

Aus der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin B

(Direktor: Univ.- Prof. Dr. med. S. Felix)

der Universitätsmedizin der Universität Greifswald

**Einfluss der Interleukin-6 Inhibition auf die kardiale Funktion transgener
herzinsuffizienter Mäuse**

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung des akademischen

Grades

Doktor der Medizin

(Dr. med.)

der

Universitätsmedizin

der

Universität Greifswald

2022

vorgelegt von Stella Felicitas Altmann

geboren am 08.03.1994

in Berlin

Dekan: Prof. Dr. Karlhans Endlich

1. Gutachter/in: PD Dr. Stephanie Könemann

2. Gutachter/in: Prof. Dr. Barbara Bröker

Ort: Greifswald

Tag der Disputation: 10.01.2023

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	-I-
Abkürzungsverzeichnis	-V-
Abbildungsverzeichnis	-VIII-
Tabellenverzeichnis	-IX-
1. Einleitung	- 1 -
1.1 Herzinsuffizienz (HI)	- 1 -
1.1.1 Definition	- 1 -
1.1.2 Epidemiologie	- 1 -
1.1.3 Terminologie und Klassifikation	- 2 -
1.1.4 Ätiologie	- 3 -
1.1.5 Symptome und klinische Befunde	- 4 -
1.1.6 Pathophysiologie	- 5 -
1.1.6.1 Kardiales Remodeling	- 5 -
1.1.6.2 Die Rolle inflammatorischer Zytokine in der Pathogenese der HI	- 7 -
1.1.7 Diagnostik	- 8 -
1.1.7.1 Biomarker für die HI	- 8 -
1.1.7.2 Kardiale Bildgebungsverfahren	- 9 -
1.1.7.3 Die kardiale Magnetresonanztomographie (MRT) beim Tier	- 10 -
1.1.8 Therapie	- 10 -
1.1.8.1 Anti-inflammatorische Therapie der HI	- 11 -
1.2 Rolle von Interleukin-6 (IL-6) bei der HI	- 12 -
1.2.1 IL-6 Rezeptor (IL-6R) und assoziierte Signaltransduktionswege	- 13 -
1.2.2 Therapie mittels IL-6 Inhibition	- 15 -
1.2.3 Interleukin-17A (IL-17A) und seine Interaktion mit IL-6	- 16 -
1.3 Transgenes Tiermodell für HI	- 18 -
1.4 Zielsetzung der Arbeit	- 19 -
2. Material und Methoden	- 21 -
2.1 Material	- 21 -
2.1.1 MRT und Zubehör	- 21 -
2.1.2 Verbrauchsmaterialien, Substanzen, Chemikalien und Puffer	- 21 -
2.1.3 Antikörper (AK) und Primer	- 23 -

2.1.4 Geräte	- 24 -
2.1.5 Software	- 25 -
2.2 Methoden	- 25 -
2.2.1 Versuchstiere	- 25 -
2.2.2 Gruppeneinteilung	- 26 -
2.2.3 Übersicht des Versuchsablaufs	- 27 -
2.2.4 MRT-gestützte Untersuchung der murinen Herzfunktion	- 27 -
2.2.4.1 Grundlagen der MRT-Untersuchung	- 27 -
2.2.4.2 Narkose, Lagerung und <i>Monitoring</i>	- 28 -
2.2.4.3 Elektrokardiographische und respiratorische Synchronisation	- 29 -
2.2.4.4 Planung der Sequenzen und Bildakquisition	- 30 -
2.2.4.5 Auswertung der MRT-Daten	- 32 -
2.2.5 Substanzapplikation	- 33 -
2.2.6 Gewebeentnahme	- 34 -
2.2.7 Plasmaanalyse	- 34 -
2.2.8 RNA-Analytik	- 35 -
2.2.8.1 RNA-Isolation	- 35 -
2.2.8.2 Genexpressionsanalyse mittels quantitativer <i>Real-Time</i> PCR (TaqMan [®])	- 36 -
2.2.8.3 Genexpressionsanalyse mittels der NanoString nCounter [®] -Methode	- 36 -
2.2.9 Protein-Analytik	- 38 -
2.2.9.1 Western Blot	- 38 -
2.2.10 Histologie	- 39 -
2.2.10.1 Hypertrophieanalyse	- 39 -
2.2.10.2 Bestimmung des Fibrosegrades	- 39 -
2.2.11 Immunhistochemie	- 39 -
2.2.12 Statistische Datenanalyse	- 40 -
3. Ergebnisse	- 41 -
3.1 Charakterisierung des murinen HI-Modells α -MHC-Cyclin T1/G α q hinsichtlich der Rollen von IL-6 und IL-17A	- 41 -
3.2 Effekte der direkten IL-6 Rezeptorblockade auf das Herz	- 43 -
3.2.1 <i>In vivo</i> Analyse der Herzfunktion mittels Kleintier-MRT	- 43 -

3.2.2 <i>In vitro</i> Analysen	- 45 -
3.2.2.1 Einfluss der IL-6 Rezeptorinhibition auf die Konzentration und Expression von IL-6 und IL-17A	- 45 -
3.2.2.2 Effekte der IL-6 Rezeptorblockade auf HI- assoziierte Biomarker	- 46 -
3.2.2.3 Auswirkungen der IL-6 Rezeptorinhibition auf die Konzentration und Expression weiterer ausgewählter inflammatorischer Zytokine	- 48 -
3.2.2.4 Einfluss der IL-6 Rezeptorblockade auf das kardiale Remodeling	- 50 -
3.2.2.5 Effekte der IL-6 Rezeptorinhibition auf IL-6-assoziierte Signaltransduktionswege und Mitglieder der IL-6- Typ Zytokinfamilie	- 51 -
3.2.2.6 Immunhistochemische Analysen zum Nachweis des IL-6 Rezeptorblockers MR16-1 im Herzgewebe	- 53 -
3.3. Effekte einer indirekten IL-6 Inhibition auf das Herz	- 54 -
3.3.1 Einfluss von anti-IL-17A Antikörpern auf die Herzfunktion	- 54 -
3.3.2 Effekte von anti-IL-17A Antikörpern auf <i>in vitro</i> Parameter	- 56 -
3.3.2.1 Einfluss auf die Zytokine IL-17A und IL-6	- 56 -
3.3.2.2 Einfluss auf IL-6-assoziierte Signalwege und IL-6-Typ Zytokinfamilienmitglieder	- 57 -
3.3.2.3 Einfluss einer IL-17A Inhibition auf die Plasmaspiegel ausgewählter Zytokine	- 58 -
3.3.2.4 Effekte auf die Konzentration HI-assoziiierter Biomarker	- 60 -
3.3.2.5 Einfluss auf das kardiale Remodeling	- 60 -
4. Diskussion	- 61 -
4.1 Charakterisierung des murinen HI-Modells hinsichtlich der Rollen von IL-6 und IL-17A sowie der krankheitsspezifischen Morbidität	- 61 -
4.2 Effekte einer direkten IL-6 Rezeptorblockade	- 62 -
4.3 Effekte einer indirekten IL-6 Inhibition	- 71 -
4.4 Einfluss von Immunglobulinen (Ig) auf die kardiale Funktion und ihre mögliche Rolle bei der Therapie der HI	- 75 -
5. Zusammenfassung	- 81 -
6. Literaturverzeichnis	- 83 -

7. Anhang	- 107 -
Eidesstattliche Erklärung	- 111 -
Lebenslauf	- 112 -
<i>Danksagung</i>	- 113 -
<i>Widmung</i>	- 114 -

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
2/4CV	Zwei-/Vierkammerblick (<i>2/4-chamber view</i>)
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
Akt	Proteinkinase B
α -MHC	<i>Alpha-myosin heavy chain</i>
BNP	B-Typ natriuretisches Peptid
bzw.	beziehungsweise
Cdk 9	Cyclin-abhängigen Kinase 9
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Col	Kollagen
CRP	C-reaktives Protein
CSA	Querschnittsfläche der Kardiomyozyten
CT	Computertomographie
CT-1	Cardiotrophin-1
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
d.h.	das heißt
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamineteraessigsäure
EKG	Elektrokardiogramm
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent Assay</i>
ESC	Europäische Gesellschaft für Kardiologie
<i>FLASH</i>	<i>fast low angle shot</i>
FVB	<i>Friend Leukemia Virus B strain</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
gp	Glykoprotein
GRE	Gradient echo
h	Stunde(n)
HE	Hämatoxylin-Eosin
HFmrEF	Herzinsuffizienz mit mäßiggradig eingeschränkter systolischer linksventrikulärer Funktion

HFpEF	Herzinsuffizienz mit erhaltener systolischer linksventrikulärer Funktion
HFrEF	Herzinsuffizienz mit reduzierter systolischer linksventrikulärer Funktion
HI	Herzinsuffizienz
HRP	<i>Horse radish peroxidase</i>
HZV	Herzzeitvolumen
IFN- γ	Interferon-gamma
Ig	Immunglobuline
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IL-6R	Interleukin-6 Rezeptor
insb.	insbesondere
IVIG	Intravenöse Immunglobuline
JAK	Janus Kinase
kDA	Kilodalton
KHK	Koronare Herzkrankheit
l	Liter
LIF	Leukämiehemmender Faktor
LVEDD	Linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser
LVEDV	Linksventrikuläres enddiastolisches Volumen
LVEF	Linksventrikuläre Ejektionsfraktion
LVESD	Linksventrikulärer endsystolischer Durchmesser
LVESV	Linksventrikuläres endsystolisches Volumen
LVFS	Linksventrikuläres <i>Fractional shortening</i>
LVM	Linksventrikuläre Masse
LVSV	Linksventrikuläres Schlagvolumen
m	Meter
μ	micro = 10^{-6}
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
Mhz	Megahertz
MI	Myokardinfarkt
min	Minute
ml	Mililiter
mm	Milimeter
mM	Milimol

MMP	Matrixmetalloprotease
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
ms	Milisekunde
NaCl	Natriumchlorid
NF-kB	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>
nm	Nanometer
nM	Nanomol
NT-proBNP	amino-terminales pro- <i>brain</i> natriuretisches Peptid
NYHA	<i>New York Heart Association</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RNA	Ribonukleinsäure
s	Sekunde
SAFE	<i>Survivor Activating Factor Enhancement</i>
SAX	Kurz-Achsenschnitt (<i>short-axis view</i>)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEM	<i>Standard error of mean</i>
SOCS3	Suppressorprotein für Zytokinsignale 3
sog.	sogenannt
STAT3	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription 3</i>
T	Tesla
Tab.	Tabelle
TGF-β1	<i>Transforming Growth Factor-beta1</i>
Th17-Zellen	Typ17-T-Helferzellen
TNF-α	Tumornekrosefaktor-alpha
Triton	Octylphenoxy Polyethoxyethanol
u.a.	unter anderem
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
vs.	versus
WT	Wildtyptier
z.B.	zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Die HI als chronisch progrediente Erkrankung.
- Abb. 2: Schematische Darstellung der IL-6 Rezeptor-assoziierten Signaltransduktion am Beispiel des JAK-STAT3 Signalweges.
- Abb. 3: Struktur des humanisierten antihumanen IL-6-Rezeptor Antikörpers Tocilizumab.
- Abb. 4: Wirkungsweise des anti-IL-6 Rezeptor Antikörpers Tocilizumab.
- Abb. 5: Schematische Darstellung der IL-6/IL-17A/STAT3-*Feedback*-Schleife.
- Abb. 6: Bruker ClinScan 70/30 USR.
- Abb. 7: Versuchsaufbau.
- Abb. 8: *Monitoring* der Vitalparameter während der MRT-Messung.
- Abb. 9: Repräsentative Aufnahmen der Standardblicke bei Cyclin T1/Gαq-Mäusen im *GRE-cine*-Modus.
- Abb. 10: Prinzip der Berechnung der linksventrikulären Funktionsparameter LVEDV, LVESV, LVEF und LVM auf der Basis eines *full-volume*-Datensets des linken Ventrikels.
- Abb. 11: Endo- und epikardiale Konturierung mittels der *Software* Segment.
- Abb. 12: Prinzip der NanoString nCounter[®] Technologie zur Analyse der Genexpression im murinen Herzgewebe.
- Abb. 13: Herstellung des Master Mixes und Vorbereitung der Reaktionsgefäße für die RNA-Hybridisierung.
- Abb. 14: Plasmakonzentrationen der Interleukine IL-6 und IL-17A im Cyclin T1/Gαq-Mausmodell.
- Abb. 15: Plasmakonzentration des C-reaktiven Proteins (CRP).
- Abb. 16: Relative Proteinexpression von IL-6 und IL-6-assoziierten Signaltransduktionswegen im Herzgewebe doppelt transgener Cyclin T1/Gαq-Tiere im Vergleich zu Wildtyptieren.
- Abb. 17: Einfluss der IL-6 Rezeptorinhibition auf die Progression der HI.
- Abb. 18: Einfluss der IL-6 Rezeptorinhibition auf die Konzentration von IL-6 und IL-17A im Plasma herzinsuffizienter Mäuse.
- Abb. 19: Einfluss der IL-6 Rezeptorblockade auf die Genexpression der Interleukine IL-6 und IL-17A in herzinsuffizienten Mäusen.
- Abb. 20: Einfluss der IL-6 Rezeptorblockade auf die Blutplasmakonzentrationen HI-assoziiierter Biomarker in Cyclin T1/Gαq-Mäusen.
- Abb. 21: Einfluss der IL-6 Rezeptorinhibition auf die Genexpression HI- assoziierter Biomarker im Herzgewebe von Cyclin T1/Gαq-Mäusen.

