PD1- und PD-L1-Expression bei akuten zellulären Abstoßungsreaktionen Grad 2R identifiziert werden konnten unter Vorbehalt zu bewerten.

#### **4.5. Klinische Bedeutung der PD1- und PD-L1-Expression in Myokarditiden und Abstoßungsreaktionen**

Die LVEF ist ein wichtiger Prädiktor für ein schlechteres "Outcome" bei Erwachsenen mit Myokarditiden, Herzinsuffizienz und bei an Myokarditis erkrankten Kindern (Curtis et al., 2003, Rodriguez-Gonzalez et al., 2019, Kindermann et al., 2008). In der vorliegenden Arbeit wurden die Patienten anhand ihrer gemessenen Werte der LVEF in drei Gruppen eingeteilt: Gruppe eins zeigte eine LVEF von mindestens 50%, Gruppe zwei mindestens 40% aber weniger als 50% und Gruppe drei unter 40%. Zwischen dem PD1- beziehungsweise dem PD-L1-Score und der LVEF konnte sowohl in Patienten mit akuten und chronischen

Myokarditiden als auch in Patienten mit Abstoßungsreaktion Grad 2R keine Korrelation gefunden werden, weshalb eine hohe PD1- und PD-L1-Expression unter diesem Gesichtspunkt keine Aussage über das „Outcome“ der Patienten zulässt. Jedoch zeigten sich signifikant erhöhte PD1- und PD-L1-Expressionen in Riesenzellmyokarditiden, welche unbehandelt nach durchschnittlich nur drei Monaten tödlich enden (Kindermann et al., 2012). Die erhöhte Expression von PD1 und PD-L1 in akuten Myokarditiden und akuten zellulären Abstoßungsreaktionen Grad 2R legt die Vermutung nahe, dass der Körper über den PD1-PD-L1-Signalweg versucht, die überschießende Autoimmunreaktion zu drosseln. Die Interaktion von PD1 und PD-L1 inhibiert den PI3K/Proteinkinase B Signalweg, über welchen mTOR, eine Serin/Threonin-Kinase, die an den Komplexen mTORC1 und mTORC2 beteiligt ist, aktiviert wird (Boussiotis, 2016, Saxton and Sabatini, 2017). Bei Blockade von PD1 steigt die Konzentration von mTOR in CD4- und CD8-positiven T-Zellen (Liu et al., 2020). Im Myokard ist mTOR für die Anpassung des Herzens an eine erhöhte Nachlast wichtig. mTOR-negative Mäuse zeigten eine verringerte Hypertrophie des Herzens als Reaktion auf erhöhte Druckbelastung mit resultierender DCM und Herzinsuffizienz, welche letal endete (Zhang et al., 2010). Auch die Deletion von Raptor, einem Bestandteil von mTORC1, führte in Versuchstieren zu DCM und Herzinsuffizienz, was impliziert, dass mTORC1 für das Wachstum und die Proliferation von Myozyten im Erwachsenen von Relevanz ist (Shende et al., 2011, Sciarretta et al., 2014). Des Weiteren aktiviert mTORC1 das Protein SREBP, welches für die Lipidsynthese und den damit verbundenen Aufbau neuer Zellmembranen wichtig ist. Zudem gibt es Hinweise darauf, dass mTORC1 die Synthese neuer Nukleotide fördert, welche für die Replikation benötigt werden. Somit ist mTORC1 wesentlich an der Zellteilung und Proliferation beteiligt (Saxton and Sabatini, 2017). Auch fördert mTOR die Ausdifferenzierung von TH1-, TH2- und TH17-Zellen, die Deletion von mTOR führt dagegen zur Ausdifferenzierung von

antiinflammatorisch wirkenden  $T_{reg}$  (Delgoffe et al., 2009). Versuche an Ratten konnten zeigen, dass in Versuchstieren mit autoimmunen Myokarditiden S6K1, ein Substrat von mTOR, stärker phosphoryliert war als in gesunden Versuchstieren (Maeda et al., 2005). Da, wie von Saxton und Sabatini (2017) sowie Boussiotis (2016) berichtet, mTOR über den PI3K/Proteinkinase B Signalweg aktiviert wird und der PD1-PD-L1-Signalweg diesen inhibiert, lässt die in der vorliegenden Arbeit gemessene erhöhte Expression von PD1 und PD-L1 vermuten, dass der Körper der möglicherweise erhöhten Aktivität von mTOR über den PD1-PD-L1-Signalweg entgegenzuwirken versucht. Vor allem in Riesenzellmyokarditiden konnte eine signifikant erhöhte Expression von PD1 gezeigt werden, möglicherweise ist hier die Inhibition von mTOR über den PD1-PD-L1-Signalweg besonders wichtig. Dies legt die Vermutung nahe, dass eine unterstützende Behandlung mit mTOR-Inhibitoren in allen akuten Myokarditiden, insbesondere jedoch in Riesenzellmyokarditiden, erfolgversprechend sein könnte, da darüber der natürliche Weg des Körpers, die mTOR Aktivität in akuten Myokarditiden zu drosseln, unterstützt werden könnte. Ein Fallbericht eines Patienten, der nach Herztransplantation wiederholt an einer Riesenzellmyokarditis erkrankte, konnte zeigen, dass diese mit Kortikosteroiden, Basiliximab, Tacrolimus, Antithymozytenglobulin und Rituximab nicht therapierbar war, nach Verwendung von Rapamycin jedoch ausheilte und nicht erneut auftrat (Patel et al., 2019). Studien an Ratten konnten zeigen, dass eine Behandlung mit Rapamycin die Phosphorylierung von S6K1 unterdrückte, was auf die inhibitorische Wirkung von Rapamycin auf mTORC1 zurückzuführen ist. Versuchstiere unter Behandlung mit Rapamycin zeigten eine geringere Inflammation und einen geringeren Fibrosegrad. Die gemessenen BNP-Konzentrationen im Blut der Versuchstiere waren in Versuchstieren mit Rapamycinbehandlung geringer, das Überleben der Versuchstiere mit autoimmunen Myokarditiden konnte durch Behandlung mit Rapamycin verlängert werden (Maeda et al., 2005). Dagegen zeigten Studien an Mäusen mit Überexpression von mTOR eine verringerte

Expression von Interleukin-6 und einen geringeren Fibrosegrad sowie eine verminderte Entzündungsreaktion im Myokard, was die komplexe und noch nicht vollständig verstandene Rolle von mTOR deutlich macht (Song et al., 2010).

Während für die Behandlung von akuten Myokarditiden der Einsatz von Rapamycin vielversprechend erscheint, konnte die vorliegende Arbeit keine erhöhte PD1- und PD-L1-Expression in chronischen lymphozytären Myokarditiden zeigen. Dies könnte darauf hinweisen, dass der PD1-PD-L1-Signalweg und die darüber bewirkte Inhibition von mTOR in chronischen Myokarditiden für die Regulation der Immunantwort weniger relevant sein könnte, weshalb für die Behandlung von chronischen lymphozytären Myokarditiden anderen immunmodulatorischen Therapieoptionen, beispielsweise Kortikosteroiden oder Azathioprin, der Vorrang gegeben werden sollte. Studien von Frustaci et al. konnten bereits eine positive Wirkung von Glukokortikoiden und Azathioprin auf den Verlauf von Virus-negativen Myokarditiden zeigen. Patienten mit akuten lymphozytären Myokarditiden sowie chronischem Herzversagen ohne Nachweis von viraler Nukleinsäure im Myokard zeigten nach Behandlung mit Prednisolon und Azathioprin über einen Zeitraum von gesamt sechs Monaten eine signifikante Erhöhung der LVEF, während die Placebogruppe schlechtere LVEF-Werte zeigte als zu Beginn der Studie (Frustaci et al., 2009).

In Patienten mit Herztransplantaten betrug die Rate an Abstoßungsreaktionen Grad 3a oder schwerer in Studien von Keogh et al. in Patienten unter Behandlung mit Azathioprin 55,8% während Patienten unter Behandlung mit Rapamycin nur in 33,8% eine Abstoßungsreaktion Grad 3a oder schwerer zeigten (Keogh et al., 2004). Studien an Ratten mit Herztransplantat konnten zeigen, dass die Behandlung mit Rapamycin langfristig zu erhöhten Spiegeln an Interleukin-4 und Interleukin-10 führte, welche für die Aktivierung von

antiinflammatorischen TH2-Zellen sprechen (Ferraresso et al., 1994). Die Expression von PD1 und PD-L1 kann zudem als Indikator des Schweregrads der akuten zellulären Abstoßungsreaktion in der Diagnosestellung verwendet werden. In der vorliegenden Arbeit wurde eine erhöhte Expression von PD1 und PD-L1 in akuten zellulären Abstoßungsreaktionen Grad 2R gezeigt. Choudhary et al. zeigten, dass die PD-L1-Expression auch in akuten zellulären Abstoßungsreaktionen Grad 1R erhöht war, wobei die Expression von PD-L1 in Biopsien mit akuter zellulärer Abstoßungsreaktion Grad 2R höher war als in Biopsien mit Grad 1R (Choudhary et al., 2020). Zur Beurteilung des Schweregrads einer akuten zellulären Abstoßungsreaktion könnte in Zukunft die Expression von PD-L1 von Bedeutung sein.

## 5. Zusammenfassung

Seit einigen Jahren werden in der Tumorthherapie verstärkt Checkpointinhibitoren eingesetzt, welche die Proteine „Programmed cell death protein 1“ (PD1) und „Programmed cell death 1 ligand 1“ (PD-L1) inhibieren. Im Rahmen dieser Therapien können jedoch teilweise letale Myokarditiden auftreten. Bislang ist wenig darüber bekannt, ob und in welchem Ausmaß PD1 und PD-L1 in Myokarditiden exprimiert werden.