- Abb. 22: Einfluss der IL-6 Rezeptorblockade auf die Konzentration ausgewählter inflammatorischer Zytokine im Blutplasma herzinsuffizienter Mäuse
- Abb. 23: Einfluss der IL-6 Rezeptorblockade auf die Genexpression ausgewählter inflammatorischer Zytokine im Herzgewebe von Cyclin T1/Gαq-Mäusen.
- Abb. 24: Einfluss der IL-6 Rezeptorinhibition auf die Expression Fibrose-assoziiierter Marker im Herzgewebe von Cyclin T1/Gαq-Mäusen.
- Abb. 25: Einfluss der IL-6 Rezeptorblockade auf IL-6-assoziierte Signaltransduktionswege im Myokardgewebe herzinsuffizienter Mäuse.
- Abb. 26: Einfluss der IL-6 Rezeptorblockade auf die Genexpression von Mitgliedern der IL-6-Typ Zytokinfamilie im Myokardgewebe herzinsuffizienter Mäuse.
- Abb. 27: Immunhistochemischer Nachweis des IL-6 Rezeptor Antikörpers MR16-1.
- Abb. 28: Einfluss von anti-IL-17A Antikörpern auf die Progression der HI.
- Abb. 29: Einfluss von anti-IL-17A Antikörpern auf die Konzentration von IL-6 und IL-17A im Blutplasma herzinsuffizienter Mäuse.
- Abb. 30: Einfluss von anti-IL-17A Antikörpern auf die mRNA-Expression der Interleukine IL-6 und IL-17A im Myokardgewebe herzinsuffizienter Mäuse.
- Abb. 31: Einfluss von anti-IL-17A Antikörpern auf IL-6-assoziierte Signaltransduktionswege im Myokardgewebe herzinsuffizienter Mäuse.
- Abb. 32: Einfluss von anti-IL-17A Antikörpern auf IL-6-Typ Zytokinfamilienmitglieder im Myokardgewebe herzinsuffizienter Mäuse.
- Abb. 33: Einfluss von anti-IL-17A Antikörpern auf die Plasmakonzentration und mRNA-Expression von TNF-α und IL-1beta in herzinsuffizienten Mäusen.
- Abb. 34: Einfluss von anti-IL-17A Antikörpern auf die Konzentration HI-assoziiierter Biomarker im Blutplasma herzinsuffizienter Mäuse.
- Abb. 35: Einfluss der direkten und indirekten IL-6 Inhibition auf Hypertrophieprozesse in herzinsuffizienten Mäusen.
- Abb. 36: Einfluss der direkten und indirekten IL-6 Inhibition auf den myokardialen Fibrosegrad herzinsuffizienter Mäuse.

7.5 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: NYHA-Klassifikation der HI.

Tab. 2: Symptome und klinische Zeichen der HI.

Tab. 3: Verwendete Antikörper, eingesetzte Verdünnungen und Primer.

Tab. 4: Versuchsgruppen und entsprechende Behandlung.

Tab. 5: Übersicht ausgewählter kardialer Parameter zur *Baseline*- und Abschlussmessung.

1. Einleitung

1.1 Herzinsuffizienz

1.1.1 Definition

Die europäische Gesellschaft für Kardiologie (*European Society of Cardiology*, ESC) definiert die HI als komplexe syndromale Erkrankung, die sich durch das Vorhandensein typischer klinischer Zeichen und Symptome wie Dyspnoe, periphere Ödeme und Leistungsminderung auszeichnet (1). Die Weltgesundheitsorganisation beschreibt sie als eine verminderte körperliche Belastbarkeit, hervorgerufen durch eine kardiale Funktionsstörung. Letztere ist bedingt durch eine Struktur- und/oder Funktionsänderung des Herzens und führt zu einer verminderten kardialen Auswurfleistung und/oder einem Anstieg der kardialen Füllungsdrücke (2). Das insuffiziente Herz ist, je nach Fortschreiten der Erkrankung, nicht mehr in der Lage, den Organismus unter Ruhe- oder Belastungsbedingungen mit ausreichend Blut und Sauerstoff zu versorgen. Neuer Erkenntnisgewinn auf dem Gebiet der Pathophysiologie hat im Laufe der Zeit zu einer Erweiterung der HI-Definition geführt. Diese beschreibt die Erkrankung als multisystemische Störung, welche durch eine Dysfunktion der Herz- und Skelettmuskulatur sowie der Nieren charakterisiert ist und verweist zusätzlich auf das komplexe Muster neurohumoraler Veränderungen, durch die der Organismus die organischen Dysfunktionen zu kompensieren versucht (3).

1.1.2 Epidemiologie

Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems zählen in Deutschland zu den häufigsten Todesursachen. Im Jahr 2020 waren nach Angaben des Statistischen Bundesamtes 34,3 % der Todesfälle auf eine kardiovaskuläre Ursache zurückzuführen. Neben der chronisch ischämischen Herzkrankheit und dem akuten Myokardinfarkt (MI) spielt die HI in dieser Statistik eine vordergründige Rolle (4).

In Deutschland liegt die Prävalenz der HI bei 1-2 % der Gesamtbevölkerung. Inzidenz und Prävalenz steigen dabei kontinuierlich an (5, 6). Die steigende Tendenz begründet sich einerseits im demographischen Wandel der Gesellschaft, andererseits in den therapiebedingt besseren Überlebenschancen nach Diagnosestellung und nach Akuterkrankungen wie dem MI. Letztgenannte Entwicklung führt zu einer steigenden Anzahl Überlebender mit potenziell eingeschränkter Herzleistung.

Der gesundheitsökonomische Stellenwert von Herz-Kreislauf-Erkrankungen in Deutschland ist bedeutsam. Die hohen anfallenden Kosten ergeben sich aus der medikamentösen und nicht-medikamentösen Therapie sowie insbesondere den mit der Erkrankung assoziierten stationären Krankenhausaufenthalten. Dabei handelt es sich bei der HI um eine der häufigsten zu einer Hospitalisierung führenden Diagnosen in Deutschland (7).

Aufgrund der hohen Prävalenz und einer ausgeprägten Multimorbidität der Patienten, stellt diese Erkrankung das Gesundheitswesen vor eine enorme Herausforderung und wird auch in Zukunft ein wachsendes sozioökonomisches Problem bleiben (8).

1.1.3 Terminologie und Klassifikation

Die HI kann nach verschiedenen Kriterien eingeteilt werden. Nach dem Ort ihres Auftretens kann die HI in eine Links- oder Rechtsherzinsuffizienz eingeteilt werden.

Nach ihrem zeitlichen Verlauf können eine akute und chronische Form unterschieden werden: Während die akute HI mit einem raschen Beginn ("*de novo*" HI) oder einer schnellen Verschlechterung bestehender Symptome und klinischen Zeichen (akut dekompensierte chronische HI) einhergeht, entwickelt sich die chronische HI über einen längeren Zeitraum innerhalb von Monaten bis Jahren. Die akute HI macht eine zeitnahe Hospitalisierung zur akutmedizinischen Versorgung erforderlich (2). Eine bedrohliche Manifestation stellt dabei ein massives Lungenödem im Rahmen einer pulmonalvenösen Stauung bei akuter Linksherzinsuffizienz mit der Gefahr einer respiratorischen Insuffizienz dar (1).

Aus pathophysiologischer Sicht lassen sich eine systolische und diastolische HI unterscheiden. Bei der systolischen HI führt die eingeschränkte Kontraktilität des Ventrikels zu einer verminderten linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF). Die diastolische HI zeichnet sich hingegen durch eine Störung der Herzfüllung aus, die auf einer Zunahme der zellulären Steifigkeit und verzögerten Relaxation beruht und mit einer Erhöhung der ventrikulären Füllungsdrücke einhergeht (9). Dabei bleibt eine normale bis niedrig-normale LVEF ($\geq 50\%$) erhalten. Definitionsgemäß wird bei der diastolischen HI daher von einer HI mit erhaltener LVEF gesprochen (2).

Das Klassifikationssystem der ESC aus dem Jahr 2021 sieht eine Einteilung basierend auf der LVEF vor (1). Unter diesem Aspekt lassen sich eine systolische HI mit reduzierter LVEF (*Heart Failure with reduced Ejection Fraction*, HF_{rEF}; LVEF $\leq 40\%$), eine systolische HI mit mittelgradig eingeschränkter LVEF (*Heart Failure with mildly reduced Ejection Fraction*, HF_{mrEF}; LVEF 41-49 %) und eine diastolische HI mit erhaltener LVEF bei gestörter ventrikulärer Füllung (*Heart Failure with preserved Ejection Fraction*, HF_{pEF}; LVEF $\geq 50\%$) unterscheiden. Den drei Formen gemein ist das Vorliegen typischer klinischer Symptome und/oder Zeichen. Bei erhaltener systolischer Funktion kann bei Vorliegen oben genannter Symptome die Diagnose einer HF_{pEF} gestellt werden, wenn entsprechende echokardiographische Parameter einer diastolischen Funktionsstörung und erhöhte Plasmaspiegel der natriuretischen Peptide vorliegen. Die auf der LVEF basierende Einteilung der ESC ist wichtig, da sich die drei Unterformen hinsichtlich Ätiologie, Komorbiditäten und Therapieansprechen voneinander unterscheiden.

Eine weitere Einteilung der HI gelingt anhand des Schweregrades der Erkrankung mittels der *New York Heart Association* (NYHA)-Klassifikation und erfolgt gemäß des subjektiven Beschwerdeempfindens und der Leistungsfähigkeit der Patienten in vier Stadien (NYHA I-IV) (10) (siehe Tab. 1).

Tab. 1: NYHA-Klassifikation der HI.

Stadium	Definition
NYHA I	HI ohne Einschränkung körperlicher Tätigkeiten und ohne Beschwerden (z.B. Dyspnoe, Angina pectoris, Herzrhythmusstörungen)
NYHA II	HI mit leichtgradiger Einschränkung körperlicher Tätigkeiten und leichten Beschwerden (z.B. Dyspnoe, Angina pectoris, Herzrhythmusstörungen)
NYHA III	HI mit Einschränkung körperlicher Tätigkeiten und häufigem Auftreten von Beschwerden (z.B. Dyspnoe, Angina pectoris, Herzrhythmusstörungen)
NYHA IV	HI mit Beschwerden bei allen körperlichen Aktivitäten sowie in Ruhe

1.1.4 Ätiologie

Der HI liegen eine systolische und/oder eine diastolische Funktionsstörung zugrunde, die durch unterschiedliche Erkrankungen hervorgerufen werden können (11).

Ursachen einer systolischen Dysfunktion können eine ischämische Herzerkrankung oder ein MI als Folge der koronaren Herzkrankheit (KHK), Myokarditis, Herzrhythmusstörungen oder andere Kardiomyopathien sein. Auch ein erhöhter Pumpwiderstand aufgrund eines Abflusshindernisses, beispielsweise im Rahmen einer arteriellen oder pulmonalen Hypertonie oder eines Klappenvitiums, kann zu einer systolischen Funktionsstörung führen (1, 12). Daten der im Jahr 1948 begonnenen Framingham-Herz-Studie zufolge ist die arterielle Hypertonie die häufigste Ursache der HI, gefolgt von der KHK (13). Zusammen sind diese beiden Grundleiden für circa 70-90 % aller HI-Fälle verantwortlich (12).

Die diastolische Dysfunktion kann im Rahmen einer linksventrikulären konzentrischen Hypertrophie bei arterieller Hypertonie, restriktiven Perikarditis oder Perikardtamponade, restriktiven oder hypertrophen Kardiomyopathie, ischämischen Kardiopathie bei KHK oder seltener auch bei kardialer Amyloidose auftreten (12). Auch medikamentöse Auslöser kommen in Frage (14).

Nicht selten liegen eine Kombination mehrerer Pathologien oder ein fortgeschrittenes Lebensalter ohne weitere spezifische Auslöser der HI zugrunde (1).

1.1.5 Symptome und klinische Befunde

Die klinischen Symptome und Zeichen einer chronischen HI sind vielschichtig. In Abhängigkeit von Ätiologie, Art der funktionellen Störung sowie Alter und Geschlecht des Patienten, tritt die HI in unterschiedlichen Ausprägungsformen auf. Das Ausmaß der Myokardschädigung stellt dabei den entscheidenden Faktor dar. Die klinische Erscheinung der Erkrankung hängt zudem stark von der Länge des Zeitraums ab, über den sie sich entwickelt hat. In der Anfangsphase kommt es häufig zu univentrikulären Veränderungen, sodass zu diesem Zeitpunkt Symptome der Links- oder Rechtsherzinsuffizienz im Vordergrund stehen. In fortgeschrittenen Stadien sind im Rahmen einer Globalinsuffizienz zumeist beide Ventrikel betroffen. Entsprechend liegt eine Kombination aus reduzierter Organdurchblutung und venösem Rückstau vor (15). Die häufigsten Symptome sind in Tab. 2 aufgeführt.

Tab. 2: Symptome und klinische Zeichen der HI.

Beim kardialen Vorwärtsversagen kommt es zu einer Minderperfusion der Körperperipherie, während sich beim Rückwärtsversagen das Blut vor dem linken Ventrikel in den kleinen Kreislauf und das venöse System zurückstaut. Aufgeführt ist jeweils eine Auswahl möglicher Symptome und klinischer Zeichen.

	Linksherzinsuffizienz	Rechtsherzinsuffizienz
Vorwärtsversagen	<ul style="list-style-type: none"> - Leistungsknick - Tachypnoe, Dyspnoe - Sinustachykardie, Palpitationen - arterielle Hypotonie - periphere Zyanose - Organfunktionsstörungen 	
Rückwärtsversagen	<ul style="list-style-type: none"> - Dyspnoe 	<ul style="list-style-type: none"> - periphere Ödeme, Nykturie, Gewichtszunahme - Stauung von Organen (z.B. Stauungsleber, Stauungsgastritis) - obere Halsveneneinflusstauung

Es handelt sich um eine chronisch progrediente Erkrankung, die mit häufigen Hospitalisierungen aufgrund akuter kardialer Dekompensationen einhergeht. Im Rahmen des Krankenhausaufenthaltes kommt es unter der Behandlung zwar zu einer Verbesserung der kardialen Funktion, das Ausgangsniveau vor der akuten Dekompensation kann in der Regel jedoch nicht mehr erreicht werden (16) (Abb. 1).

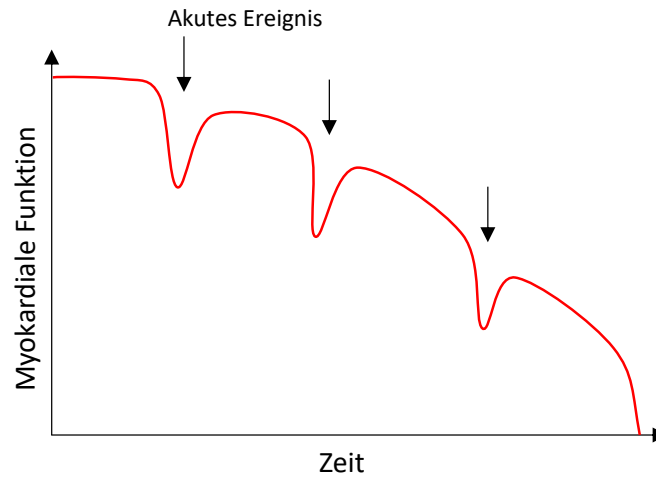


Abb. 1: Die HI als chronisch progrediente Erkrankung. Modifiziert nach Westphal 2015 (16). Obwohl sich im Rahmen jedes Klinikaufenthaltes bei kardialer Dekompensation die Herzfunktion durch die Akutbehandlung kurzfristig bessert, zeigt sich bei der Entlassung dennoch eine Abnahme der kardialen Funktion verglichen mit dem Prähospitalisierungszeitraum.