In dieser Arbeit wurde die Expression von PD1 und PD-L1 in Relation zum Ausmaß der Infiltration durch CD3-positive T-Zellen und CD68-positive Makrophagen in akuten lymphozytären Myokarditiden, akuten eosinophilen Myokarditiden, Riesenzell-myokarditiden, chronischen lymphozytären Myokarditiden sowie in akuten zellulären Abstoßungsreaktionen Grad 2R nach Herztransplantation untersucht. Als Kontrollgruppe der Myokarditispatienten wurden Patienten mit hypertensiver Herzerkrankung und DCM ohne Entzündung untersucht, die Kontrollgruppe der Patienten mit akuter zellulärer Abstoßungsreaktion Grad 2R bestand aus Patienten ohne zelluläre Abstoßungsreaktion (Grad 0R). Für die Quantifizierung der PD1- Expression wurde der PD1-Score entwickelt, der die PD1-Expression auf Immun- zellen ins Verhältnis zur Zahl der infiltrierenden CD3-positiven T-Zellen setzt. Der PD1-Score von 0 entspricht einem Präparat, in welchem der Quotient aus PD1- positiven Zellen und CD3-positiven Zellen unter 1% lag. Der PD1-Score 1 zeigt einen Quotienten von 1-10%, der Score 2 einen Quotienten von über 10% aber unter 25% und der Score 3 einen Quotienten von  $\geq 25\%$  an. Für die Quantifizierung der PD-L1- Expression wurde der PD-L1-Score verwendet, der bezüglich der prozentualen Expression von PD-L1 auf Myozyten im gesamten Präparat die Werte von 0 bis 3 annehmen kann. Der PD-L1-Score 0 zeigt keine signifikante Expression von PD-L1. Der PD-L1-Score 1 belegt eine schwache PD-L1 Expression und wenn bis zu 25% aller Myozyten eine klare Färbung zeigten, wurde der PD-L1-Score 2 vergeben, bei mehr als 25% der PD-L1-Score 3. Zudem wurde

überprüft, ob die Faktoren Alter, Geschlecht, LVEF, Virusnachweis im Myokard und im Blut sowie die Dauer der Erkrankung beziehungsweise die Dauer nach Transplantation Einfluss auf die Expression von PD1 und PD-L1 haben.

Die Ergebnisse zeigten einen signifikant erhöhten PD1-Score in akuten lymphozytären Myokarditiden (PD1-Score 1: 60%, PD1-Score 2: 33,33%, PD1-Score 3: 6,67%), akuten eosinophilen Myokarditiden (PD1-Score 0: 6,25%, PD1-Score 1: 56,25%, PD1-Score 2: 31,25%, PD1-Score 3: 6,25%) und Riesenzellmyokarditiden (PD1-Score 1: 11,11%, PD1-Score 2: 66,67%, PD1-Score 3: 22,22%) im Vergleich zu chronischen lymphozytären Myokarditiden (PD1-Score 0: 94,12%, PD1-Score 2: 5,88%) und zur Kontrollgruppe (PD1-Score 0: 80,95%, PD1-Score 2: 19,05%). Zudem konnten signifikant erhöhte PD-L1-Scores in akuten lymphozytären Myokarditiden (PD-L1-Score 1: 73,33%, PD-L1-Score 2: 20%, PD-L1-Score 3: 6,67%), akuten eosinophilen Myokarditiden (PD-L1-Score 0: 18,75%, PD-L1-Score 1: 50%, PD-L1-Score 2: 25%, PD-L1-Score 3: 6,25%) und Riesenzellmyokarditiden (PD-L1-Score 1: 33,33%, PD-L1-Score 2: 55,56%, PD-L1-Score 3: 11,11%) im Vergleich zu chronischen lymphozytären Myokarditiden (PD-L1-Score 0: 47,06%, PD-L1-Score 1: 52,94%) und zur Kontrollgruppe (PD-L1-Score 0: 42,86%, PD-L1-Score 1: 57,14%) gezeigt werden. Chronische lymphozytäre Myokarditiden zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe keine erhöhten PD1- und PD-L1-Scores. Riesenzellmyokarditiden wiesen die höchste PD1-Expression auf (Median=2, Interquartilsabstand=0,5). Patienten mit akuter und chronischer Myokarditis zeigten eine Abnahme des PD1-Scores bei zunehmender Krankheitsdauer (Kendall Tau=-0,390, p=0,003). Je älter Patienten mit akuter lymphozytärer Myokarditis waren, desto höhere PD-L1-Scores zeigten sie durchschnittlich (Kendall Tau=0,493, p=0,027). Der PD-L1-Score bei Patienten mit chronischer lymphozytärer Myokarditis war bei Frauen signifikant höher als bei Männern (Cramer-V=0,653, p=0,007), was auf geschlechtsspezifische, vermutlich hormonbedingte Unterschiede der PD-L1-Expression

hinweist.

Patienten mit akuter zellulärer Abstoßungsreaktion Grad 2R hatten im Vergleich zu Patienten ohne Abstoßungsreaktion Grad 0R eine deutlich erhöhte PD1-Expression (Grad 2R: PD1-Score 1: 7,14%, PD1-Score 2: 57,15%, PD1-Score 3: 35,71%; Grad 0R: PD1-Score 0: 95%, PD1-Score 3: 5%). Auch die PD-L1-Expression war in Patienten mit akuter zellulärer Abstoßungsreaktion Grad 2R im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht (Grad 2R: PD-L1-Score 0: 35,71%, PD-L1-Score 1: 64,29%; Grad 0R: PD-L1-Score 0: 100%). Bei Patienten mit akuter zellulärer Abstoßungsreaktion Grad 2R und Patienten ohne Abstoßungsreaktion Grad 0R war der PD1-Score umso kleiner, je länger die Herztransplantation zurücklag (Kendall Tau=-0,395, p=0,013). Zudem nahm der PD1-Score mit steigendem Alter bei allen Patienten mit akuter zellulärer Abstoßungsreaktion ab (Kendall Tau=-0,305, p=0,027). Die Korrelation der PD-L1-Expression mit der Dauer nach Herztransplantation war nur im imputierten Datensatz signifikant, die PD-L1-Expression war umso kleiner, je länger die Transplantation der Patienten zurücklag (Spearman'scher Korrelationskoeffizient:-0,370, p=0,04, Kendall Tau=-0,336, p=0,065).

Aus der Literatur ist bekannt, dass der PD1-PD-L1-Signalweg über den PI3K/Proteinase B Signalweg hemmend auf das Protein mTOR wirkt, welches an Entzündungsreaktionen im Myokard beteiligt ist und antiinflammatorische Prozesse inhibieren kann. Es könnte vermutet werden, dass der Körper durch die verstärkte Expression von PD1 und PD-L1 in akuten Myokarditiden und Abstoßungsreaktionen Grad 2R die erhöhte Aktivität von mTOR über den PD1-PD-L1-Signalweg zu inhibieren und so eine überschießende Immunantwort gegen körpereigene Myozyten zu verhindern versucht. Auf Grundlage der Ergebnisse könnte eine Behandlung von akuten Myokarditiden und akuten zellulären Abstoßungsreaktionen Grad 2R mit dem Medikament Rapamycin sinnvoll erscheinen, da auch Rapamycin über den PI3K/Proteinase B Signalweg mTOR inhibieren kann. Eine Therapie mit

Rapamycin könnte die Effekte von PD1/PD-L1 auf die infiltrierenden Zellen verstärken und die Inflammation im Rahmen von akuten Myokarditiden und akuten zellulären Abstoßungsreaktionen herunterregulieren. Zudem könnte die Färbung von PD1 und PD-L1 in Zukunft bei der Beurteilung des Schweregrads einer akuten zellulären Abstoßungsreaktion von Bedeutung sein.