1.1.6 Pathophysiologie

Bislang existiert kein allgemeingültiges pathophysiologisches Modell der HI. Einige zu diesem komplexen Syndrom beitragende Mechanismen sind jedoch bekannt. Zu Beginn einer HI kommt es klassischerweise im Rahmen verschiedener Grunderkrankungen, beispielsweise bei ischämischer Kardiomyopathie oder durch eine Druck- oder Volumenbelastung des Herzens, zu einer initialen kardialen Schädigung mit Untergang von Kardiomyozyten (9). Im Gegensatz zu anderen Organen wie Leber oder Darm, hat das Herz eine geringe Regenerationsfähigkeit (17). Dies hat zur Folge, dass geschädigtes Gewebe durch Narbengewebe ersetzt wird. Je nach Ausmaß des initialen Gewebeuntergangs kommt es daher zu einem Abfall der kardialen Pumpleistung. Um die Perfusion lebenswichtiger Organe zu gewährleisten, müssen verschiedene Gegenregulationsmechanismen im Gesamtorganismus sowie dem verbleibenden funktionellen Herzgewebe aktiviert werden, um das Herzzeitvolumen (HZV) kompensatorisch aufrechtzuerhalten. Hierzu zählen die neuroendokrine Stimulation des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) und des sympathischen Nervensystems sowie eine Gewebeumformung des Herzens, das sog. kardiale Remodeling (15, 18, 19). Obwohl die genannten Kompensationsmechanismen im Anschluss an eine initiale myokardiale Schädigung zunächst das HZV verbessern, führen sie bei prolongierter Aktivierung zu einem Voranschreiten der Zellschädigung und einer Überlastung des Herzens. Somit tragen langfristig auch diese Mechanismen zur Manifestation und Progression der HI bei (11).

1.1.6.1 Kardiales Remodeling

Im Rahmen der HI spielt neben der Aktivierung des RAAS und des sympathischen Nervensystems das kardiale Remodeling eine zentrale Rolle. Erstmals von Tennant und Wiggers im Jahr 1935 im Zusammenhang mit den Anpassungsmechanismen nach einem akuten

MI beschrieben (20), handelt es sich um einen progredienten Prozess, welcher durch Veränderungen auf zellulärer und extrazellulärer, d.h. Matrix-Kollagen-Ebene, zu einer umfassenden Alteration der Ventrikelgeometrie und kardialen Struktur führen kann. Das ventrikuläre Remodeling kann als physiologischer Prozess im Rahmen der Adaptation an einen Zustand erhöhter hämodynamischer Anforderung an das Myokard, beispielsweise bei Leistungssport, während der Wachstumsphase oder im Anschluss an einen MI, beschrieben werden. Schreiten diese Veränderungen jedoch über einen längeren Zeitraum und in überschießender Weise voran, tritt das Remodeling auch als pathologisch-reaktiver Prozess auf, welcher langfristig zu einer Beeinträchtigung der kardialen Funktion führt und mit einer schlechten Prognose assoziiert ist (21-24). Der Übergang vom physiologisch-adaptiven zum pathologischen Remodeling verläuft dabei fließend und der Zeitpunkt der Transition ist interindividuell verschieden.

Histopathologisch können die folgenden Veränderungen beobachtet werden: Auf Kardiomyozytenebene kommt es typischerweise zu einer Desorganisation der Zytoskelettproteine (25, 26) und zellulären Hypertrophie mit gleichzeitig erhöhter Apoptoserate (27, 28). Die Hypertrophie der Zellen wird durch eine gesteigerte intrazelluläre Synthese kontraktiler Proteine verursacht (22) und führt zu einer globalen Zunahme der Herzmuskelmasse und makroskopischen Wandverdickung (29). Die Folge ist, entsprechend des Laplace-Gesetzes, eine Normalisierung der Wandspannung und dadurch bedingte Optimierung der energetischen Verhältnisse im Herzen (15, 30). In der Frühphase nach einer myokardialen Schädigung ermöglichen die beschriebenen Hypertrophieprozesse eine Aufrechterhaltung der kardialen Pumpkraft und Stabilisierung des HZV. Auch auf extrazellulärer Ebene kommt es zu Anpassungen. Die kardiale extrazelluläre Matrix (ECM) besteht überwiegend aus einem fibrillären Kollagenetzwerk, Matrixproteinen sowie Signalmolekülen und dient u.a. dem kardialen Formerhalt. Bei der HI kann ein Ungleichgewicht der ECM-Homöostase im Rahmen der kardialen Fibrose zur Störung der ventrikulären Struktur führen und letztlich zur Entwicklung einer kardialen Dysfunktion beitragen (31, 32). Zwei Formen der Fibrose können dabei unterschieden werden (33). Im Rahmen der reparativen Fibrose werden untergegangene Kardiomyozyten im Anschluss an eine myokardiale Schädigung durch Kollagenfasern ersetzt. Die akute Ablagerung der Kollagenfasern im Sinne einer Narbenbildung erfolgt dabei lokal auf das geschädigte Areal begrenzt und sorgt primär für den Erhalt der strukturellen Integrität der Ventrikelwand und der physiologischen Ventrikelform. Davon abzugrenzen ist die reaktive Fibrose, bei der es im interstitiellen und perivaskulären Raum zu einer kontinuierlichen diffusen Vermehrung von Kollagenfasern kommt. Sie entsteht infolge einer erhöhten Volumen- oder Druckbelastung des Herzens, ohne nennenswerten initialen Verlust von Kardiomyozyten. Beide Fibroseformen zeichnen sich durch einen alterierten Kollagenstoffwechsel aus, bei dem

die Neusynthese den Abbau überwiegt (34, 35). Die Fibrose beeinträchtigt durch eine erhöhte Steifigkeit des Gewebes die Relaxationsfähigkeit und Kontraktilität des Herzens. Langfristig führen die beschriebenen Prozesse daher zu einer Abnahme der kardialen Leistungsfähigkeit (2, 32, 36-40).

Die Remodeling-Prozesse werden von einer Vielzahl unterschiedlicher Regelsysteme beeinflusst. Zu den pro-fibrotischen Faktoren gehören neben Vertretern des RAAS Zytokine wie der *Transforming Growth Factor*-beta1 (TGF- β 1), das Interleukin (IL)-6 und der Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α) (41, 42). Sie beeinflussen die Funktion der kardialen Myofibroblasten, welche für den Großteil der kardialen Kollagenbiosynthese verantwortlich sind und bei der Fibroseentwicklung eine zentrale Rolle spielen.

In ihrem Zusammenspiel sind die genannten Mechanismen an der Entstehung und Progression einer HI beteiligt und bieten zugleich potentielle Angriffspunkte für pharmakologische Therapieansätze.

1.1.6.2 Die Rolle inflammatorischer Zytokine in der Pathogenese der HI

Zytokine sind regulatorische Proteine, die der interzellulären Signalübertragung dienen und als Reaktion auf unterschiedliche Stimuli von betroffenen Zellen sezerniert werden. Im Rahmen einer Gewebeschädigung werden inflammatorische Zytokine u.a. von Leukozyten, Endothelzellen und Fibroblasten sezerniert und sind an der Steuerung von Immunantwort und Entzündungsreaktionen beteiligt (43).

Es lassen sich pro- und anti-inflammatorische Zytokine unterscheiden. Vertreter der ersten Gruppe sind entzündungsfördernde Polypeptide, welche die Durchblutung des Gewebes fördern, das Einwandern von Immunzellen unterstützen und für deren Aktivierung sorgen. Anti-inflammatorische Zytokine stellen deren Gegenspieler mit primär entzündungshemmender Wirkung dar. Sie verhindern ein Überschießen von Entzündungsreaktionen (44, 45).

Die Wirkung der Zytokine wird durch ihre Bindung an entsprechende Rezeptoren auf der Oberfläche der Zielzellen vermittelt. Während Zytokine bei akuter Entzündung temporär auf einen entsprechenden Stimulus hin gebildet, sezerniert und anschließend rasch eliminiert werden, lassen sich bei chronisch entzündlichen Systemerkrankungen dauerhaft erhöhte Spiegel in den betroffenen Geweben nachweisen. In der Folge kann es zu einem unkontrollierten Entzündungsgeschehen mit lokaler Gewebeumformung bis hin zu dessen Zerstörung und Funktionsverlust kommen (46).

Inflammatorische Prozesse gehören zu den der HI zugrundeliegenden Schlüsselprozessen. Bereits im Jahr 1669 wurde der pathophysiologische Stellenwert inflammatorischer Prozesse im Myokard von Richard Lower beschrieben (47). Erst drei Jahrhunderte später, zu Beginn der

1990er Jahre, als Daten verschiedener Studien erneut auf einen Zusammenhang zwischen erhöhten Spiegeln pro-inflammatorischer Zytokine im Blut und der funktionellen Verschlechterung einer bestehenden HI hinwiesen (48, 49) wurde die sog. Zytokinhypothese formuliert. Sie besagt, dass neben einer hämodynamischen und neurohumoralen Komponente endogene Zytokine in die Entstehung und Progression der HI involviert sind (50). In der Folge konnten verschiedene inflammatorische Mediatoren (insb. die pro-inflammatorischen Zytokine TNF- α , Interferon-gamma (IFN- γ), Interleukine 1 β , -6, -17 und -18), Signalkaskaden, Entzündungszellen und Autoantikörper identifiziert werden, die bei HI-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollindividuen erhöht sind und eine pathogenetische Rolle spielen könnten (18, 45, 51-69). Für pro-inflammatorische Zytokine konnte nachgewiesen werden, dass sie kardiodepressive Remodeling-Prozesse fördern, indem sie eine kardiomyozytäre Hypertrophie und Apoptose sowie Fibrose-Prozesse induzieren (51, 70, 71). Sie werden zudem mit einer auf Störung der Kalzium-Homöostase, der Freisetzung freier Radikale und der Bildung von Stickstoffmonoxid basierenden kontraktile Dysfunktion des Myokards in Verbindung gebracht (72, 73). Zusätzlich scheinen sie zu einer endothelialen Dysfunktion der Gefäße beizutragen (74). Aufgrund der Tatsache, dass pro-inflammatorische Zytokine ursprünglich in Patienten mit kardialer Kachexie identifiziert wurden, bestand anfangs die Vermutung, die Moleküle spielten ausschließlich in fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung eine Rolle. Diese Annahme konnte widerlegt werden. Die Daten zeigen, dass die Botenstoffe bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt der Erkrankung (NYHA Klasse I) aktiviert sind (48, 68).

Groß angelegte klinische Studien, deren therapeutischer Ansatz in einer gezielten Inhibition pro-inflammatorischer Zytokine bestand, führten überwiegend nicht zu den erhofften Ergebnissen, sondern legten nahe, dass pro-inflammatorische Zytokine auch kardioprotektive Effekte haben können (45, 51, 58, 75-81). Es wird vermutet, dass die Art der Zytokineffekte von Faktoren wie Konzentration, Zeitpunkt und Dauer ihrer Ausschüttung sowie dem aktivierten Rezeptortyp beeinflusst wird (56, 57, 82, 83). Bei dauerhaft erhöhter Aktivität scheinen sie die HI voranzutreiben.

1.1.7 Diagnostik

Zur Basisdiagnostik der HI zählen laborchemische Analysen sowie der Einsatz bildgebender Verfahren.

1.1.7.1 Biomarker für die HI

Das Interesse an kostengünstigen Biomarkern zur Verbesserung von Diagnosestellung, Prognoseabschätzung und Therapie der HI ist in den letzten Jahren gestiegen. Insbesondere die Bestimmung der natriuretischen Peptide B-Typ natriuretisches Peptid (BNP) und aminoterminalen pro-*brain* natriuretisches Peptid (NT-proBNP) im Blutplasma spielt dabei eine

zentrale Rolle (1). NT-proBNP wird im klinischen Alltag aufgrund seines hohen negativ prädiktiven Wertes zur initialen Diagnostik und darüber hinaus als laborchemischer Verlaufsparemeter der HI genutzt. Eine Erhöhung zeigt zuverlässig eine akute kardiale Dekompensation an; dabei korreliert die Höhe des Proteins invers mit der linksventrikulären Pumpfunktion (84). Erhöhte Spiegel sind daher mit einer schlechteren Prognose und gesteigerten Mortalität assoziiert (84). Während seiner Sekretion durch die Kardiomyozyten in die Blutbahn wird das biologisch inaktive NT-proBNP in äquimolarer Menge vom BNP abgespalten und steht als molekularer Marker zur Verfügung (85).

Weiterhin sind Indikatoren für das kardiale Remodeling von Interesse. Dazu zählen z.B. Galektin-3 (Gal-3) als zuverlässiger kardialer Fibrosemarker sowie ECM-assoziierte Proteine wie die Matrix-Metalloproteasen (MMP)).

Ein weiteres Lektin, Galektin-1 (Gal-1), wird mit der Modulation inflammatorischer Prozesse sowie der Angiogenese und Wundheilung in Verbindung gebracht (86). Verschiedene Studien weisen dabei auf eine kardioprotektive Rolle hin (87).

Darüber hinaus gilt der Marker Endothelin-1 (ET-1) als unabhängiger Mortalitätsprädiktor bei der HI. Er wird im Rahmen der Erkrankung mit vaskulärer Dysfunktion, myokardialer Ischämie und Fibroseprozessen in Verbindung gebracht (88).

1.1.7.2 Kardiiale Bildgebungsverfahren

Bildgebenden Verfahren, mittels derer morphologische und funktionelle Auffälligkeiten nachgewiesen werden können, kommt eine zentrale Rolle sowohl bei der initialen Diagnostik als auch bei der Verlaufskontrolle der HI zu.

Obwohl die Echokardiographie als das Standardverfahren für die kardiiale Bildgebung in der klinischen Routine gilt, bestehen einige spezifische Limitationen. Eine suffiziente Bildqualität kann nur bei adäquaten Schallbedingungen gewährleistet werden, sodass bei Komorbiditäten wie Adipositas und chronisch obstruktiver Lungenerkrankung sowie Thoraces mit reduziertem interkostalen Abstand mit einer deutlichen Einschränkung der Darstellbarkeit zu rechnen ist. Ferner sind die mittels Echokardiographie erhobenen Messwerte stark untersucherabhängig und nur eingeschränkt reproduzierbar.