## 6 Literaturverzeichnis

- ABEL, L. C. J., RIZZO, L. V., IANNI, B., ALBUQUERQUE, F., BACAL, F., CARRARA, D., BOCCHI, E. A., TEIXEIRA, H. C., MADY, C., KALIL, J. & CUNHA-NETO, E. 2001. Chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients display an increased IFN- $\gamma$  response to *Trypanosoma cruzi* infection. *Journal of Autoimmunity*, 17, 99-107.
- ADIB-CONQUY, M., SCOTT-ALGARA, D., CAVAILLON, J.-M. & SOUZA-FONSECA-GUIMARAES, F. 2014. TLR-mediated activation of NK cells and their role in bacterial/viral immune responses in mammals. *Immunology & Cell Biology*, 92, 256-262.
- AFANASYEVA, M., GEORGAKOPOULOS, D., BELARDI, D. F., RAMSUNDAR, A. C., BARIN, J. G., KASS, D. A. & ROSE, N. R. 2004. Quantitative analysis of myocardial inflammation by flow cytometry in murine autoimmune myocarditis: correlation with cardiac function. *American Journal of Pathology*, 164, 807- 815.
- AGATA, Y., KAWASAKI, A., NISHIMURA, H., ISHIDA, Y., TSUBAT, T., YAGITA, H. & HONJO, T. 1996. Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *International Immunology*, 8, 765- 772.
- ALESSI, D. R., ANDJELKOVIC, M., CAUDWELL, B., CRON, P., MORRICE, N., COHEN, P. & HEMMINGS, B. A. 1996. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *European Molecular Biology Organization Journal*, 15, 6541-6551.
- AMARNATH, S., MANGUS, C. W., WANG, J. C. M., WEI, F., HE, A., KAPOOR, V., FOLEY, J. E., MASSEY, P. R., FELIZARDO, T. C., RILEY, J. L., LEVINE, B. L., JUNE, C. H., MEDIN, J. A. & FOWLER, D. H. 2011. The PDL1-PD1 axis converts human TH1 cells into regulatory T cells. *Science Translational Medicine*, 3, 120, 1-26.
- ARETZ, H., BILLINGHAM, M. E. & EDWARDS, W. 1986. Myocarditis. A histopathologic definition and classification. *American Journal of Cardiovascular Pathology*, 1, 3-14.
- AWADALLA, M., GOLDEN, D. L. A., MAHMOOD, S. S., ALVI, R. M., MERCALDO, N. D., HASSAN, M. Z. O., BANERJI, D., ROKICKI, A., MULLIGAN, C., MURPHY, S. P. T., JONES-O'CONNOR, M., COHEN, J. V., HEINZERLING, L. M., ARMANIOUS, M., SULLIVAN, R. J., DAMRONGWATANASUK, R., CHEN, C. L., GUPTA, D., KIRCHBERGER, M. C., MOSLEHI, J. J., SHAH, S. P., GANATRA, S., THAVENDIRANATHAN, P., RIZVI, M. A., SAHNI, G., LYON, A. R., TOCCHETTI, C. G., MERCURIO, V., THUNY, F., EDERHY, S., MAHMOUDI, M., LAWRENCE, D. P., GROARKE, J. D., NOHRIA, A., FRADLEY, M. G., REYNOLDS, K. L. & NEILAN, T. G. 2019. Influenza vaccination and myocarditis among patients receiving immune checkpoint inhibitors. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 7, 53-63.
- BABAN, B., LIU, J. Y., QIN, X., WEINTRAUB, N. L. & MOZAFFARI, M. S. 2015. Upregulation of Programmed Death-1 and its ligand in cardiac Injury models: Interaction with GADD153. *Public Library of Science ONE*, 10, e0124059, 1- 17.
- BALLETSCHOFER, B., BECKER, S., BEYER, M. E., BORTH-BRUHNS, T., GRÖNEWÄLLER, E., HILT, F., HIPPE-SPYRIDOPOULOU, E., HÖVELBORN, T., KETTERING, K., KÖNIG, K., KUMPF, M., MEWIS, C., NIESS, A., NOLLERT, G., RIESSEN, R., RÖCKER, K., SCHMOECKEL, M., SCHRÖDER, S., SPYRIDOPOULOS, I. & SZABO, S. 2006. Kardiologie compact. In: MEWIS, C., RIESSEN, R. & SPYRIDOPOULOS, I. (eds.)

- Kardiologie Compact. 2.*, unveränderte Auflage ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 413-423.
- BARBER, D. L., WHERRY, E. J., MASOPUST, D., ZHU, B., ALLISON, J. P., SHARPE, A. H., FREEMAN, G. J. & AHMED, R. 2006. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature*, 439, 682-687.
- BARDHAN, K., ANAGNOSTOU, T. & BOUSSIOTIS, V. A. 2016. The PD1:PD-L1/2 pathway from discovery to clinical implementation. *Frontiers in Immunology*, 7,1-17
- BAYASCAS, J. R., WULLSCHLEGER, S., SAKAMOTO, K., GARCÍA-MARTÍNEZ, J. M., CLACHER, C., KOMANDER, D., VAN AALTEN, D. M. F., BOINI, K. M., LANG, F., LIPINA, C., LOGIE, L., SUTHERLAND, C., CHUDEK, J. A., VAN DIEPEN, J. A., VOSHOL, P. J., LUCOCQ, J. M. & ALESSI, D. R. 2008. Mutation of the PDK1 PH domain inhibits protein kinase B/Akt, leading to small size and insulin resistance. *Molecular and Cellular Biology*, 28, 3258-3272.
- BECKER, L. E., MORATH, C. & SUESAL, C. 2016. Immune mechanisms of acute and chronic rejection. *Clinical Biochemistry*, 49, 320-323.
- BLACKBURN, S. D., SHIN, H., HAINING, W. N., ZOU, T., WORKMAN, C. J., POLLEY, A., BETTS, M. R., FREEMAN, G. J., VIGNALI, D. A. A. & WHERRY, E. J. 2009. Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nature Immunology*, 10, 29-37.
- BOCK, C. T., KLINGEL, K. & KANDOLF, R. 2010. Human Parvovirus B19-associated myocarditis. *New England Journal of Medicine*, 362, 1248-1249.
- BÖGER, C., BEHRENS, H.-M., MATHIAK, M., KRÜGER, S., KALTHOFF, H. & RÖCKEN, C. 2016. PD-L1 is an independent prognostic predictor in gastric cancer of Western patients. *Oncotarget*, 7, 24269-24283.
- BOUSSIOTIS, V. A. 2016. Molecular and biochemical aspects of the PD-1 checkpoint pathway. *The New England Journal of Medicine*, 375, 1767-1778.
- BRACAMONTE-BARAN, W., GILOTRA, N. A., GRIFFIN, J. M., TALOR, M., NAUEN, D., SHARMA, K., WITTSTEIN, I. S., HALUSHKA, M., RUSSELL, S. D. & CIHAKOVA, D. 2018. Endothelial PD-L1 expression as a biomarker for acute rejection in heart transplantation. *Journal of Cardiac Failure*, 24, 22.
- CAFORIO, A. L. P., PANKUWEIT, S., ARBUSTINI, E., BASSO, C., GIMENO-BLANES, J., FELIX, S. B., FU, M., HELIÖ, T., HEYMANS, S., JAHNS, R., KLINGEL, K., LINHART, A., MAISCH, B., MCKENNA, W., MOGENSEN, J., PINTO, Y. M., RISTIC, A., SCHULTHEISS, H.-P., SEGGEWISS, H., TAVAZZI, L., THIENE, G., YILMAZ, A., CHARRON, P. & ELLIOTT, P. M. 2013. 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. *European Heart Journal*, 34, 2636-2648.
- CAI, J., WANG, D., ZHANG, G. & GUO, X. 2019. The role Of PD-1/PD-L1 axis in Treg development and function: Implications for cancer immunotherapy. *OncoTargets and Therapy*, 12, 8437-8445.
- CALL, M. E., PYRDOL, J. & WUCHERPFENNIG, K. W. 2004. Stoichiometry of the T-cell receptor-CD3 complex and key intermediates assembled in the endoplasmic reticulum. *European Molecular Biology Organization*

- Journal*, 23, 2348-2357.
- CHANNAPPANAVAR, R., TWARDY, B. S. & SUVAS, S. 2012. Blocking of PDL-1 interaction enhances primary and secondary CD8 T cell response to herpes simplex virus-1 infection. *Public Library of Science ONE*, 7, e39757, 1-14.
- CHAPLIN, D. D. 2010. Overview of the immune response. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125, 3-23.
- CHEMNITZ, J., NICHOLS, K., JUNE, C. & RILEY, J. 2004. SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of Programmed Death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 173, 945-954.
- CHEN, Q., FU, Y. Y., YUE, Q. N., WU, Q., TANG, Y., WANG, W. Y., WANG, Y. S. & JIANG, L. L. 2019. Distribution of PD-L1 expression and its relationship with clinicopathological variables: an audit from 1071 cases of surgically resected non-small cell lung cancer. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 12, 774-786.
- CHEN, X., ZENG, S., ZOU, J., CHEN, Y., YUE, Z., GAO, Y., ZHANG, L., CAO, W. & LIU, P. 2014. Rapamycin attenuated cardiac hypertrophy induced by isoproterenol and maintained energy homeostasis via inhibiting NF- $\kappa$ B activation. *Mediators of Inflammation*, 2014, 868753, 1-15.
- CHOUDHARY, A., MEIJERS, W., BESHARATI, S., ZHU, Q., LINDENFELD, J., BRINKLEY, M., ANDERS, R. & MOSLEHI, J. 2020. Role of PD-L1 in heart transplant rejection. *European Heart Journal*, 41, 1106.
- COLVIN, M. M., COOK, J. L., CHANG, P., FRANCIS, G., HSU, D. T., KIERNAN, M. S., KOBASHIGAWA, J. A., LINDENFELD, J., MASRI, S. C., MILLER, D., O'CONNELL, J., RODRIGUEZ, E. R., ROSENGARD, B., SELF, S., WHITE-WILLIAMS, C. & ZEEVI, A. 2015. Antibody-mediated rejection in cardiac transplantation: Emerging knowledge in diagnosis and management. *Circulation*, 131, 1608-1639.
- CONSTANTINIDOU, A., ALIFIERIS, C. & TRAFALIS, D. 2019. Targeting Programmed Cell Death -1 (PD-1) and Ligand (PD-L1): A new era in cancer active immunotherapy. *Pharmacology & Therapeutics*, 194, 84-106.
- CRAWFORD, A., ANGELOSANTO, JILL M., KAO, C., DOERING, TRAVIS A., ODORIZZI, PAMELA M., BARNETT, BURTON E. & WHERRY, E. J. 2014. Molecular and transcriptional basis of CD4+ T cell dysfunction during chronic infection. *Immunity*, 40, 289-302.
- CUNHA-NETO, E., DZAU, V. J., ALLEN, P. D., STAMATIOU, D., BENVENUTTI, L., HIGUCHI, M. L., KOYAMA, N. S., SILVA, J. S., KALIL, J. & LIEW, C.-C. 2005. Cardiac gene expression profiling provides evidence for cytokinopathy as a molecular mechanism in Chagas' disease cardiomyopathy. *The American Journal of Pathology*, 167, 305-313.
- CURTIS, J. P., SOKOL, S. I., WANG, Y., RATHORE, S. S., KO, D. T., JADBABAIE, F., PORTNAY, E. L., MARSHALKO, S. J., RADFORD, M. J. & KRUMHOLZ, H. M. 2003. The association of left ventricular ejection fraction, mortality, and cause of death in stable outpatients with heart failure. *Journal of the American College of Cardiology*, 42, 736-742.
- D'AMBROSIO, A., PATTI, G., MANZOLI, A., SINAGRA, G., DI LENARDA, A., SILVESTRI, F. & DI SCIASCIO, G. 2001. The fate of acute myocarditis between

- spontaneous improvement and evolution to dilated cardiomyopathy: A review. *Heart (British Cardiac Society)*, 85, 499-504.
- D'IZARNY-GARGAS, T., DURRBACH, A. & ZAIDAN, M. 2020. Efficacy and tolerance of immune checkpoint inhibitors in transplant patients with cancer: A systematic review. *American Journal of Transplantation*, 9, 2457-2465.
- DAVIDOFF, R., PALACIOS, I., SOUTHERN, J., FALLON, J. T., NEWELL, J. & DEC, G. W. 1991. Giant cell versus lymphocytic myocarditis. A comparison of their clinical features and long-term outcomes. *Circulation*, 83, 953-961.
- DELGOFFE, G. M., KOLE, T. P., ZHENG, Y., ZAREK, P. E., MATTHEWS, K. L., XIAO, B., WORLEY, P. F., KOZMA, S. C. & POWELL, J. D. 2009. The mTOR kinase differentially regulates effector and regulatory T cell lineage commitment. *Immunity*, 30, 832-844.
- DENNERT, R., CRIJNS, H. J. & HEYMANS, S. 2008. Acute viral myocarditis. *European Heart Journal*, 29, 2073-2082.
- DOMINGUEZ, F., KÜHL, U., PIESKE, B., GARCIA-PAVIA, P. & TSCHÖPE, C. 2016. Update on myocarditis and inflammatory cardiomyopathy: Reemergence of endomyocardial biopsy. *Revista Española de Cardiología (English Edition)*, 69, 178-187.
- ELDER, M. E., LIN, D., CLEVER, J., CHAN, A. C., HOPE, T. J., WEISS, A. & PARSLOW, T. G. 1994. Human severe combined immunodeficiency due to a defect in ZAP-70, a T cell tyrosine kinase. *Science*, 264, 1596-1599.
- ENGELS, E.A., PFEIFFER, R.M., FRAUMENI, J.F. JR., KASISKE, B.L., ISRANI, A.K., SNYDER, J.J., WOLFE, R.A., GOODRICH, N.P., BAYAKLY, A.R., CLARKE, C.A., COPELAND, G., FINCH, J.L., FLEISSNER, M.L., GOODMAN, M.T., KAHN, A., KOCH, L., LYNCH, C.F., MADELEINE, M.M., PAWLISH, K., RAO, C., WILLIAMS, M.A., CASTENSON, D., CURRY, M., PARSONS, R., FANT, G., LIN, M. 2011. Spectrum of cancer risk among US solid organ transplant recipients. *Journal of the American Medical Association*, 306, 17, 1891-1901.
- ERIKSSON, U., KURRER, M. O., SONDEREGGER, I., IEZZI, G., TAFURI, A., HUNZIKER, L., SUZUKI, S., BACHMAIER, K., BINGISSER, R. M., PENNINGER, J. M. & KOPF, M. 2003. Activation of dendritic cells through the interleukin 1 receptor 1 is critical for the induction of autoimmune myocarditis. *Journal of Experimental Medicine*, 197, 323-331.
- ESCUDIER, M., CAUTELA, J., MALISSEN, N., ANCEDY, Y., ORABONA, M., PINTO, J., MONESTIER, S., GROB, J.-J., SCEMAMA, U., JACQUIER, A., LALEVEE, N., BARRAUD, J., PEYROL, M., LAINE, M., BONELLO, L., PAGANELLI, F., COHEN, A., BARLESI, F., EDERHY, S. & THUNY, F. 2017. Clinical features, management, and outcomes of immune checkpoint inhibitor related cardiotoxicity. *Circulation*, 136, 2085-2087.
- FABRE, A. & SHEPPARD, M. N. 2006. Sudden adult death syndrome and other non- ischaemic causes of sudden cardiac death. *Heart (British Cardiac Society)*, 92, 316-320.
- FAIRWEATHER, D., FRISANCHO-KISS, S., YUSUNG, S. A., BARRETT, M. A., DAVIS, S. E., GATEWOOD, S. J., NJOKU, D. B. & ROSE, N. R. 2004. Interferon-gamma protects against chronic viral myocarditis by reducing mast cell degranulation, fibrosis, and the profibrotic cytokines transforming growth factor-beta 1, interleukin-1 beta, and interleukin-4 in the heart. *American Journal of Pathology*, 165, 1883-1894.
- FERRARESSO, M., TIAN, L., GHOBRIAL, R., STEPKOWSKI, S. M. & KAHAN, B. D. 1994. Rapamycin inhibits production of cytotoxic but not noncytotoxic antibodies and preferentially activates T helper 2 cells that mediate long-term survival of

- heart allografts in rats. *Journal of Immunology*, 153, 3307-3318.
- FONSECA, R., SALGADO, R. M., BORGES DA SILVA, H., DO NASCIMENTO, R. S., D'IMPÉRIO-LIMA, M. R. & ALVAREZ, J. M. 2018. Programmed Cell Death Protein 1-PDL1 interaction prevents heart damage in chronic Trypanosoma cruzi infection. *Frontiers in Immunology*, 9, 997, 1-11.
- FRANCISCO, L. M., SALINAS, V. H., BROWN, K. E., VANGURI, V. K., FREEMAN, G. J., KUCHROO, V. K. & SHARPE, A. H. 2009. PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *Journal of Experimental Medicine*, 206, 3015-3029.
- FRUSTACI, A., RUSSO, M. A. & CHIMENTI, C. 2009. Randomized study on the efficacy of immunosuppressive therapy in patients with virus-negative inflammatory cardiomyopathy: the TIMIC study. *European Heart Journal*, 30, 1995-2002.
- GABRILOVICH, D. I. 2017. Myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Immunology Research*, 5, 3-8.
- GANGAPLARA, A., MASSILAMANY, C., BROWN, D. M., DELHON, G., PATRNAIK, A. K., CHAPMAN, N., ROSE, N., STEFFEN, D. & REDDY, J. 2012. Coxsackievirus B3 infection leads to the generation of cardiac myosin heavy chain- $\alpha$ -reactive CD4 T cells in A/J mice. *Clinical Immunology*, 144, 237-249.
- GARCIA-DIAZ, A., SHIN, D. S., MORENO, B. H., SACO, J., ESCUIN-ORDINAS, H., RODRIGUEZ, G. A., ZARETSKY, J. M., SUN, L., HUGO, W., WANG, X., PARISI, G., SAUS, C. P., TORREJON, D. Y., GRAEBER, T. G., COMIN- ANDUIX, B., HU-LIESKOVAN, S., DAMOISEAUX, R., LO, R. S. & RIBAS, A. 2017. Interferon receptor signaling pathways regulating PD-L1 and PD-L2 expression. *Cell Reports*, 19, 1189-1201.
- GLOBAL BURDEN OF DISEASE STUDY, C. 2015. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 301 acute and chronic diseases and injuries in 188 countries, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*, 386, 743-800.
- GOTTSCHALK, C., DAMUZZO, V., GOTOT, J., KROCZEK, R. A., YAGITA, H., MURPHY, K. M., KNOLLE, P. A., LUDWIG-PORTUGALL, I. & KURTS, C. 2013. Batf3-dependent dendritic cells in the renal lymph node induce tolerance against circulating antigens. *Journal of the American Society of Nephrology*, 24, 543-549.
- GRABIE, N., GOTSMAN, I., DACOSTA, R., PANG, H., STAVRAKIS, G., BUTTE, M. J., KEIR, M. E., FREEMAN, G. J., SHARPE, A. H. & LICHTMAN, A. H. 2007. Endothelial programmed death-1 ligand 1 (PD-L1) regulates CD8+ T-cell mediated injury in the heart. *Circulation*, 116, 2062-2071.
- GRAUBNER, B. 2018. *ICD-10-GM 2019 Systematisches Verzeichnis: Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme 10. Revision- German Modification*, Köln, Deutscher Ärzteverlag; Auflage 1.
- GREEN, M. R., RODIG, S., JUSZCZYNSKI, P., OUYANG, J., SINHA, P., O'DONNELL, E., NEUBERG, D. & SHIPP, M. A. 2012. Constitutive AP-1 activity and EBV infection induce PD-L1 in Hodgkin lymphomas and posttransplant lymphoproliferative disorders: implications for targeted therapy. *Clinical Cancer Research* 18, 1611-1618.
- GUEDES, P. M., GUTIERREZ, F. R., SILVA, G. K., DELLALIBERA-JOVILIANO, R., RODRIGUES, G. J., BENDHACK, L. M., RASSI, A., JR., RASSI, A., SCHMIDT,