Vor diesem Hintergrund bietet die kardiiale Magnetresonanztomographie (MRT) einige Vorteile. Sie gehört zu den nicht invasiven Bildgebungsverfahren ohne Strahlenbelastung und erlaubt die Begutachtung eines Organs im intakten Organismus. Es handelt sich um ein dreidimensionales tomographisches Verfahren, welches eine räumlich und zeitlich hochauflösende Darstellung des Herzens in beliebigen Ebenen erlaubt. Dies ist essentiell, um zuverlässig geringe Änderungen der kardialen Morphologie und Funktion selbst in kleinen Versuchsgruppen feststellen und qualitativ hochwertige Informationen über Morphologie,

Funktion, Perfusionsstatus und Viabilität des Herzens gewinnen zu können. Bei der Bestimmung von Volumina, Massen und ventrikulären Ejektionsfraktionen ist die MRT anderen bildgebenden Verfahren überlegen und gilt daher als Goldstandard (89, 90). Die erhobenen Parameter basieren im Vergleich zu anderen Bildgebungstechniken nicht auf geometrischen Annahmen, da das Myokard in seiner vollen Länge, von Basis bis Apex, in multiplen zweidimensionalen Schnittbildern dargestellt wird. Des Weiteren ermöglicht ein hoher Gewebekontrast die akkurate Bestimmung der Endokard-Blut-Grenze, was eine gute Reproduzierbarkeit und Untersucherunabhängigkeit der Befunde erlaubt sowie serielle Messungen reliabel ermöglicht (91). Zu den Nachteilen der MRT gehören die relativ langen Untersuchungszeiten im beengten Raum, die für Patienten mit Klaustrophobie ein Problem darstellen können. Implantierte Herzschrittmacher oder Defibrillatoren gehören zu den Kontraindikationen für eine MRT-Untersuchung. Weitere Limitationen dieses Bildgebungsverfahrens sind eine eingeschränkte Verfügbarkeit und ein höherer Kostenfaktor.

1.1.7.3 Die kardiale MRT beim Tier

Die ersten MRT-Untersuchungen an Mäusen wurden Ende der 1990er Jahre durchgeführt. Obwohl das kardiovaskuläre System von Nagetieren mit dem des Menschen prinzipiell vergleichbar ist, existieren Unterschiede hinsichtlich Lage, Größe und Konfiguration des Myokards. Ein durchschnittlich 300 mg schweres murines Herz schlägt mit einer Frequenz von 400-600 Schlägen pro Minute. Der Herzzyklus ist somit zehnmal kürzer als beim Menschen. Die Darstellung des murinen Herzens erfordert daher eine hohe räumliche und zeitliche Auflösung, die von speziellen Kleintierscannern mit Magnetfeldstärken im Hochfeldbereich (>3 Tesla) realisiert werden können. Die MRT wird daher als verlässliche Methode zur Bestimmung der kardialen Funktion bei Nagetieren anerkannt (90-93) und könnte sich als Referenzstandard zur Phänotypisierung der Herzen durchsetzen.

1.1.8 Therapie

Ziel der Therapie der HI ist zum einen die Symptomkontrolle und zum anderen die Verhinderung des Fortschreitens der Erkrankung. Neben der Verbesserung der Lebensqualität sollen damit die Hospitalisierungsrate und die Mortalität gesenkt werden.

In den vergangenen Jahrzehnten wurde der Schwerpunkt der medikamentösen HI-Therapie auf eine Blockade der neurohumoralen Effekte des RAAS und des sympathischen Nervensystems gelegt. Durch den in den aktuellen Leitlinien empfohlenen Einsatz von Angiotensin-*converting-enzyme* (ACE)-Hemmern, Aldosteronrezeptorantagonisten, Beta-Blockern, Angiotensin-Rezeptor-Nepriylisin-Inhibitor (ARNI) und *Sodium dependent glucose co-Transporter 2* (SGLT2)-Inhibitoren sowie die Anwendung elektrophysiologischer Verfahren konnte bereits

eine deutliche Verbesserung des Überlebens und eine Reduktion der Hospitalisierungsrate erzielt werden (1).

Bei Versagen aller therapeutischen Bemühungen steht für geeignete Patienten mit terminaler HI nur die Herztransplantation zur Verfügung. Die Herztransplantation stellt aktuell den einzig etablierten Ansatz dar, um den der HI zugrundeliegenden Verlust an Kardiomyozyten zu behandeln. Bedingt durch einen zunehmenden Mangel an Spenderorganen nimmt die Zahl der Herztransplantationen jedoch jährlich ab (15). Für Patienten mit HFpEF existiert, mit Ausnahme von körperlicher Bewegung, keine evidenzbasierte, die Prognose verbessernde Therapie (94). Es muss daher nach geeigneten alternativen Therapieverfahren gesucht werden. In den vergangenen Jahren ist das Verständnis für die der HI zugrundeliegenden pathophysiologischen Mechanismen gewachsen, was neben den etablierten therapeutischen Maßnahmen potentiell neue Zielstrukturen für innovative Therapieansätze hervorgebracht hat. Die Tatsache, dass der HFpEF und der HFrEF unterschiedliche Signalwege und Kontrollmechanismen zugrunde liegen, könnte ein Grund dafür sein, warum die bei HFrEF-Patienten prognostisch wirksamen Therapieformen nicht denselben Effekt auf den Verlauf der HFpEF haben (95). Für beide Formen der HI konnte jedoch eine Korrelation zwischen Inflammation und schlechtem kardiovaskulären *Outcome* dokumentiert werden (48, 96), sodass anti-inflammatorische Therapieansätze sinnvoll erscheinen.

1.1.8.1 Anti-inflammatorische Therapie der HI

Basierend auf dem Erkenntnisgewinn vergangener Studien wurden unterschiedliche anti-inflammatorische Therapiestrategien sowohl zur nichtselektiven als auch zur gezielten Blockade bestimmter Zytokine entwickelt. Ziel ist es, den schädlichen Effekten eines kontinuierlich aktiven Entzündungsgeschehens entgegenzuwirken.

Ein zu den nichtselektiven immunmodulatorischen Therapien zählendes Verfahren ist die intravenöse Gabe von Immunglobulinen (IVIG). Immunglobuline (Ig) sind Teil einer physiologischen anti-inflammatorischen und vor Gewebeschädigung schützenden Antwort des Organismus (45). Die Mechanismen, durch die sie das Immunsystem modulieren, sind jedoch noch nicht gänzlich verstanden. Bei HI-Patienten bewirkten IVIG einen neutralisierenden Effekt auf zirkulierende Autoantikörper und Bestandteile des Komplementsystems sowie eine Erhöhung anti-inflammatorischer Zytokinspiegel, was eine Besserung der LVEF und eine Symptomreduktion zur Folge hatte (45, 97-99). Neben IVIG zählen auch die Immunmodulationstherapie, die Immunadsorption und der therapeutische Plasmaersatz zu den nichtselektiven anti-inflammatorischen Verfahren (45). Aktuell richtet sich der Fokus zunehmend auch auf eine gezielte Blockade von Zytokinen, deren Rezeptoren oder Mediatoren.

1.2 Rolle von IL-6 bei der HI

IL-6 ist ein aus 184 Aminosäuren bestehendes, pro-inflammatorisches Zytokin mit einem Molekulargewicht von 26 kDa (100). Es ist Mitglied der IL-6-Typ Zytokinfamilie, zu der ebenfalls der Leukämiehemmende Faktor (LIF) und Cardiotrophin-1 (CT-1) sowie einige weitere Mediatoren gehören (101, 102). Ihre Wirkungen entfalten sie über dieselben Signalwege (Janus-Kinase (JAK)/*Signal Transducers and Activators of Transcription 3* (STAT3)-, Ras-Raf-*Mitogen-Activated Protein Kinase* (MAPK)- und Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)-Protein Kinase B(Akt)-Signalwege) (101, 103). IL-6 kann von den meisten Zellarten als Antwort auf verschiedene Stimuli wie Infektionen, Entzündungsgeschehen oder die Ausschüttung anderer inflammatorischer Zytokine, insbesondere IL-1 und TNF- α , aber auch IFN γ und IL-17A (104, 105), sezerniert werden. Während im Rahmen akuter Entzündungsgeschehen vorrangig Monozyten und Makrophagen das Zytokin freisetzen, scheinen bei Zuständen chronischer Inflammation T-Zellen die Hauptquelle zu sein (106).

Als pleiotropes Zytokin hat IL-6 viele unterschiedliche Funktionen. Ursprünglich als wichtiger Stimulator der Differenzierung von B-Zellen in antikörperproduzierende Plasmazellen identifiziert, aktiviert und reguliert es Immun- und Entzündungsreaktionen (107). Es stimuliert die hepato gene Produktion Akuter-Phase-Proteine, die Proliferation hämatopoetischer Progenitorzellen und die Migration inflammatorischer Zellen in das Gewebe. Zudem ist IL-6 in Wundheilungsprozesse involviert (108-111).

Trotz dieser wichtigen physiologischen Funktionen im Gesamtorganismus, ist eine exzessive Produktion von IL-6 an der Pathogenese unterschiedlicher chronisch-inflammatorischer und Autoimmunerkrankungen des Menschen beteiligt (112). Auch im Rahmen von HI-Studien konnten erhöhte IL-6-Plasmaspiegel nachgewiesen werden. Die Höhe der IL-6-Spiegel korreliert dabei mit dem Schweregrad der linksventrikulären Dysfunktion der Patienten (48, 66-69, 113-116). Die Beurteilung des IL-6-Plasmalevels kann somit zur Einschätzung des Ausprägungsgrades einer HI herangezogen werden. Darüber hinaus gilt das Zytokin als ein von traditionellen Risikofaktoren unabhängiger prädiktiver Marker für die kardiovaskuläre- und Gesamtmortalität von HI-Patienten (48, 69, 102, 117-124). Hintergrund dafür dürfte die Beteiligung von IL-6 an einer abnormen Kollagenablagerung und dysregulierten Hypertrophieprozessen sowie eine negative Beeinflussung der kardiomyozytären Kalziumhomöostase und die Reduktion kontraktiler Proteine sein, die die Myokardkontraktilität reduzieren und zu einer Verschlechterung der kardialen Pumpfunktion beitragen (125-129).

Daneben sind jedoch auch zahlreiche protektive Effekte von IL-6 auf das Myokard beschrieben. Im Rahmen der Akutantwort nach einer myokardialen Schädigung scheint IL-6 kompensatorische Hypertrophieprozesse zu stimulieren, anti-apoptotische Signale zu

induzieren und körpereigene Prozesse zu initiieren, die eine vermehrte Ischämietoleranz des Organismus zur Folge haben (sog. ischämische Prä- und Postkonditionierung) (130-136).

Entscheidend für die protektive oder schädliche Wirkung von IL-6 könnten die Plasmakonzentration, der Zeitpunkt und die Dauer der Zytinausschüttung sowie die Art der aktivierten Rezeptoren sein. Während eine kurzfristig erhöhte IL-6-Aktivität positive Effekte auf die Herzfunktion zu haben scheint, könnten langfristig erhöhte Zytokinspiegel im Rahmen der HI zu einer vermehrten Fibrose, maladaptiven Hypertrophie und reduzierten kardiomyozytären Kontraktilität beitragen (107).

1.2.1 IL-6 Rezeptor und assoziierte Signaltransduktionswege

Die Effekte von IL-6 werden durch den IL-6 Rezeptor (IL-6R), einen Typ I Zytokinrezeptor, vermittelt (137). Dieser besteht aus einem α -Teil mit zwei IL-6-Bindungsstellen-tragenden Untereinheiten und einem aus zwei transmembranären Glykoprotein (gp)130-Molekülen bestehenden β -Teil, der an der Signaltransduktion beteiligt ist. Der α -Teil des Rezeptors existiert in einer in Körperflüssigkeiten wie Blut nachweisbaren löslichen und einer auf Zelloberflächen vorkommenden membrangebundenen Form (138, 139). Binden zwei IL-6-Moleküle an den α -Teil des IL-6R, dimerisieren die membranständigen gp130-Moleküle (sog. Homodimerisierung) und es resultiert der hexamere IL-6R-Komplex. Die gp130-Moleküle leiten die Signale an das Zellinnere weiter. Es kommt zur Aktivierung der JAK/STAT3-, Ras-Raf-MAPK- und PI3K/Akt-Signalwege (101, 110, 140-145) und anschließenden Translokation von Transkriptionsfaktoren in den Zellkern. Die Transkriptionsfaktoren steuern die Expression bestimmter Zielgene und vermitteln dadurch die Effekte des Zytokins.

Während die membrangebundenen Form des α -Teils des Rezeptors nur auf der Oberfläche einiger Zellarten, insbesondere Leukozyten und Hepatozyten, vorkommt und somit vornehmlich diese Zellen über den klassischen Signalweg einer Aktivierung durch IL-6 zugänglich sind, werden gp130-Moleküle ubiquitär von fast allen Zellarten exprimiert (146, 147). Mit Hilfe dieses sog. Transsignalweges können somit die meisten Zelltypen durch IL-6 aktiviert werden: Das Zytokin bindet an die lösliche Form des IL-6R α und der daraus resultierende Komplex interagiert mit membrangebundenen gp130-Molekülen (Abb. 2) (148). Die Bindung von IL-6 erfolgt dabei mit derselben Affinität wie bei der membrangebundene Rezeptorform (148, 149). Da Kardiomyozyten nur wenige IL-6R α auf Ihrer Oberfläche exprimierten (150), wirkt IL-6 überwiegend über den Transsignalweg. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die IL-6R α -Expression unter bestimmten Bedingungen ansteigt (151).

Die IL-6R-assozierten Signalwege können durch endogene Proteine, z.B. das Suppressorprotein für Zytokinsignale 3 (SOCS3), das ein Zielgen des Transkriptionsfaktors STAT3 darstellt, reguliert werden. Im Sinne eines negativen *Feedback*-Mechanismus bindet

SOCS3 an den Tyrosinrest 759 von gp130 und verhindert dadurch eine weitere Aktivierung des IL-6-JAK/STAT3 Signalweges (107, 145, 150, 152-157). Einen weiteren physiologischen Regulationsmechanismus stellt die lösliche Form von gp130, das (*soluble* (s)gp130-Molekül, dar. Es bindet und neutralisiert selektiv den IL-6-sIL-6R-Komplex, sodass es zu einer gezielten Hemmung des Transsignalweges kommt (158). Auf freies IL-6 hat es dagegen keine Wirkung, sodass der klassische IL-6-Signalweg nicht beeinflusst wird.