- A., MACIEL, B. C., MARIN NETO, J. A. & SILVA, J. S. 2012. Deficient regulatory T cell activity and low frequency of IL-17-producing T cells correlate with the extent of cardiomyopathy in human Chagas' disease. *Public Library of Science Neglected Tropical Diseases*, 6, e1630, 1-10.
- GUGLIN, M. & NALLAMSHETTY, L. 2012. Myocarditis: diagnosis and treatment. *Current Treatment Options in Cardiovascular Medicine* 14, 637-651.
- GUTIERREZ, F., SESTI-COSTA, R., SILVA, G., TRUJILLO, M., GUEDES, P. & SILVA, J. 2014. Regulation of the immune response during infectious myocarditis. *Expert Review of Cardiovascular Therapy*, 12, 187-200.
- HARA, M., KINGSLEY, C. I., NIIMI, M., READ, S., TURVEY, S. E., BUSHELL, A. R., MORRIS, P. J., POWRIE, F. & WOOD, K. J. 2001. IL-10 is required for regulatory T Cells to mediate tolerance to alloantigens in vivo. *The Journal of Immunology*, 166, 3789-3796.
- HARMER, A. W., KOFFMAN, C. G., HEADS, A. J. & VAUGHAN, R. W. 1995. Sensitization to HLA antigens occurs in 95% of primary renal transplant rejections. *Transplant Proceedings*, 27, 666-667.
- HENKE, A., HUBER, S., STELZNER, A. & WHITTON, J. L. 1995. The role of CD8+ T lymphocytes in coxsackievirus B3-induced myocarditis. *Journal of Virology*, 69, 6720-6728.
- HUANG, J. & MANNING, B. D. 2008. The TSC1-TSC2 complex: a molecular switchboard controlling cell growth. *The Biochemical Journal*, 412, 179-190.
- IWAI, Y., TERAWAKI, S., IKEGAWA, M., OKAZAKI, T. & HONJO, T. 2003. PD-1 inhibits antiviral immunity at the effector phase in the liver. *Journal of Experimental Medicine*, 198, 39-50.
- JOHNSON, D. B., BALKO, J. M., COMPTON, M. L., CHALKIAS, S., GORHAM, J., XU, Y., HICKS, M., PUZANOV, I., ALEXANDER, M. R., BLOOMER, T. L., BECKER, J. R., SLOSKY, D. A., PHILLIPS, E. J., PILKINTON, M. A., CRAIG-OWENS, L., KOLA, N., PLAUTZ, G., RESHEF, D. S., DEUTSCH, J. S., DEERING, R. P., OLENCHOCK, B. A., LICHTMAN, A. H., RODEN, D. M., SEIDMAN, C. E., KORALNIK, I. J., SEIDMAN, J. G., HOFFMAN, R. D., TAUBE, J. M., DIAZ, L. A., JR., ANDERS, R. A., SOSMAN, J. A. & MOSLEHI, J. J. 2016. Fulminant myocarditis with combination immune checkpoint blockade. *New England Journal of Medicine*, 375, 1749-1755.
- JOSE, M. D., IKEZUMI, Y., VAN ROOIJEN, N., ATKINS, R. C. & CHADBAN, S. J. 2003. Macrophages act as effectors of tissue damage in acute renal allograft rejection. *Transplantation*, 76, 1015-1022.
- JUNEJA, V. R., MCGUIRE, K. A., MANGUSO, R. T., LAFLEUR, M. W., COLLINS, N., HAINING, W. N., FREEMAN, G. J. & SHARPE, A. H. 2017. PD-L1 on tumor cells is sufficient for immune evasion in immunogenic tumors and inhibits CD8 T cell cytotoxicity. *Journal of Experimental Medicine*, 214, 895-904.
- KAUL, A. M. K., GOPARAJU, S., DVORINA, N., IIDA, S., KESLAR, K. S., DE LA MOTTE, C. A., VALUJSKIKH, A., FAIRCHILD, R. L. & BALDWIN, W. M., 3RD 2015. Acute and chronic rejection: compartmentalization and kinetics of counterbalancing signals in cardiac transplants. *American Journal of Transplantation* 15, 333-345.
- KEOGH, A., RICHARDSON, M., RUYGROK, P., SPRATT, P., GALBRAITH, A., O'DRISCOLL, G., MACDONALD, P., ESMORE, D., MULLER, D. & FADDY, S. 2004. Sirolimus in de novo heart transplant recipients reduces acute rejection

- and prevents coronary artery disease at 2 years. *Circulation*, 110, 2694-2700.
- KINDERMANN, I., BARTH, C., MAHFOUD, F., UKENA, C., LENSKI, M., YILMAZ, A., KLINGEL, K., KANDOLF, R., SECHTEM, U., COOPER, L. T. & BÖHM, M. 2012. Update on myocarditis. *Journal of the American College of Cardiology*, 59, 779-792.
- KINDERMANN, I., KINDERMANN, M., KANDOLF, R., KLINGEL, K., BÜLTMANN, B., MÜLLER, T., LINDINGER, A. & BÖHM, M. 2008. Predictors of outcome in patients with suspected myocarditis. *Circulation*, 118, 639-648.
- KLINGEL, K., SAUTER, M., BOCK, C. T., SZALAY, G., SCHNORR, J.-J. & KANDOLF, R. 2004. Molecular pathology of inflammatory cardiomyopathy. *Medical Microbiology and Immunology*, 193, 101-107.
- KÖNIGSHOFF, M. & BRANDENBURGER, T. 2012. Kurzlehrbuch Biochemie. 3. überarbeitete Auflage ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 298-312.
- KRAFT, L., ERDENESUKH, T., SAUTER, M., TSCHÖPE, C. & KLINGEL, K. 2019. Blocking the IL-1 $\beta$  signalling pathway prevents chronic viral myocarditis and cardiac remodeling. *Basic Research in Cardiology*, 114, 11, 1-16.
- KUGEL, C. H., 3RD, DOUGLASS, S. M., WEBSTER, M. R., KAUR, A., LIU, Q., YIN, X., WEISS, S. A., DARVISHIAN, F., AL-ROHIL, R. N., NDOYE, A., BEHERA, R., ALICEA, G. M., ECKER, B. L., FANE, M., ALLEGREZZA, M. J., SVORONOS, N., KUMAR, V., WANG, D. Y., SOMASUNDARAM, R., HU- LIESKOVAN, S., OZGUN, A., HERLYN, M., CONEJO-GARCIA, J. R., GABRILOVICH, D., STONE, E. L., NOWICKI, T. S., SOSMAN, J., RAI, R., CARLINO, M. S., LONG, G. V., MARAIS, R., RIBAS, A., EROGLU, Z., DAVIES, M. A., SCHILLING, B., SCHADENDORF, D., XU, W., AMARAVADI, R. K., MENZIES, A. M., MCQUADE, J. L., JOHNSON, D. B., OSMAN, I. & WEERARATNA, A. T. 2018. Age correlates with response to anti-PD1, reflecting age-related differences in intratumoral effector and regulatory T-Cell populations. *Clinical Cancer Research*, 24, 5347-5356.
- KUHLMANN, K. & JACOBS, T. 2013. Der Einfluss des koinhibitorischen Rezeptors PD-1 (Programmed death-one) auf die Effizienz einer vakzine-induzierten CD8+ T-Zell Antwort [Dissertation]. *Hamburg: Universität Hamburg; 2013*.
- LANE, J. R., NEUMANN, D. A., LAFOND-WALKER, A., HERSKOWITZ, A. & ROSE, N. R. 1992. Interleukin 1 or tumor necrosis factor can promote Coxsackie B3- induced myocarditis in resistant B10.A mice. *The Journal of Experimental Medicine*, 175, 1123-1129.
- LANG, R. M., BADANO, L. P., MOR-AVI, V., AFILALO, J., ARMSTRONG, A., ERNANDE, L., FLACHSKAMPF, F. A., FOSTER, E., GOLDSTEIN, S. A., KUZNETSOVA, T., LANCELLOTTI, P., MURARU, D., PICARD, M. H., RIETZSCHEL, E. R., RUDSKI, L., SPENCER, K. T., TSANG, W. & VOIGT, J.-U. 2015. Recommendations for cardiac chamber quantification by echocardiography in adults: An update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. *European Heart Journal - Cardiovascular Imaging*, 16, 233-271.
- LEONE, O., VEINOT, J., ANGELINI, A., BAANDRUP, U., BASSO, C., BERRY, G., BRUNEVALL, P., BURKE, M., BUTANY, J., CALABRESE, F., D'AMATI, G., EDWARDS, W., FALLON, J., FISHBEIN, M., GALLAGHER, P., HALUSHKA, M., MCMANUS, B., PUCCI, A., RODRIGUEZ, E. & WINTERS, G. 2011. 2011 Consensus statement on endomyocardial biopsy from the Association for European Cardiovascular Pathology and the Society for Cardiovascular Pathology. *Cardiovascular Pathology*, 21, 245-274.

- LI, K., XU, W., GUO, Q., JIANG, Z., WANG, P., YUE, Y. & XIONG, S. 2009. Differential macrophage polarization in male and female BALB/c mice infected with coxsackievirus B3 defines susceptibility to viral myocarditis. *Circulation Research*, 105, 353-364.
- LICHTMAN, A. H. 2013. The heart of the matter: protection of the myocardium from T cells. *Journal of Autoimmunity*, 45, 90-96.
- LIM, W. C., OLDING, M., HEALY, E. & MILLAR, T. M. 2018. Human endothelial cells modulate CD4(+) T cell populations and enhance regulatory T cell suppressive capacity. *Frontiers in Immunology*, 9, 565, 1-14.
- LIU, Y., LIU, S., WU, C., HUANG, W., XU, B., LIAN, S., WANG, L., YUE, S., CHEN, N. & ZHU, Z. 2020. PD-1-mediated PI3K/Akt/mTOR, caspase 9/caspase 3 and ERK pathways are involved in regulating the apoptosis and proliferation of CD4+ and CD8+ T cells during BVDV infection in vitro. *Frontiers in Immunology*, 11, 467, 1-15.
- LUCAS, J. A., MENKE, J., RABACAL, W. A., SCHOEN, F. J., SHARPE, A. H. & KELLEY, V. R. 2008. Programmed death ligand 1 regulates a critical checkpoint for autoimmune myocarditis and pneumonitis in MRL mice. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 181, 2513-2521.
- LUDHWANI, D., FAN, J., KANMANTHAREDDY, A. 2020. Heart transplantation rejection. *StatPearls, Updated 2020 Jun 5, Accessed 2020 Jun 10.* <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537057/> ed.
- LUND, L. H., EDWARDS, L. B., KUCHERYAVAYA, A. Y., BENDEN, C., CHRISTIE, J. D., DIPCHAND, A. I., DOBELS, F., GOLDFARB, S. B., LEVVEY, B. J., MEISER, B., YUSEN, R. D. & STEHLIK, J. 2014. The registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirty-first official adult heart transplant report-2014; Focus theme: Retransplantation. *Journal of Heart and Lung Transplantation*, 33, 996-1008.
- LUO, X., BUDIARDJO, I., ZOU, H., SLAUGHTER, C. & WANG, X. 1998. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*, 94, 481-490.
- LV, H. & LIPES, M. A. 2012. Role of impaired central tolerance to  $\alpha$ -myosin in inflammatory heart disease. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 22, 113-117.
- MAEDA, K., SHIOI, T., KOSUGI, R., YOSHIDA, Y., TAKAHASHI, K., MACHIDA, Y. & IZUMI, T. 2005. Rapamycin ameliorates experimental autoimmune myocarditis. *International Heart Journal*, 46, 513-530.
- MAGNANI, J. W. & DEC, G. W. 2006. Myocarditis. *Circulation*, 113, 876-890.
- MAGNANI, J. W., SUK DANIK, H. J., DEC, G. W. & DISALVO, T. G. 2006. Survival in biopsy-proven myocarditis: A long-term retrospective analysis of the histopathologic, clinical, and hemodynamic predictors. *American Heart Journal*, 151, 463-470.
- MAHMOOD, S. S., FRADLEY, M. G., COHEN, J. V., NOHRIA, A., REYNOLDS, K. L., HEINZERLING, L. M., SULLIVAN, R. J., DAMRONGWATANASUK, R., CHEN, C. L., GUPTA, D., KIRCHBERGER, M. C., AWADALLA, M., HASSAN, M. Z. O., MOSLEHI, J. J., SHAH, S. P., GANATRA, S., THAVENDIRANATHAN, P., LAWRENCE, D. P., GROARKE, J. D. & NEILAN, T. G. 2018. Myocarditis in patients treated with immune checkpoint inhibitors. *Journal of the American College of Cardiology*, 71, 1755-1764.
- MAHRHOLDT, H., WAGNER, A., DELUIGI, C. C., KISPERS, E., HAGER, S., MEINHARDT, G., VOGELBERG, H., FRITZ, P., DIPPON, J., BOCK, C.-T., KLINGEL, K., KANDOLF, R. & SECHTEM, U. 2006. Presentation, patterns of

- myocardial damage, and clinical course of viral myocarditis. *Circulation*, 114, 1581-1590.
- MAISCH, B. 1999. World Heart Federation consensus conferences' definition of inflammatory cardiomyopathy (myocarditis): Report from two expert committees on histology and viral cardiomyopathy. *Heartbeat* 4, 3–4.
- MAISCH, B. & ALTER, P. 2018. Treatment options in myocarditis and inflammatory cardiomyopathy. *Herz*, 43, 423-430.
- MAISCH, B., PORTIG, I., RISTIC, A., HUFNAGEL, G. & PANKUWEIT, S. 2000. Definition of inflammatory cardiomyopathy (myocarditis): On the way to consensus a status report. *Herz*, 25, 200-209.
- MARON, B. J., TOWBIN, J. A., THIENE, G., ANTZELEVITCH, C., CORRADO, D., ARNETT, D., MOSS, A. J., SEIDMAN, C. E. & YOUNG, J. B. 2006. Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies. *Circulation*, 113, 1807-1816.
- MCCARTHY, R. E., BOEHMER, J. P., HRUBAN, R. H., HUTCHINS, G. M., KASPER, E. K., HARE, J. M. & BAUGHMAN, K. L. 2000. Long-term outcome of fulminant myocarditis as compared with acute (nonfulminant) myocarditis. *New England Journal of Medicine*, 342, 690-695.
- MCDONALD, D. R. & LEVY, O. 2019. Innate immunity. In: RICH, R. R., FLEISHER, T. A., SHEARER, W. T., SCHROEDER, H. W., FREW, A. J. & WEYAND, C. M. (eds.) *Clinical Immunology (Fifth Edition)*. Elsevier, 39-53.
- MEDZHITOV, R. 2010. Inflammation 2010: New adventures of an old flame. *Cell*, 140, 771-776.
- MICHEL, C. & OHLOW, M. 2018. Prognostische Faktoren für den Krankheitsverlauf bei Patienten mit bioptisch gesicherter inflammatorischer Kardiomyopathie aus den Jahren 2006-2011 [Dissertation]. *Marburg: Philipps-Universität Marburg;2018*.
- MICHELS, G. & KOCHANEK, M. 2010. Repetitorium internistische Intensivmedizin. 1. Auflage. 1. Auflage ed. Berlin/Heidelberg: Springer, 137-174.
- MORA, A., DAVIES, A. M., BERTRAND, L., SHARIF, I., BUDAS, G. R., JOVANOVIĆ, S., MOUTON, V., KAHN, C. R., LUCOCQ, J. M., GRAY, G. A., JOVANOVIĆ, A. & ALESSI, D. R. 2003. Deficiency of PDK1 in cardiac muscle results in heart failure and increased sensitivity to hypoxia. *European Molecular Biology Organization Journal*, 22, 4666-4676.
- MOREAU, A., VAREY, E., ANEGON, I. & CUTURI, M.-C. 2013. Effector mechanisms of rejection. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 3, a015461.
- MOSLEHI, J. J., SALEM, J.-E., SOSMAN, J. A., LEBRUN-VIGNES, B. & JOHNSON, D. B. 2018. Increased reporting of fatal immune checkpoint inhibitor-associated myocarditis. *Lancet*, 391, 933, 1-4.
- NISHIMURA, H., OKAZAKI, T., TANAKA, Y., NAKATANI, K., HARA, M., MATSUMORI, A., SASAYAMA, S., MIZOGUCHI, A., HIAI, H., MINATO, N. & HONJO, T. 2001. Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor- deficient mice. *Science* 291, 319-322.
- NITULESCU, G. M., VAN DE VENTER, M., NITULESCU, G., UNGURIANU, A., JUZENAS, P., PENG, Q., OLARU, O. T., GRĂDINARU, D., TSATSAKIS, A., TSOUKALAS, D., SPANDIDOS, D. A. & MARGINA, D. 2018. The Akt pathway in oncology therapy and beyond (Review). *International Journal of Oncology*, 53, 2319-2331.
- NORDET, P., MARTIN, I., GYARFAS, I., GOODWIN, J., THIENE, G., OLSEN, E., O'CONNELL, J., MAUTNER, B., MAISCH, B., BRISTOW, M., MCKENNA, W. & RICHARDSON, P. 1996. Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology task force on the definition and classification of cardiomyopathies. *Circulation*, 93, 841-842.

- ODORIZZI, P. M., PAUKEN, K. E., PALEY, M. A., SHARPE, A. & WHERRY, E. J. 2015. Genetic absence of PD-1 promotes accumulation of terminally differentiated exhausted CD8<sup>+</sup> T cells. *Journal of Experimental Medicine*, 212, 1125-1137.
- OH, H. & GHOSH, S. 2013. NF- $\kappa$ B: roles and regulation in different CD4(+) T-cell subsets. *Immunological Reviews*, 252, 41-51.
- OH, J. Y., LEE, H. J., KO, A. Y., KO, J. H., KIM, M. K. & WEE, W. R. 2013. Analysis of macrophage phenotype in rejected corneal allografts. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 54, 7779-7784.
- OKAZAKI, T., MAEDA, A., NISHIMURA, H., KUROSAKI, T. & HONJO, T. 2001. PD-1 immunoreceptor inhibits B cell receptor-mediated signaling by recruiting src homology 2-domain-containing tyrosine phosphatase 2 to phosphotyrosine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, 13866-13871.
- OKAZAKI, T., TANAKA, Y., NISHIO, R., MITSUIYE, T., MIZOGUCHI, A., WANG, J., ISHIDA, M., HIAI, H., MATSUMORI, A., MINATO, N. & HONJO, T. 2003. Autoantibodies against cardiac troponin I are responsible for dilated cardiomyopathy in PD-1-deficient mice. *Nature medicine*, 9, 1477-1483.
- OKURA, Y., TAKEDA, K., HONDA, S., HANAWA, H., WATANABE, H., KODAMA, M., IZUMI, T., AIZAWA, Y., SEKI, S. & ABO, T. 1998. Recombinant murine interleukin-12 facilitates induction of cardiac myosin-specific type 1 helper T cells in rats. *Circulation Research*, 82, 1035-1042.
- OZTURK, V., YIKILMAZ, A. S., KILICARSLAN, A., BAKANAY, S. M., AKINCI, S. & DILEK, İ. 2020. The triple positivity for EBV, PD-1, and PD-L1 identifies a very high risk classical hodgkin lymphoma. *Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia*, 20, 375-381.
- PAHWA R, G. A., BANSAL P, ET AL. 2020. Chronic inflammation. *StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; Updated 2020 Jul 4.*
- PAPPRITZ, K., SAVVATIS, K., LINDNER, D., WESTERMANN, D., MELZIG, M. F., SCHULTHEISS, H. P. & TSCHOEPE, C. 2013. Administration of regulatory T cells ameliorates myocardial inflammation in experimental myocarditis. *European Heart Journal*, 34, 279.
- PARK, Y., JIN, H.-S., LOPEZ, J., ELLY, C., KIM, G., MURAI, M., KRONENBERG, M. & LIU, Y.-C. 2013. TSC1 regulates the balance between effector and regulatory T cells. *Journal of Clinical Investigation*, 123, 5165-5178.
- PATEL, A. D., LOWES, B., CHAMSI-PASHA, M. A., RADIO, S. J., HYDEN, M. & ZOLTY, R. 2019. Sirolimus for recurrent giant cell myocarditis after heart transplantation: A unique therapeutic strategy. *American Journal of Therapeutics*, 26, 600-603.
- PATENTE, T. A., PINHO, M. P., OLIVEIRA, A. A., EVANGELISTA, G. C. M., BERGAMI-SANTOS, P. C. & BARBUTO, J. A. M. 2019. Human dendritic cells: Their heterogeneity and clinical application potential in cancer immunotherapy. *Frontiers in Immunology*, 9, 3176, 1-18.
- PAUKEN, K. E., SAMMONS, M. A., ODORIZZI, P. M., MANNE, S., GODEC, J., KHAN, O., DRAKE, A. M., CHEN, Z., SEN, D. R., KURACHI, M., BARNITZ, R. A., BARTMAN, C., BENGSCHE, B., HUANG, A. C., SCHENKEL, J. M., VAHEDI, G., HAINING, W. N., BERGER, S. L. & WHERRY, E. J. 2016. Epigenetic stability of exhausted T cells limits durability of reinvigoration by PD-1 blockade. *Science*, 354, 1160-1165.