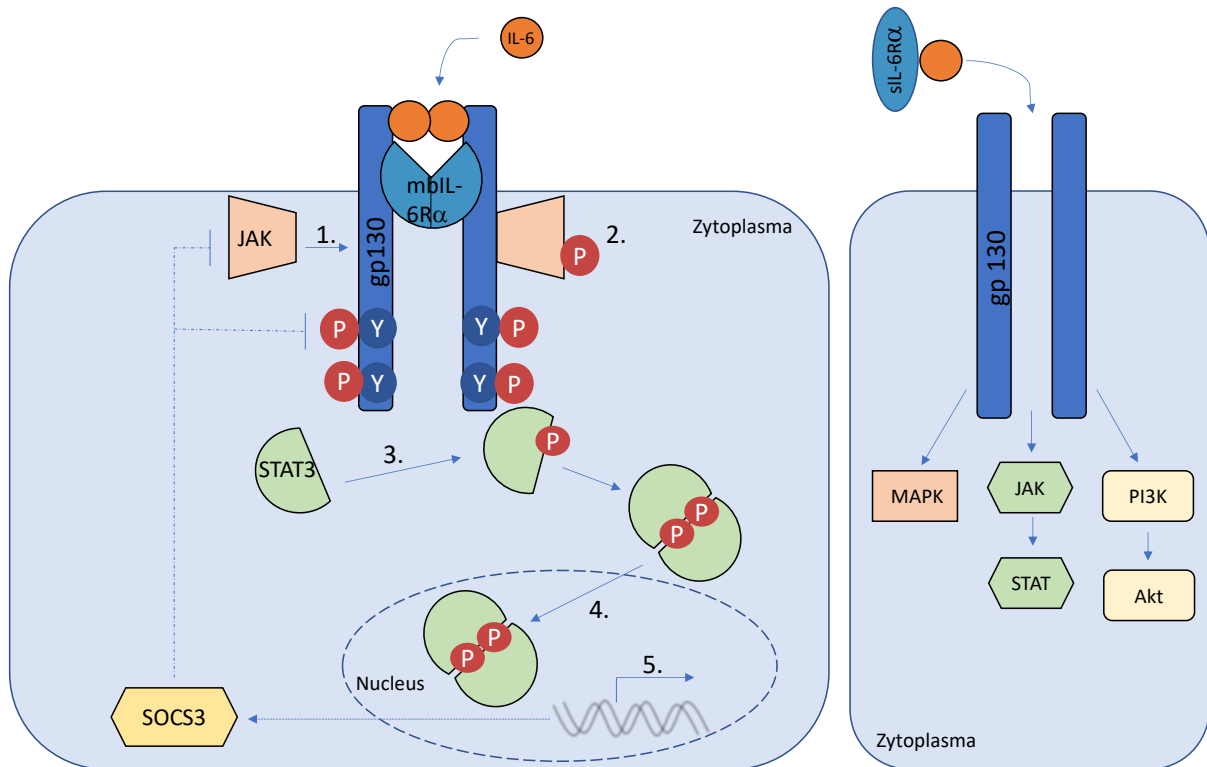


Abb. 2: Schematische Darstellung der IL-6 Rezeptor-assoziierten Signaltransduktion am Beispiel des JAK-STAT3-Signalweges. Modifiziert nach Camporeale et al. 2012 (110). Klassischer" IL-6-Signalweg: Nach Bindung von IL-6 an die membranständige α -Untereinheit des IL-6 Rezeptors (mbIL-6R α) homodimerisieren zwei gp130-Moleküle. Es entsteht der hexamere IL-6R-Komplex.

Transsignalweg: IL-6 bindet an die lösliche α -Untereinheit des IL-6 Rezeptors (sIL-6R α). Der entstandene IL-6-sIL-6R-Komplex bindet an membrangebundene gp130-Moleküle, die ebenfalls Homodimere formen. Nachfolgend kommt es bei beiden Varianten zur Aktivierung der JAK/STAT3-, MAPK- und PI3K/Akt-Signalwege. JAK/STAT3-Signalweg: 1.: Janus-Kinasen (JAK) binden an die gp130-Moleküle; 2.: Aktivierung der JAK durch Autophosphorylierung mit JAK-vermittelter Phosphorylierung (P) der Tyrosinreste (Y) der gp130-Moleküle; 3.: Binden des Transkriptionsfaktors STAT3 an die phosphorylierten Bindestellen der gp130-Moleküle mit aktivierender Phosphorylierung und Bildung von STAT3-Homodimeren; 4.: Translokation der Homodimere in den Zellkern; 5.: Regulierung der Transkription verschiedener Zielgene: *Suppressors of Cytokine signaling* (SOCS) 3 interagiert mit dem Phosphotyrosinrest-759 der gp130-Moleküle und inhibiert die JAK-Aktivierung (negative Feedback-Schleife).

1.2.2 Therapie mittels IL-6 Inhibition

Die zentrale Rolle von IL-6 im Rahmen von Immun- und Entzündungsreaktionen macht es zu einem attraktiven Ziel für therapeutische Ansätze.

Tocilizumab ist ein humanisierter, antihumaner monoklonaler Antikörper vom Subtyp IgG1-kappa (Abb. 3).

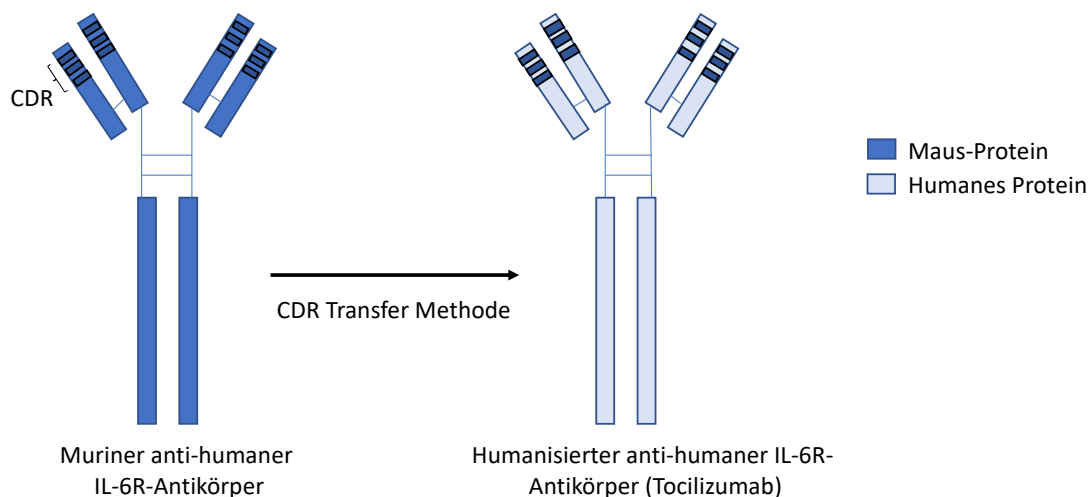


Abb. 3: Struktur des humanisierten antihumanen IL-6-Rezeptor Antikörpers Tocilizumab. Modifiziert nach Nishimoto et al. 2008 (159). Humanisierte Antikörper (Endung "-zumab") zeichnen sich dadurch aus, dass nur die spezifische Antigenbindungsstelle (CDR) muriner Herkunft ist, während der übrige Teil des Antikörpers aus humanen Proteinen besteht. Durch die hierdurch erzielte verminderte Immunogenität wird eine reaktive Bildung neutralisierender Antikörper weitestgehend umgangen und die Halbwertszeit des Antikörpers verlängert. Die sog. CDR-Transfer-Methode stammt von Sato et al. 1993 (160).

Er hemmt sowohl die lösliche als auch die membrangebundene Form der α -Untereinheit des IL-6R (160, 161). Als kompetitiver Antikörper blockiert Tocilizumab selektiv die IL-6-Bindungsstellen und verhindert dadurch die Bindung des eigentlichen Liganden an seinen Rezeptor (Abb. 4). Durch die Rezeptorinhibition wird eine Aktivierung der IL-6-Signalwege verhindert und die chronische Entzündungsreaktion unterbrochen.

Tocilizumab wurde für die Therapie von Erkrankungen aus dem rheumatoiden Formenkreis entwickelt. Seit 2009 ist der Antikörper für die Therapie der rheumatoiden Arthritis in Europa zugelassen (162). Da IL-6 eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung und Progression der HI spielt, erscheint eine Untersuchung der Effekte des IL-6 Antikörpers auf die Entwicklung und Progression der HI sinnvoll und aussichtsreich.

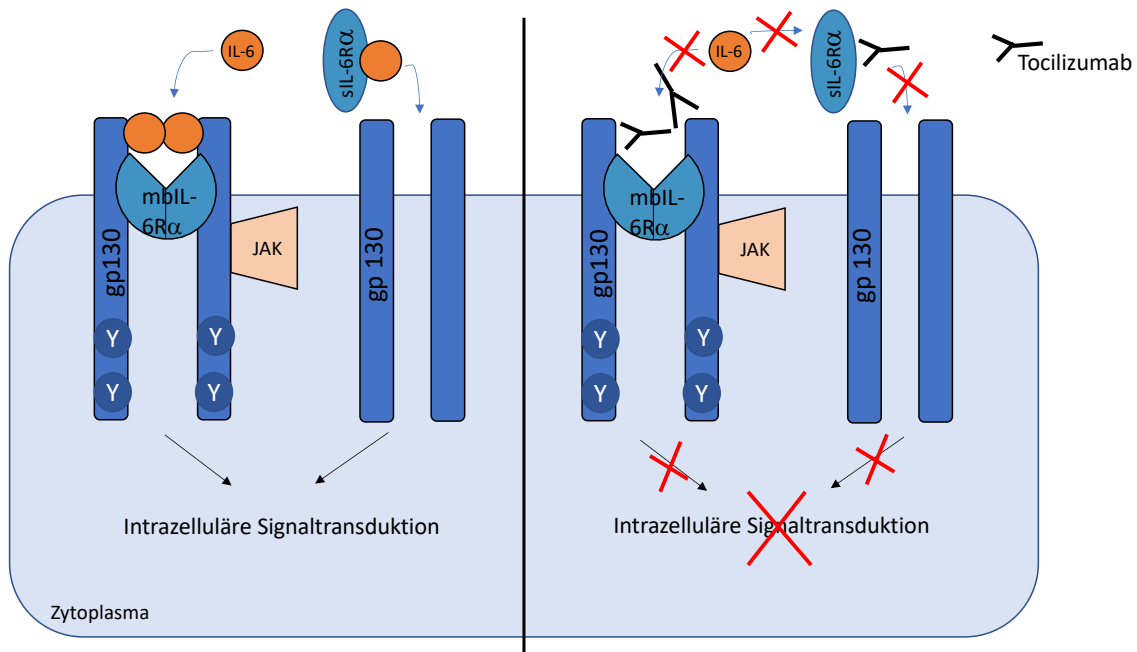


Abb. 4: Wirkungsweise des anti-IL-6R Antikörpers Tocilizumab. Modifiziert nach Nishimoto 2008 (159). Tocilizumab bindet kompetitiv an die IL-6-Bindungsstellen des membrangebundenen und löslichen IL-6-Rezeptors und verhindert dadurch die Aktivierung der IL-6-Signaltransduktionswege. Links: Reguläres Binden von IL-6 am Receptor; rechts: Tocilizumab-vermittelte IL-6 Rezeptorblockade.

1.2.3 IL-17A und seine Interaktion mit IL-6

IL-17A ist ein pro-inflammatorisches Zytokin, das vorrangig von einer Subpopulation aktivierter CD4-positiver T-Zellen, den Typ17-T-Helferzellen (Th17-Zellen), sezerniert wird. Seine Wirkung entfaltet das Mitglied der IL-17-Zytokinfamilie über die spezifische Bindung an den IL-17-Rezeptorkomplex (163, 164). IL-17A spielt eine Rolle bei der Immunabwehr, Initiierung und Regulierung von Entzündungsgeschehen sowie Prozessen der Gewebeschädigung. Es stimuliert die Rekrutierung von Immunzellen an den Entzündungsort und fördert STAT3-abhängig die Expression und Sekretion weiterer pro-inflammatorischer Zytokine, insbesondere von IL-1 β , -6 und -8 sowie des Granulozyten-Kolonie-stimulierenden Faktors (105, 163, 165-174).

IL-17A und IL-6 sind Teil einer positiven pro-inflammatorischen *Feedback*-Schleife (Abb. 5): IL-6 stimuliert gemeinsam mit TGF- β die STAT3-abhängige Differenzierung von naiven CD4-positiven T-Lymphozyten in Th17-Zellen, welche über eine vermehrte Produktion von IL-17A (175) STAT3- und *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells* (NF- κ B)-abhängig zu einer Erhöhung der IL-6-Konzentration beitragen (105, 110, 176-178). Des Weiteren stimulieren beide Zytokine die Sekretion pro-inflammatorischer Chemokine. Letztere vermitteln die Migration immunkompetenter Zellen, die das pro-inflammatorische IL-23 sezernieren. IL-23 ist essentiell für das Überleben und die weitere Expansion der Th17-Zellen (110, 179, 180).

Erhöhte IL-17A-Spiegel sind assoziiert mit zahlreichen chronisch-inflammatorischen und Autoimmunerkrankungen und wurden u.a. bei der rheumatoiden Arthritis, Psoriasis und Transplantatabstoßungsreaktionen nachgewiesen (181, 182). Zusätzlich wird eine Beteiligung an der Entwicklung und Progression kardiovaskulärer Erkrankungen vermutet (178, 183, 184). Im Rahmen der HI sind erhöhte IL-17-Plasmaspiegel mit fortgeschrittenen NYHA-Stadien und erhöhten NT-proBNP-Spiegeln assoziiert (185, 186). Die Ursachen hierfür könnten in einer IL-17-vermittelt erhöhten kardiomyozytären Apoptoserate und einem maladaptiven kardialen Remodeling liegen (187, 188).

Der Versuch eines therapeutischen Einsatzes von neutralisierenden anti-IL-17A-Antikörpern bei der HI ist naheliegend und verfolgt das Ziel, einerseits die direkten negativen Effekte von IL-17A auf die Herzfunktion abzuschwächen und andererseits indirekt auch die Aktivität von IL-6 zu reduzieren.