- PAYDAS, S., BAĞIR, E., SAYDAOĞLU, G., ERCOLAK, V. & ERGIN, M. 2015. Programmed death-1 (PD-1), programmed death-ligand 1 (PD-L1), and EBV-encoded RNA (EBER) expression in hodgkin lymphoma. *Annals of hematology*, 94, 1545-1552.
- PIKE, R., THOMAS, N., WORKMAN, S., AMBROSE, L., GUZMAN, D., SIVAKUMARAN, S., JOHNSON, M., THORBURN, D., HARBER, M., CHAIN, B. & STAUSS, H. J. 2016. PD1-expressing T cell subsets modify the rejection risk in renal transplant patients. *Frontiers in Immunology*, 7, 126, 1-12.
- PISTULLI, R., ANDREAS, E., KÖNIG, S., DROBNIK, S., KRETZSCHMAR, D., ROHM, I., LICHTENAUER, M., HEIDECKER, B., FRANZ, M., MALL, G., YILMAZ, A. & SCHULZE, P. C. 2020. Characterization of dendritic cells in human and experimental myocarditis. *European Society of Cardiology Heart Failure*, 5, 2305-2317.
- POLANCZYK, M. J., HOPKE, C., VANDENBARK, A. A. & OFFNER, H. 2007. Treg suppressive activity involves estrogen-dependent expression of programmed death-1 (PD-1). *International Immunology*, 19, 337-343.
- PORTOCARRERO, L., QUENTAL, K., SAMORANO, L., OLIVEIRA, Z. & RIVITTI-MACHADO, M. 2018. Tuberous sclerosis complex: Review based on new diagnostic criteria. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 93, 323-331.
- QU, C. K. 2000. The SHP-2 tyrosine phosphatase: Signaling mechanisms and biological functions. *Cell Research*, 10, 279-288.
- REITSEMA, R., CADENA, R. H., NIJHOF, S., ABDULLAHAD, W., HUITEMA, M., BOOTS, A., BROUWER, E. & HEERINGA, P. 2019. Effect of age and gender on Programmed Cell Death1 expression in healthy donors. *Rheumatology*, 58, 1482.
- REUBEN, A., PETACCIA DE MACEDO, M., MCQUADE, J., JOON, A., REN, Z., CALDERONE, T., CONNER, B., WANI, K., COOPER, Z. A., TAWBI, H., TETZLAFF, M. T., PADERA, R. F., DURAND, J.-B., LAZAR, A. J., WARGO, J. A. & DAVIES, M. A. 2017. Comparative immunologic characterization of autoimmune giant cell myocarditis with ipilimumab. *Oncoimmunology*, 6, e1361097, 1-8.
- RILEY, J. L. 2009. PD-1 signaling in primary T cells. *Immunological Reviews*, 229, 114-125.
- RODIG, N., RYAN, T., ALLEN, J. A., PANG, H., GRABIE, N., CHERNOVA, T., GREENFIELD, E. A., LIANG, S. C., SHARPE, A. H., LICHTMAN, A. H. & FREEMAN, G. J. 2003. Endothelial expression of PD-L1 and PD-L2 down-regulates CD8+ T cell activation and cytotoxicity. *European Journal of Immunology*, 33, 3117-3126.
- RODRIGUEZ-GONZALEZ, M., SANCHEZ-CODEZ, M. I., LUBIAN-GUTIERREZ, M. & CASTELLANO-MARTINEZ, A. 2019. Clinical presentation and early predictors for poor outcomes in pediatric myocarditis: A retrospective study. *World Journal of Clinical Cases*, 7, 548-561.
- ROSE, N. R. 2011. Critical cytokine pathways to cardiac inflammation. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 31, 705-710.
- ROZA, A. M., COOPER, M., PIEPER, G., HILTON, G., DEMBANY, K., LAI, C. S., LINDHOLM, P., KOMOROWSKI, R., FELIX, C., JOHNSON, C. & ADAMS, M. 2000. NOX 100, a nitric oxide scavenger, enhances cardiac allograft survival and promotes long-term graft acceptance. *Transplantation*, 69, 227-231.
- SAGAR, S., LIU, P. P. & COOPER, L. T., JR. 2012. Myocarditis. *Lancet*, 379, 738-747.
- SAXTON, R. A. & SABATINI, D. M. 2017. mTOR signaling in growth, metabolism,

- and disease. *Cell*, 168, 960-976.
- SCHÖNRICH, G. & RAFTERY, M. J. 2019. The PD-1/PD-L1 axis and virus infections: A delicate balance. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9, 207, 1-14.
- SCHROTH, S., GLINTON, K., LUO, X. & THORP, E. B. 2020. Innate functions of dendritic cell subsets in cardiac allograft tolerance. *Frontiers in Immunology*, 11, 869-869.
- SCHULTZ, J. C., HILLIARD, A. A., COOPER, L. T., JR. & RIHAL, C. S. 2009. Diagnosis and treatment of viral myocarditis. *Mayo Clinic Proceedings*, 84, 1001-1009.
- SCIARRETTA, S., VOLPE, M. & SADOSHIMA, J. 2014. Mammalian target of rapamycin signaling in cardiac physiology and disease. *Circulation Research*, 114, 549-564.
- SEIF, E., CHEN, L. & GOLDMAN, B. 2017. Fulminant myocarditis: A review of the current literature. *United States Cardiology Review*, 13-16.
- SEKO, Y., TAKAHASHI, N., YAGITA, H., OKUMURA, K. & YAZAKI, Y. 1997. Expression of cytokine mRNAs in murine hearts with acute myocarditis caused by Coxsackievirus B3. *The Journal of Pathology*, 183, 105-108.
- SHENDE, P., PLAISANCE, I., MORANDI, C., PELLIEUX, C., BERTHONNECHE, C., ZORZATO, F., KRISHNAN, J., LERCH, R., HALL, M. N., RÜEGG, M. A., PEDRAZZINI, T. & BRINK, M. 2011. Cardiac raptor ablation impairs adaptive hypertrophy, alters metabolic gene expression, and causes heart failure in mice. *Circulation*, 123, 1073-1082.
- SHEPPARD, K. A., FITZ, L. J., LEE, J. M., BENANDER, C., GEORGE, J. A., WOOTERS, J., QIU, Y., JUSSIF, J. M., CARTER, L. L., WOOD, C. R. & CHAUDHARY, D. 2004. PD-1 inhibits T-cell receptor induced phosphorylation of the ZAP70/CD3zeta signalosome and downstream signaling to PKC $\theta$ . *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 574, 37-41.
- SILVERIO, J. C., PEREIRA, I. R., CIPITELLI, M. D. C., VINAGRE, N. F., RODRIGUES, M. M., GAZZINELLI, R. T. & LANNES-VIEIRA, J. 2012. CD8<sup>+</sup> T-cells expressing interferon gamma or perforin play antagonistic roles in heart injury in experimental Trypanosoma cruzi-elicited cardiomyopathy. *Public Library of Science Pathogens*, 8, e1002645, 1-20.
- SMITH, S. C. & ALLEN, P. M. 1991. Myosin-induced acute myocarditis is a T cell-mediated disease. *The Journal of Immunology*, 147, 2141-2147.
- SONG, X., KUSAKARI, Y., XIAO, C.-Y., KINSELLA, S. D., ROSENBERG, M. A., SCHERRER-CROSBIE, M., HARA, K., ROSENZWEIG, A. & MATSUI, T. 2010. mTOR attenuates the inflammatory response in cardiomyocytes and prevents cardiac dysfunction in pathological hypertrophy. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 299, 1256-1266.
- STEINMAN, R. M. & NUSSENZWEIG, M. C. 2002. Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 351-358.
- STEINMAN, R. M. & WITMER, M. D. 1978. Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 75, 5132-5136.
- STEWART, S., WINTERS, G. L., FISHBEIN, M. C., TAZELAAR, H. D.,