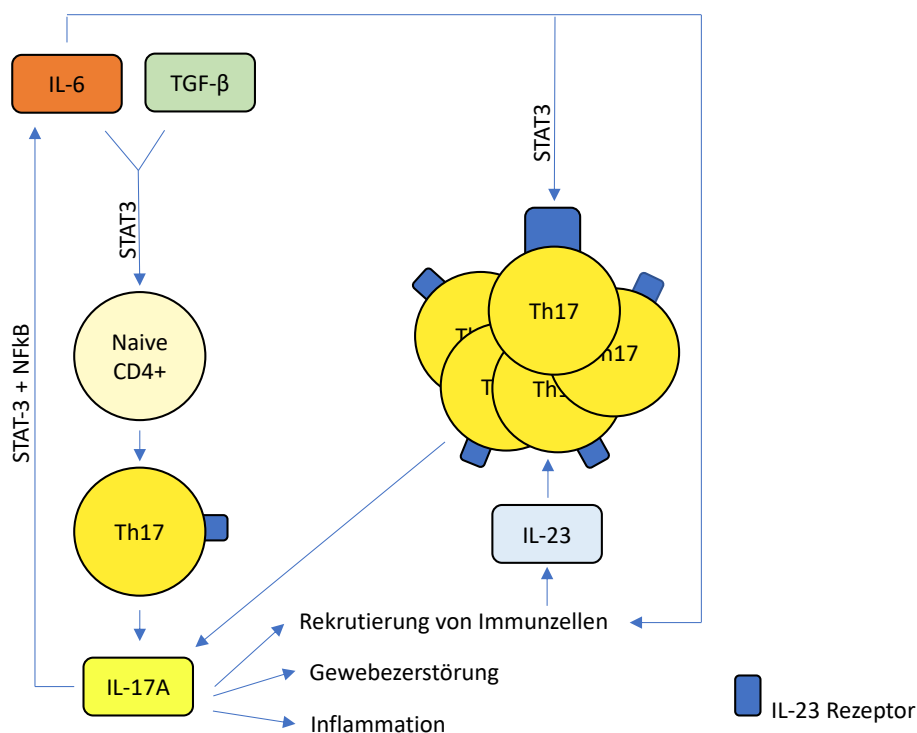


Abb. 5: Schematische Darstellung der IL-6/IL-17A/STAT3-Feedback-Schleife. Modifiziert nach Camporeale et al. 2012 (110). IL-6 stimuliert gemeinsam mit TGF-β die STAT3-abhängige Differenzierung von naiven CD4-positiven T-Zellen (CD4+) in Typ17 T-Helferzellen (Th17), welche IL-17A sezernieren. IL-17A vermittelt die Rekrutierung von weiteren Immunzellen, spielt eine Rolle in der Gewebeerstörung und initiiert Entzündungsprozesse. Zudem stimuliert IL-17A STAT3- und *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells* (NF-κB)-abhängig die vermehrte Expression von IL-6. Unterstützt wird der Prozess durch das pro-inflammatorische Zytokin IL-23, das von den rekrutierten Immunzellen sezerniert wird und eine weitere Expansion der Th17-Zellpopulation fördert. IL-6 stimuliert STAT3-abhängig eine vermehrte Expression von IL-23 Rezeptoren auf den Th17-Zellen (175, 189).

1.3 Transgenes Tiermodell für HI

Bei dem in diesem Projekt verwendeten Tiermodell handelt es sich um eine Kreuzung von *alpha-myosin-heavy chain* (α -MHC)-Cyclin T1 und α -MHC-G-Protein α q ($G\alpha q$) transgenen *friend leukemia virus B* (FVB) Mäusen. Durch Verwendung des α -MHC-Promotors beschränken sich die genetischen Modifikationen auf die Kardiomyozyten.

Die forcierte Expression des Proteins Cyclin T1 führt zu einer Aktivierung der Cyclin-abhängigen Kinase 9 (Cdk 9), welche kardiomyozytäre Hypertrophieprozesse stimuliert. Cdk 9 hemmt darüber hinaus die Transkription verschiedener, für die mitochondriale Funktion essentieller Gene. Zugrunde zu liegen scheint dabei eine Cyclin T1-vermittelte Suppression des *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1*. Diese Veränderungen resultieren in dysfunktionellen Mitochondrien, einer erhöhten kardiomyozytären Apoptoserate und einer allgemeinen Prädisposition für eine HI (190). Zudem weisen diese Tiere eine 4-fach gesteigerte Expression des $G\alpha q$ -Proteins auf, wodurch eine Aktivierung der Proteinkinase C induziert wird, die ebenfalls mit einer Stimulation myokardialer Hypertrophieprozesse in Verbindung gebracht wird. Diese Form der Hypertrophie geht darüber hinaus mit einer ausgeprägten Abnahme der systolischen Funktion einher (191). Durch das Zusammenwirken der beiden Gene, Cyclin T1 und $G\alpha q$, kommt es bei den doppelt transgenen Tieren zu einer frühzeitigen Manifestation der HI im Alter von vier bis sechs Wochen (190).

Die bei diesem Tiermodell auftretende HI ist in vielen Aspekten mit der des Menschen vergleichbar: CyclinT1/ $G\alpha q$ -Mäuse präsentieren einen Phänotyp mit erhöhter kardiomyozytärer Apoptoserate sowie schweren fibrotischen, hypertrophen und dilatativen Veränderungen des Herzens (190, 192). Zudem konnte auch bei Patienten mit einer HI eine erhöhte Cdk9-Aktivität (2,3-fach) nachgewiesen werden (190).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Unabhängig von ihrer Ätiologie ist die HI mit einer hohen Morbidität und Mortalität verbunden. Sie zählt zu den häufigsten Todesursachen in Deutschland, mit weiterhin steigender Inzidenz. Trotz bereits erzielter Fortschritte in Diagnostik und Therapie, ist die Erforschung alternativer oder komplementärer Behandlungsmethoden von großer Relevanz. Der Einsatz von Biologika hat in den letzten Jahrzehnten stark zugenommen und ermöglicht einen regulierenden Eingriff in das Zytokinmilieu des Organismus. Als einer ihrer Vertreter wurde der anti-IL-6R Antikörper Tocilizumab im Jahr 2009 in Deutschland zur Therapie der rheumatoiden Arthritis zugelassen. Da IL-6 auch bei der HI eine zentrale Rolle spielt, sollte in der vorliegenden Arbeit die Auswirkung einer IL-6 Inhibition auf die kardiale Funktion transgener herzinsuffizienter Mäuse evaluiert werden.

Um die Fragestellung differenziert beantworten zu können, wurden zwei Versuchsansätze gewählt: In einem sollten die Effekte einer Tocilizumab-vermittelten direkten Inhibition des IL-6R auf die HI untersucht werden. Ziel des zweiten Ansatzes war es, die Auswirkungen einer Abschwächung der IL-6-Wirkung mittels neutralisierender Anti-IL-17A Antikörper (indirekte IL-6 Inhibition) zu analysieren. Als Tiermodell diente dabei ein transgenes murines Herzinsuffizienzmodell (α -MHC-Cyclin T1/ α -MHC $G\alpha q$). Die verwendeten Substanzen (Tocilizumab, neutralisierende anti-IL-17A Antikörper, Kontroll-IgG und NaCl) wurden entsprechend der Gruppenzugehörigkeit intraperitoneal injiziert. Die Quantifizierung von Parametern der kardialen Funktion erfolgte mittels MRT. Mithilfe eines 7,1 Tesla Kleintier-MRT wurden Daten hinsichtlich Volumen, Masse und Morphologie der Herzen gewonnen. Dafür wurden Versuchstiere in der 6. und 7. Lebenswoche untersucht. Jedes Tier diente dabei, unter Umsetzung des 3-R-Prinzips (*Reduce, Refine, Replace*), als seine eigene Kontrolle. Eine abschließende Herz- und Blutprobenentnahme ermöglichte die Durchführung laborchemischer Analysen. Im Fokus standen hierbei die Effekte der Interventionen auf etablierte und neue Marker der HI, das kardiale Remodeling und den inflammatorischen Zytokinstatus. Ziel war es, den Einfluss der unterschiedlichen Substanzen auf die Herzfunktion und den Krankheitsverlauf zu evaluieren.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 MRT und Zubehör

2x2 Kanal Rattenkopf RF-Spule (ClinScan 300)	Bruker, Ettlingen
Atemkissen mit Drucksensor (Graseby®)	Smiths Medical, Watford, GB
Atem-Transmitter Modul	SA Instruments, Stony Brook, New York, USA
Digitalwaage (Maul alpha 500)	Jakob Maul, Bad König
EKG-/Temperatur-Transmitter Modul	SA Instruments, Stony Brook, New York, USA
Infrarotlichtlampe (808)	Efbe-Scholl, Bad-Blankenburg
Isofluran-Vaporisator Draeger Vapor® (19.3)	Draegerwerk AG, Lübeck
Messschlitten (Bio R. Bed 72 Slider)	Bruker, Ettlingen
MRT-System (ClinScan 70/30 USR), 7 Tesla	Bruker, Ettlingen
Sauerstoffmischanlage (Carbamed)	Draeger, Lübeck
Temperatursonde	SA Instruments, Stony Brook, New York, USA
Wärmekissen	SA Instruments, Stony Brook, New York, USA
Wasserbad	Bruker, Ettlingen

2.1.2 Verbrauchsmaterialien, Substanzen, Chemikalien und Puffer

Acrylamide/ <i>bis</i> -Acrylamide (37,5:1)	Roth, Karlsruhe
Aqua dest.	B. Braun, Melsungen AG, Melsungen
Bepanthen® Nasen- und Augensalbe	Bayer, Leverkusen
CRP ELISA Kit Maus (ab222511)	abcam®, Cambridge, GB
DAPI	Cell Signaling, Danvers, USA
dNTPs	
<i>Dual color Precision Plus</i> Proteinmarker	BioRad Laboratories, Cressier, Schweiz
Einmalspritzen Discardit™ II (2ml)	BD, Franklin Lakes, USA
Ethylendiaminotetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, Dreisenhofen
Galektin-1 ELISA Kit Maus (ab119595)	abcam®, Cambridge, GB
Galektin-3 ELISA Kit Maus (ab203369)	abcam®, Cambridge, GB

Hämatoxylin-Eosin	Merck, Darmstadt; Waldeck GmbH, Münster
IL-6 ELISA Kit Maus (ab222503)	abcam®, Cambridge, GB
IL-17 ELISA Kit Maus (LS-F24837)	LSBio, Seattle, USA
Isofluran	CP-Pharma, Burgdorf
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kanülen (30 G) BD Microlance™	Becton Dickinson, Heidelberg
Klebeband (Leukosilk S)	BSN medical, Hamburg
LumiGlo™ Reagent	Cell Signaling, Danvers, USA
Medizinischer Sauerstoff	Air Liquide, Düsseldorf
Natriumchloridlösung (0,9 %)	Berlin-Chemie, Berlin
nCounter® XT TagSet Assay	NanoString, Seattle, USA
Nitrozellulosemembran	Protran Schleicher und Schüll, Dassel
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Biorad, Hercules, USA
NT-proBNP ELISA Kit (CEA485Mu) (Maus)	Cloud-CloneCorp., Houston, USA
Paraformaldehydlösung (4%)	Sigma-Aldrich, Dreisenhofen
<i>Phosphate buffered saline (PBS)</i>	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Pikro-Siriusrot	Sigma-Aldrich, Merck, Darmstadt
Ponceau S	Sigma-Aldrich, Dreisenhofen
RNase-Inhibitor	
RNeasy Minikit (250)	Qiagen, Hilden
Röhrchen 2 ml	Precellys, Bertin Instruments
<i>Sodiumdodecylsulfate (SDS)</i>	Sigma-Aldrich, Dreisenhofen
<i>Taq DNA-Polymerase Recombinant Kit</i>	Applied Biosystems, Foster City, USA
TaqMan® <i>Reverse Transcription Reagents-Kit</i>	Applied Biosystems, Weiterstadt
TGX Stain-Free™ FastCast™ Acrylamid Kit (10 %)	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Th1/Th2/Th9/Th17/Th22/Treg Cytokine 17-Plex (Maus)	Affymetrix, eBioscience, Wien, Österreich
TransBlot® Turbo™ Mini-Size Nitrocellulose	BioRad Laboratories, Cressier, Schweiz
TransBlot® Turbo™ Transfer Stacker	BioRad Laboratories, Cressier, Schweiz

Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe
Triton-X 100	Roth, Karlsruhe
Tuberkulin-Kolbenspritzen Injekt®-F (0,01ml-1ml)	B. Braun, Melsungen
Überwachungselektroden für Frühgeborene	3M Health Care, Neuss
Zirconium Oxide <i>Beads</i> (1.4 mm)	Precellys, Bertin Instruments, Frankfurt

2.1.3 Antikörper und Primer

Tab. 3: Verwendete Antikörper, eingesetzte Verdünnungen und Primer.