- KOBASHIGAWA, J., ABRAMS, J., ANDERSEN, C. B., ANGELINI, A., BERRY, G. J., BURKE, M. M., DEMETRIS, A. J., HAMMOND, E., ITESCU, S., MARBOE, C. C., MCMANUS, B., REED, E. F., REINSMOEN, N. L., RODRIGUEZ, E. R., ROSE, A. G., ROSE, M., SUCIU-FOCIA, N., ZEEVI, A. & BILLINGHAM, M. E. 2005. Revision of the 1990 working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of heart rejection. *Journal of Heart and Lung Transplantation*, 24, 1710-1720.
- TAKASATO, F., MORITA, R., SCHICHITA, T., SEKIYA, T., MORIKAWA, Y., KURODA, T., NIIMI, M. & YOSHIMURA, A. 2014. Prevention of allogeneic cardiac graft rejection by transfer of ex vivo expanded antigen-specific regulatory T-cells. *Public Library of Science ONE*, 9, e87722, 1-11.
- TAKEUCHI, O. & AKIRA, S. 2010. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*, 140, 805-820.
- TANAKA, K., ALBIN, M. J., YUAN, X., YAMAURA, K., HABICHT, A., MURAYAMA, T., GRIMM, M., WAAGA, A. M., UENO, T., PADERA, R. F., YAGITA, H., AZUMA, M., SHIN, T., BLAZAR, B. R., ROTHSTEIN, D. M., SAYEGH, M. H. & NAJAFIAN, N. 2007. PDL1 is required for peripheral transplantation tolerance and protection from chronic allograft rejection. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 179, 5204-5210.
- TANG, H., ZHONG, Y., ZHU, Y., ZHAO, F., CUI, X. & WANG, Z. 2010. Low responder T cell susceptibility to the suppressive function of regulatory T cells in patients with dilated cardiomyopathy. *Heart*, 96, 765-771.
- TARRIO, M. L., GRABIE, N., BU, D. X., SHARPE, A. H. & LICHTMAN, A. H. 2012. PD-1 protects against inflammation and myocyte damage in T cell-mediated myocarditis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 188, 4876-4884.
- TAYLOR, J. A., HAVARI, E., MCINERNEY, M. F., BRONSON, R., WUCHERPFENNIG, K. W. & LIPES, M. A. 2004. A spontaneous model for autoimmune myocarditis using the human MHC molecule HLA-DQ8. *Journal of immunology* 172, 2651-2658.
- TERASAKI, P. I. 2003. Humoral theory of transplantation. *American Journal of Transplantation*, 3, 665-673.
- VAN DER BORGHT, K., SCOTT, C. L., MARTENS, L., SICHEN, D., VAN ISTERDAEL, G., NINDL, V., SAEYS, Y., BOON, L., LUDEWIG, B., GILLEBERT, T. C. & LAMBRECHT, B. N. 2018. Myocarditis elicits dendritic cell and monocyte infiltration in the heart and self-antigen presentation by conventional type 2 dendritic cells. *Frontiers in Immunology*, 9, 2714-2714.
- WANG, H., KADLECEK, T. A., AU-YEUNG, B. B., GOODFELLOW, H. E. S., HSU, L.-Y., FREEDMAN, T. S. & WEISS, A. 2010a. ZAP-70: An essential kinase in T-cell signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2, a002279, 1-17.
- WANG, J., OKAZAKI, I.-M., YOSHIDA, T., CHIKUMA, S., KATO, Y., NAKAKI, F., HIAI, H., HONJO, T. & OKAZAKI, T. 2010b. PD-1 deficiency results in the development of fatal myocarditis in MRL mice. *International Immunology*, 22, 443-452.
- WANG, Z., HONG, J., SUN, W., XU, G., LI, N., CHEN, X., LIU, A., XU, L., SUN, B. & ZHANG, J. Z. 2006. Role of IFN-gamma in induction of Foxp3 and conversion of CD4+ CD25- T cells to CD4+ Tregs. *Journal of Clinical Investigation*, 116, 2434-2441.
- WEI, F., ZHONG, S., MA, Z., KONG, H., MEDVEC, A., AHMED, R., FREEMAN, G.

- J., KROGSGAARD, M. & RILEY, J. L. 2013. Strength of PD-1 signaling differentially affects T-cell effector functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110, 2480-2489.
- XU, J. & BROOKS, E. G. 2016. Giant cell myocarditis: A brief review. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 140, 1429-1434.
- YA-WEN, W., ZHEN, W. & BING-YI, S. H. I. 2011. Programmed death 1 mRNA in peripheral blood as biomarker of acute renal allograft rejection. *Chinese Medical Journal*, 124, 674-678.
- YAMAGUCHI, S., SAWAMURA, A., NAKAGURO, M., SHIMOYAMA, Y., MORIMOTO, R., KATO, H., ARAO, Y., OISHI, H., HAGA, T., KUWAYAMA, T., YOKOI, T., HIRAIWA, H., KONDO, T., OKUMURA, T. & MUROHARA, T. 2020. Giant cell myocarditis with central diabetes insipidus: A case report. *Journal of Cardiology Cases*, 21, 8-11.
- YANG, J., PEMBERTON, A., MORRISON, W. I. & CONNELLEY, T. 2018. Granzyme B is an essential mediator in CD8(+) T cell killing of theileria parva-infected cells. *Infection and Immunity*, 87, e00386-18, 1-15.
- YANG, L., HUANG, F., MEI, J., WANG, X., ZHANG, Q., WANG, H., XI, M. & YOU, Z. 2017. Posttranscriptional control of PD-L1 expression by 17 $\beta$ -estradiol via PI3K/Akt signaling pathway in ER $\alpha$ -positive cancer cell lines. *International Journal of Gynecological Cancer*, 27, 196-205.
- YNDESTAD, A., HOLM, A. M., MÜLLER, F., SIMONSEN, S., FRØLAND, S. S., GULLESTAD, L. & AUKRUST, P. 2003. Enhanced expression of inflammatory cytokines and activation markers in T-cells from patients with chronic heart failure. *Cardiovascular Research*, 60, 141-146.
- ZHANG, D., CONTU, R., LATRONICO, M. V. G., ZHANG, J., RIZZI, R., CATALUCCI, D., MIYAMOTO, S., HUANG, K., CECI, M., GU, Y., DALTON, N. D., PETERSON, K. L., GUAN, K.-L., BROWN, J. H., CHEN, J., SONENBERG, N. & CONDORELLI, G. 2010. mTORC1 regulates cardiac function and myocyte survival through 4E-BP1 inhibition in mice. *Journal of Clinical Investigation*, 120, 2805-2816.
- ZHANG, J., ZHANG, F. & NIU, R. 2015. Functions of Shp2 in cancer. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 19, 2075-2083.

## **7 Erklärung zum Eigenanteil**

Die Arbeit wurde im Institut für Pathologie und Neuropathologie unter Betreuung von Frau Professor Dr. Karin Klingel durchgeführt.

Die Auszählung der Zellzahlen, die Vergabe der Scores sowie die Erhebung der Einflussfaktoren aus den von den behandelnden Kliniken eingesandten Unterlagen wurden nach Einarbeitung durch Frau Sandra Bundschuh und Frau Professor Dr. Karin Klingel von mir zusammen mit Frau Professor Dr. Karin Klingel eigenständig durchgeführt. Die Diagnosestellung der Proben wurde im Rahmen der Routinediagnostik von Mitarbeiter\*innen des Instituts für Pathologie und Neuropathologie durchgeführt. Die mikroskopischen Aufnahmen der Präparate erfolgten durch Frau Professor Dr. Karin Klingel. Die statistische Auswertung sowie die Erstellung der Abbildungen und Tabellen erfolgte durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben. In der vorliegenden Arbeit wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit von der männlichen Form Gebrauch gemacht, welche sich jedoch immer gleichermaßen auf alle Geschlechter bezieht und keine Wertung darstellt.

Tübingen, den 10. Januar 2022

## **8 Danksagung**

Ich danke meiner Doktormutter Frau Professor Dr. Karin Klingel für die Überlassung des Themas und dafür, dass sie unermüdlich meine Dissertationsschrift Korrektur gelesen hat, stets ein offenes Ohr für mich hatte und mir einen Einblick in ihre Welt der Forschung ermöglicht hat. Ich danke Frau Sandra Bundschuh für ihre Einarbeitung und all die Mails voller Fragen, die sie mir beantwortet hat. Zudem danke ich allen Mitarbeitenden des Instituts für Pathologie für die Durchführung der molekularbiologischen Diagnostik und die Einblicke, die sie mir hierin gegeben haben. Außerdem danke ich dem Institut für Klinische Epidemiologie und angewandte Biometrie für die statistische Beratung. Ein großes Dankeschön gilt auch meinen Kommilitoninnen und Kommilitonen, die mich nicht nur während meiner Dissertation, sondern mein ganzes Studium begleitet und alle meine Launen geduldig ertragen haben. Gleiches gilt meinen Eltern und Geschwistern, meinen Mitbewohner\*innen und meinen Freunden, die diesen Job auch außerhalb des universitären Alltags bemerkenswert gut übernommen haben. Insbesondere möchte ich hierbei meiner Mutter Martina Schönleber sowie meinen Freundinnen Anja Wahl, Pia Glang und Verena Folusewytch danken, die meiner Dissertationsschrift grammatikalisch wie satzbautechnisch den letzten Schliff verliehen, da Grammatik bekannterweise für eine Schwäbin wie mich nicht allzu einfach ist. Zudem danke ich allen Menschen, die in ihrer Freizeit Videos zur Benutzung von Statistikprogrammen drehen, da ich ohne diese noch mehr unzählige Stunden mit der Auswertung meiner Daten zugebracht hätte. Mein letzter Dank geht an Gott, von dem niemand wissen kann, ob es ihn wirklich gibt, von dem ich aber glaube, dass er sich über dieses Dankeswort freut.