<u>Antikörper</u>	<u>Verdünnung</u>	<u>Firma</u>
Intraperitoneale Injektionen		
Anti-IL-6R (Tocilizumab, Klon MR16-1), IgG1 κ , monoklonal, Ratte	5 mg/ml	Chugai Pharma, Japan; La Roche Pharma, Schweiz
Anti-IL-17A Antikörper, Isotyp IgG1 κ , (eBioMM17F3), monoklonal, Maus	1 mg/ml	Affymetrix (Santa Clara) eBioscience™, Österreich
IgG, (6-001-A), polyklonal, Ratte	1 mg/ml	R&D Systems, Minnesota, USA
IgG, Isotyp IgG1 κ , (P3.6.2.8.1), monoklonal, Maus	1 mg/ml	Affymetrix (Santa Clara) eBioscience™, Österreich
Western Blot		
Anti-Akt, polyklonal, Kaninchen	1:500	Cell Signaling, Danvers, USA
Anti-pAkt, polyklonal, Kaninchen	1:500	Cell Signaling, Danvers, USA
Anti-STAT3, polyklonal, Kaninchen	1:500	Cell Signaling, Danvers, USA
Anti-pSTAT3, polyklonal, Kaninchen	1:500	Cell Signaling, Danvers, USA
Anti-IL-6, polyklonal, Kaninchen	1:500	Abcam, Cambridge, UK
Anti-SOCS3, polyklonal, Kaninchen	1:500	Cell Signaling, Danvers, USA
Sekundäre Antikörper		
Anti-Kaninchen -IgG (HRP), Ziege	1:5000	Biorad Laboratories, Feldkirchen
Anti-Maus-IgG (HRP), Ziege	1:5000	Biorad Laboratories, Feldkirchen
Anti-Ratte Alexa Fluor 488, Ziege	1:200	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Primer		
CT-1 (Mm00432772_m1)		Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
GAPDH (Mm99999915_g1)		
IL-1 β (Mm00434228_m1)		

Primer (Fortsetzung)		Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
IL-6 (Mm00446190_m1)		
IL-17A (Mm00439618_m1)		
Kollagen 1 α 1 (Mm00801666_g1)		
Kollagen 3 α 1 (Mm01254476_m1)		
LIF (Mm00434762_g1)		
MMP-9 (Mm00442991_m1)		
TNF- α (Mm00443258_m1)		

2.1.4 Geräte

100 TM Thermal Cycler	Biorad, München
BeadBlaster TM 24 Microtube Homogenizer	Benchmark Scientific, Sayreville, USA
ChemiDoc TM MMP	BioRad Laboratories, Cressier, Schweiz
Elektrophoresekammern	Biorad, Hercules, USA
Fluoreszenzmikroskop	Keyence GmbH, Neu-Isenburg
Inkubator	Binder, Tuttlingen
Luminex FlexMAP 3D Instrument	Luminexcorp, Austin, USA
NanoDrop 2000 Spectrometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
nCounter [®] Analyzer	NanoString Technologies, Seattle, USA
nCounter [®] PrepStation	NanoString Technologies, Seattle, USA
Rotationsmikrotom	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Sicherheitswerkbank	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Thermomixer C	Eppendorf, Hamburg
TransBlot [®] SD Semi Dry Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
ViiA 7 Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Weiterstadt
Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

2.1.5 Software

CFX Manager Version Software Paketes	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
GraphPad Prism (Version 7.0a)	GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA
Horos™ (Version 2.1.1)	Horos Project Software
ImageJ	Universität von Wisconsin-Madison, USA
ImageLab™ 4.1	BioRad Laboratories, Cressier, Schweiz
BZ-Keyence	Keyence GmbH, Neu-Isenburg
NanoString nSolver (Version 4.0)	NanoString, Seattle, USA
OsiriX Lite™	Pixmeo, Genf, Schweiz
SA II Monitoring & Gating System Software V5.12	SA Instruments, Stony Brook, New York, USA
Segment (Version 2.0 R5152) Research Version	Medviso, Lundt, Schweden
Syngo Argus (Version MR B15)	Siemens, Erlangen
xPonent®	Luminexcorp, Austin, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Versuchstiere

Die Experimente wurden nach Genehmigung durch das Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern (LALLF-MV-7221.3-1-013/16) und unter Einhaltung der lokalen Verordnungen der Universitätsmedizin Greifswald durchgeführt.

Die Züchtung der für die Versuche notwendigen Mäuse erfolgte durch die Zentrale Service- und Forschungseinrichtung für Versuchstiere der Universitätsmedizin Greifswald in der Walther-Rathenau-Straße 49a, 17489 Greifswald. Für die Experimente wurden transgene, heterozygote α -MHC-Cyclin T1-Mäuse mit heterozygoten α -MHC-Ga α FVB-Tieren gekreuzt. Die Cyclin T1/Ga α -Mäuse der resultierenden Würfe, die positiv für beide Transgene waren, wurden in einem Alter von 6-7 Wochen verwendet. Geschwistertiere, welche für beide Transgene negativ waren, werden in der vorliegenden Arbeit als Wildtypen (WT) bezeichnet und dienten als gesunde Vergleichskontrollen.

Während der gesamten Versuchsdauer wurden die Tiere in der konventionellen Haltung der Zentralen Service- und Forschungseinrichtung für Versuchstiere Greifswald in offenen Käfigen unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen und bei konstanter Temperatur (23 Grad Celsius

(°C)) sowie Luftfeuchtigkeit (45 %) gehalten. Sie erhielten Standardfutter (sniff Spezialdiäten GmbH, Soest) und Trinkwasser *ad libitum* und hatten einen kontrollierten 12-stündigen Tag-Nacht-Rhythmus.

2.2.2 Gruppeneinteilung

Es erfolgte die Randomisierung der Tiere in fünf Versuchsgruppen. Dabei wurde auf eine möglichst ausgeglichene Geschlechterverteilung geachtet. Die Behandlung der Tiere erfolgte unmittelbar im Anschluss an die erste MRT-Messung entsprechend der jeweiligen Gruppenzugehörigkeit (siehe Tab. 4). Alle eingesetzten Substanzen wurden in der vorgesehenen Dosis und Applikationsart bereits an Mäusen mit einem anderen Krankheitsbild angewandt (193, 194).

Die Gruppen I und III erhielten zur direkten bzw. indirekten Inhibition des IL-6-Signalweges intraperitoneal 500 µg des anti-IL-6R Antikörpers Tocilizumab Klon MR16-1 (Chugai Pharma, Japan und Roche Pharma, Schweiz) bzw. 100 µg des neutralisierenden anti-IL-17A Antikörpers Typ IgG1κ (Affymetrix, eBioscience™, Österreich). Aufgrund des unterschiedlichen Wirkmechanismus war im Vergleich zu dem anti-IL-17A Antikörper eine deutlich höhere Dosis MR16-1 notwendig. Während es sich bei dem anti-IL-17A Antikörper um einen neutralisierenden Antikörper handelt, wurde zur direkten IL-6 Blockade ein Rezeptorblocker verwendet (195). Die Gruppen II und IV fungierten als Immunglobulin-Isotypkontrollen. Durch dieses Vorgehen sollten diejenigen Effekte auf die Herzfunktion und -struktur demaskiert werden, welche auf die IgG-Struktur der verwendeten Antikörper zurückzuführen sind. Gruppe V erhielt 100 µl physiologische Kochsalzlösung (0,9-prozentige isotonische Natriumchloridlösung (NaCl)) und diente der Erhebung von Vergleichsdaten und Veranschaulichung des physiologischen Verlaufs der Erkrankung.

Um das Herz-Kreislauf-System der Versuchstiere durch eine übermäßige Flüssigkeitsgabe nicht zu belasten, wurde für alle Gruppen ein Gesamtvolumen von 100 µl gewählt.

Tab. 4: Versuchsgruppen und entsprechende Behandlung.

	I	II	III	IV	V
Applizierte Substanz	MR16-1	IgG	Anti-IL-17A Antikörper	IgG	NaCl
Volumen	500 µg in 100 µl	500 µg in 100 µl	100 µg in 100 µl	100 µg in 100 µl	100 µl
Herkunft	Ratte	Ratte	Maus	Maus	
Tierzahl	10	11	10	10	6

2.2.3 Übersicht des Versuchsablaufs

Zur Beurteilung der Herzfunktion und ihrer Veränderung über die Zeit erfolgten zwei Kardio-MRT-Messungen im Abstand von sieben Tagen. Diese Zeitspanne wurde in Anlehnung an die vorhandene Literatur gewählt (193). Im Rahmen der *Baseline*-Untersuchung wurden Ausgangsdaten der Tiere im Alter von sechs Wochen generiert. Im Anschluss an diese Messung erfolgte entsprechend der Gruppenzugehörigkeit und unter fortlaufender Narkose die intraperitoneale Injektion der jeweiligen Substanz. Im Anschluss an die Abschlussmessung wurden die Tiere unter fortlaufender Narkose sakrifiziert. Die Herzen wurden entnommen, in PBS gewaschen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt. Zusätzlich wurde jedem Tier eine Blutprobe für die späteren *in vitro* Untersuchungen entnommen.

2.2.4 MRT-gestützte Untersuchung der murinen Herzfunktion

Die Bestimmung der Funktion und Morphologie des murinen Herzens mittels dieses Verfahrens wurde bereits in anderen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe validiert (196, 197).

2.2.4.1 Grundlagen der MRT-Untersuchung

Die Akquisition der MRT-Bilddaten erfolgte mithilfe eines Kleintierscanners, einem 7 Tesla-Kernspintomographen mit supraleitendem Magnetsystem (MAGNET B-C ClinScan 70/30 USR; Bruker, Ettlingen, Deutschland, siehe Abb. 6). Für die Messungen wurde eine phasengesteuerte Rattenkopf RF-Oberflächenspule (*Ratbrain* 2x2 Kanal-Kopfspule, Bruker, Deutschland) genutzt.

Die mittels des Kleintierscanners durchgeführten Untersuchungen sind mit jenen der klinischen Routine vergleichbar. Daher konnten zur Auswertung der Bilddaten Nachbearbeitungsprogramme aus dem humanen Anwendungsbereich verwendet werden. In der vorliegenden Arbeit kam das Bildbearbeitungsprogramm Segment (Medviso, Lundt, Schweden) zum Einsatz.



Abb. 6: Bruker ClinScan 70/30 USR (Links) Bruker ClinScan 70/30 USR (Quelle: www.bruker.com). (Rechts) Technische Angaben.

Bohrlochdurchmesser	130 mm
Maximale Gradientenfeldstärke	290 mT/m
<i>Slew rate</i> / Maximale Gradientengeschwindigkeit	1160 T/m/s
Betrieboberfläche/ <i>Software</i>	Syngo® Argus MR B15, Siemens
Hochfeldstärke	7 T
Systemkühlung	Helium
Protonenresonanzfrequenz	300,4 MHz

2.2.4.2 Narkose, Lagerung und *Monitoring*

Die MRT-Messungen fanden unter kontinuierlicher Gabe eines Gemisches aus medizinischem Sauerstoff und 2,5-prozentigem Isofluran, einem Inhalationsnarkotikum, statt. Zur Narkoseeinleitung wurde den Tieren mittels eines Isofluran-Vaporisators ein 4-prozentiges Isofluran-Gasgemisch bei einer Flussrate von 4l/min zugeführt. Nach Erreichen des Toleranzstadiums wurden die Tiere gewogen und anschließend in Bauchlage horizontal auf dem Messschlitten des Tomographen platziert. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Nase in einer abgedichteten Narkosemaske mit kontinuierlicher Narkosegaszufuhr, das Abdomen auf einem Atemkissen mit Drucksensor und der Thorax in der Mitte der Messspule platziert waren. Mit dem Ziel, Bewegungsartefakte während der Messung zu vermeiden, die Reproduzierbarkeit zu verbessern und eine bestmögliche Datenqualität zu erzielen, wurden die Tiere in der beschriebenen Position fixiert (siehe Abb. 7). Die Standardisierung der Lagerung war wichtig, um vergleichbare Datensätze zu erheben. Da der Lidschlussreflex unter Narkose erlischt, wurden die Augen der Mäuse mit Bepanthen® Nasen- und Augensalbe vor der Austrocknung geschützt. Zur elektrokardiographischen Signalableitung wurden je eine Elektrode am rechten Vorder- und am linken Hinterfuß der Tiere befestigt. Aufgrund der geringen Körpergröße der Versuchstiere wurden hierzu spezielle Oberflächen-EKG-Elektroden für Frühgeborene verwendet. Im Anschluss an die beschriebenen Vorbereitungen wurde der Messschlitten inklusive Messspule und darauf positioniertem Tier bis in das Isozentrum des Magnetfeldes vorgeschoben. Aufgrund einer optimierten Feldhomogenität ist die erreichbare Bildqualität dort am höchsten.

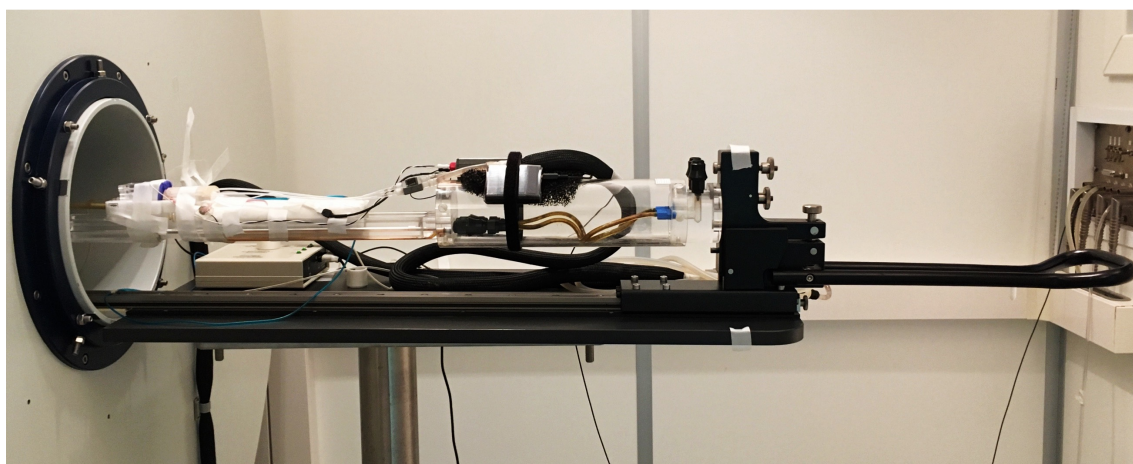


Abb. 7: Versuchsaufbau. Blick auf ein für die Messung vorbereitetes Versuchstier (*Dummy*) vor Positionierung im Magnetfeld. An der Stirnseite des *Scanners* ist ein Arbeitstisch inklusive einer Führungsschiene für den Messschlitten montiert.

Während der Messung wurde eine konstante Atemfrequenz von 30-45 Atemzügen pro Minute angestrebt. In diesem Atemfrequenzbereich konnte ein guter Kompromiss zwischen Messdauer und Bildqualität erzielt werden. Da bereits aus früheren Arbeiten bekannt war, dass die

Körperkerntemperatur einen direkten Einfluss auf die kardiale Funktion der Tiere hat (196), wurde auch dieser Vitalparameter mithilfe einer rektal eingeführten Temperatursonde überwacht und reguliert: Mittels eines Wärmekissens, welches an ein Wasserbad angeschlossen war und den Großteil des Tierkörpers bedeckte, wurde die Körperkerntemperatur ab einem definierten Zeitpunkt der Messung konstant bei $35,0^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ gehalten. Körperkerntemperatur, Atmung und EKG der Tiere wurden mittels Transmittermodul auf einen *Monitoring-Desktop* im Kontrollraum des MRT übertragen und konnten so in Echtzeit kontrolliert werden (Abb. 8).

Nach Beendigung der *Baseline*-Bildakquisition erfolgte die intraperitoneale Substanzapplikation entsprechend der Gruppenzugehörigkeit der Versuchstiere. Anschließend wurde die Narkose unter Verwendung von reinem Sauerstoff mit einer Flussrate von 1l/min ausgeleitet und das Tier unter Verwendung einer Rotlichtlampe bis zum Erwachen engmaschig beobachtet.

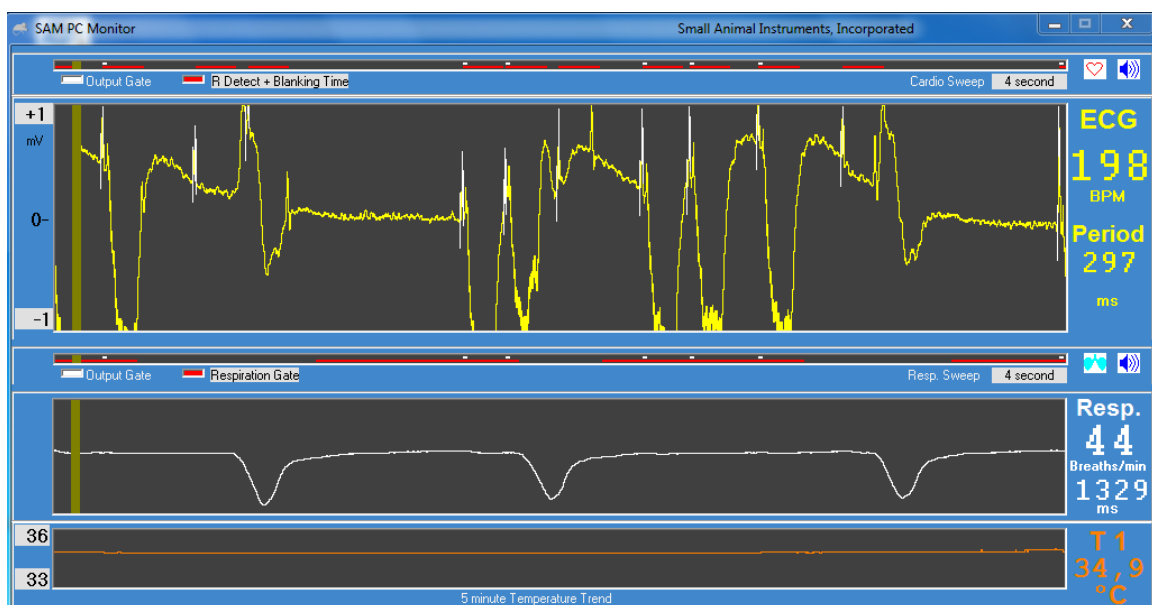


Abb. 8: Monitoring der Vitalparameter während der MRT-Messung. Screenshot des Programms PC-Sam. Angezeigt werden in der obersten Zeile links das EKG mit markierten R-Zacken und rechts die Herzfrequenz in Schlägen pro Minute; in der mittleren Zeile links die Respirationsskurve und rechts der entsprechende Wert in Atemzügen pro Minute; in der untersten Zeile links die Körperkerntemperaturkurve und rechts der entsprechende Wert in $^{\circ}\text{C}$.

2.2.4.3 Elektrokardiographische und respiratorische Synchronisation

Um Bewegungsartefakte durch das schlagende Herz sowie die atemabhängigen Thoraxexkursionen zu minimieren und räumlich hochauflösende Aufnahmen zu definierten Zeitpunkten der Herzaktion aufzeichnen zu können, war eine Synchronisation der Bildaufnahme mit EKG und Atmung der Tiere notwendig (sog. elektrokardiographisches und respiratorisches *Gating*) (198).

Bei der in der vorliegenden Arbeit angewandten Methode der EKG-Synchronisation handelt es sich um sog. prospektives *Triggern*. Hierbei werden Bilddaten über mehrere Herzzyklen

hinweg zu definierten Zeitpunkten der Herzaktion aufgezeichnet. Nach Erkennen einer R-Zacke in der elektrokardiographischen Ableitung folgt in einem darauffolgenden prädefinierten Zeitintervall, dem Akquisitionsfenster (in der vorliegenden Arbeit 419 ms lang), die Datenerfassung.

Ein wiederholtes Atemhalten über 10 bis 20 Sekunden, wie es bei humanen kardialen MRT-Messungen üblich ist, kann bei Versuchstieren nicht realisiert werden. Aus diesem Grund wurden die über einen Drucksensor im Atemkissen erfassten Informationen über die Respiration sowie die Signale des 2-Kanal-EKGs an ein Verarbeitungsgerät (SA Instruments, Stony Brook, New York, USA) weitergeleitet und miteinander verrechnet, sodass die Datenakquisition auf R-Zacke und end-expiratorische Atemneutrallage *getriggert* werden konnte. Zusammenfassend erfolgte in Atemruhelage in einem zeitlichen Abstand von 100 ms nach einer R-Zacke über 419 ms die Aufzeichnung des Herzzyklus.

2.2.4.4 Planung der Sequenzen und Bildakquisition

Das Myokard wird üblicherweise in einem Koordinatensystem aus drei senkrecht zueinanderstehenden Achsen betrachtet. Zweikammerblick (2CV), Vierkammerblick (4CV) und Kurzschnitt (SAX) wurden auch in der vorliegenden Arbeit erhoben (Abb. 9).

Um die finalen, auswertungsrelevanten Standardebenen im hochauflösenden *gradient echo* (GRE)-Modus zu akquirieren, mussten zuvor *localizer*-Sequenzen, die der Lagebestimmung des Myokards im Thorax dienen und anhand derer *Turbo-FLASH*-Sequenzen mit geringerer Auflösung erstellt werden können, generiert werden. Die erste *Turbo-FLASH*-Sequenz, eine *Multi-Slice*-Aufnahme, wurde in einer senkrechten Ebene zum Ventrikelseptum ausgerichtet. Sie bildet in einem Stapel von vier je 5 mm auseinanderliegenden transversalen Schichten das gesamte Herz von Basis bis Apex ab. Anhand dieser axialen Bilddaten wurde ein *Turbo-FLASH-2CV* erstellt und basierend auf diesem ein *Turbo-FLASH-4CV* generiert, indem die Schnittebene gleichzeitig durch den Apex und die Mitte der Mitralklappe geführt wurde.

Zur abschließenden Akquisition der hochauflösenden und auswertbaren GRE-Bilddaten wurden spezielle Einstellungen (Repetitionszeit (TR) 5,8 ms, Echozeit (TE) 2,25 ms, *flip*-Winkel 25°, Auflösung 192 × 192 Pixel) gewählt. Beim GRE-Modus handelt es sich um eine weit verbreitete Methode zur Darstellung muriner Herzen. GRE-Sequenzen nutzen den intrinsischen Kontrast des Bildes: Sie sättigen stationäre *Spins* einer Schicht und nutzen einfliegende *Spins*, beispielsweise die des zirkulierenden Blutes, um unterschiedliche Gewebe deutlicher voneinander abgrenzen zu können (199). Es resultieren gut kontrastierte, zweidimensionale *bright-blood*-Kontrast-Aufnahmen, in denen Myokardgewebe dunkel und Blut hell erscheint. Nach Erhalt der finalen GRE-2CV und GRE-4CV konnten durch Einlegen senkrechter Schnittebenen, je nach Myokardgröße, 5-7 jeweils 1 mm dicke GRE-SAX erhoben

werden. Hierbei wurde darauf geachtet, dass die basale SAX auf Höhe der Mitralklappenebene und senkrecht zur Längsachse des Ventrikels positioniert wurde (198, 200).

Eine exakte Ausrichtung der Schnittebenen wurde durch sog. *Cross-Referencing* erleichtert, der gleichzeitigen Einstellung der interessierenden Struktur in zwei Ebenen. Diese zeitlich aufwendige Methode der Datenerhebung ermöglichte die Durchführung einer akkuraten Volumenanalyse mittels *Slice-by-Slice*-Technik. Alle Aufnahmen wurden im *Cine-movie-loop*-Format angefertigt. *Cine*-Sequenzen bestehen aus chronologisch über das R-R-Intervall verteilten Einzelbildern und visualisieren den gesamten Herzzyklus von Endsystole bis Enddiastole in den einzelnen Schichten des Myokards. In Abhängigkeit von der Herzfrequenz, d.h. der Länge des R-R-Intervalls, waren hierfür 15-30 Einzelbilder nötig.

Eine vollständige MRT-Messung von Ein- bis Ausleitung der Narkose dauerte, in Abhängigkeit von Herzfrequenz und Ventrikelgröße, durchschnittlich 60 Minuten. Das Ergebnis war ein 5-7 Schichten umfassendes, den gesamten linken Ventrikel über einen Herzzyklus abbildendes, *Full-volume*-Datenset.

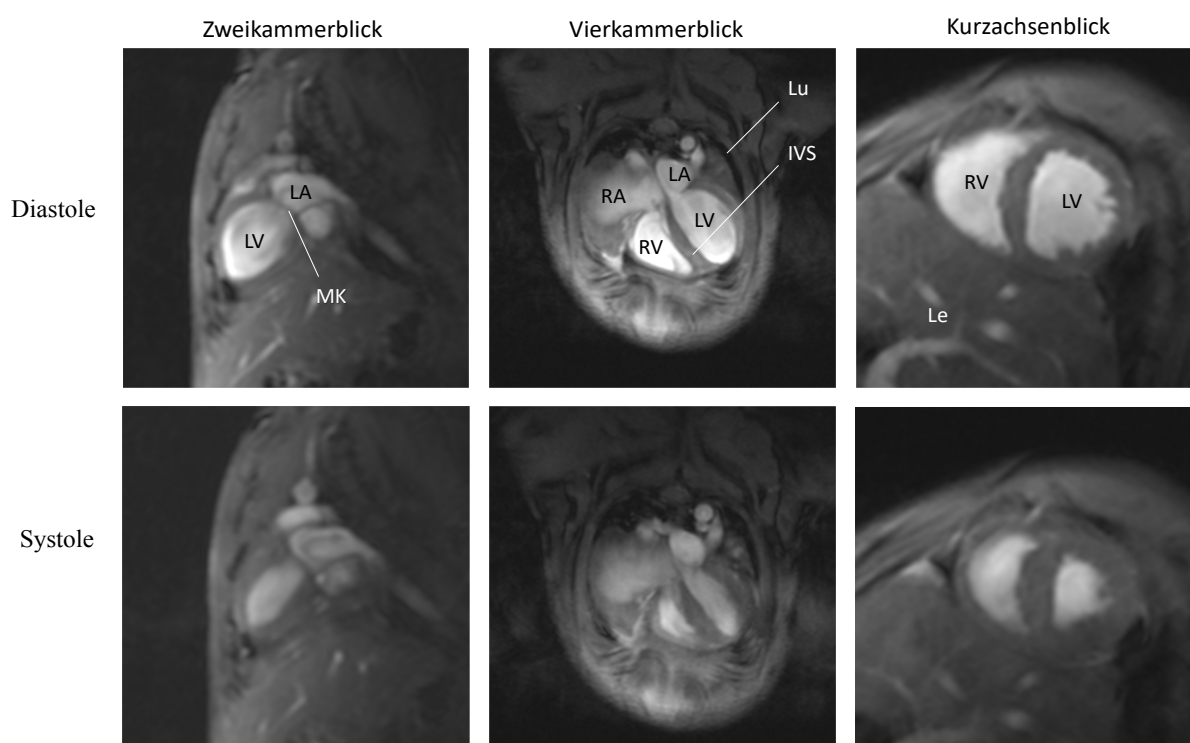


Abb. 9: Repräsentative Aufnahmen der Standardblicke bei Cyclin T1/Gαq-Mäusen im GRE-cine-Modus. Obere Zeile: Aufnahmen zum Zeitpunkt der Diastole; untere Zeile: Aufnahmen zum Zeitpunkt der Systole. Links: Zweikammerblick; Mitte: Vierkammerblick; Rechts: midventrikulärer Kurzachsenblick. LA = linkes Atrium; RA = rechtes Atrium; LV = linker Ventrikel; RV = rechter Ventrikel; Lu = Lunge; IVS = interventrikuläres Septum; MK = Mitralklappe.

2.2.4.5 Auswertung der MRT-Daten

Mit Ausnahme des *Fractional Shortening* (FS) wurden alle kardialen Funktionsparameter mit Hilfe der frei verfügbaren MRT-Bildanalyse-Software Segment bestimmt, da dieses Programm auch in murinen Größenordnungen (LV Wanddicke 1,5-1,8 mm und RV Wanddicke 0,5 - 0,6 mm) präzise Ergebnisse liefert. Die Auswertung der GRE-*full-volume*-Datensets erfolgte dabei manuell, basierend auf der als Methode der Wahl geltenden *Slice-by-slice* Technik (199) (Abb. 10, 11). Folgende morphologisch-funktionelle Parameter wurden zur Beurteilung der kardialen Funktion erhoben:

- linksventrikuläres enddiastolisches Volumen (LVEDV)
- linksventrikuläres endsystolisches Volumen (LVESV)
- linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF)
- linksventrikuläre Masse (LVM)
- linksventrikuläres *Fractional Shortening* (LVFS)
- linksventrikuläres Schlagvolumen (LVSV)

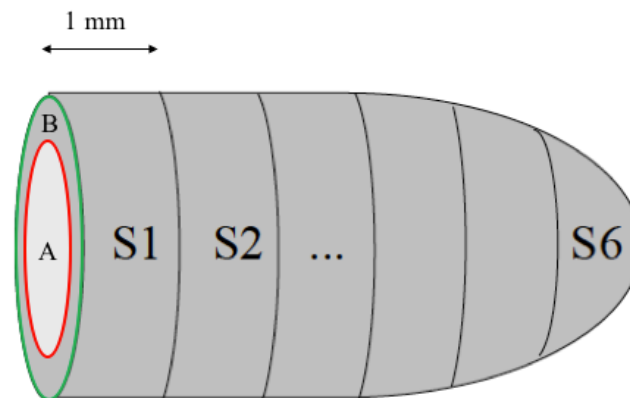


Abb. 10: Prinzip der Berechnung der linksventrikulären Funktionsparameter LVEDV, LVESV, LVEF und LVM auf der Basis eines *full-volume*-Datensets des linken Ventrikels.

S1-6 repräsentieren 1 mm dicke Schichten, welche den gesamten linken Ventrikel abbilden. Die Endokard- und Epikardkonturen wurden als rote bzw. grüne Linie eingezeichnet. Fläche A repräsentiert das blutgefüllte linksventrikuläre Lumen, Fläche B das myokardiale Gewebe.

Berechnung des LVEDV: Die im enddiastolischen Einzelbild von Segment errechnete Fläche A wird mit der Schichtdicke (1 mm) multipliziert. So wird für die Schichten S1-6 das Volumen berechnet und abschließend zu einem enddiastolischen Gesamtvolumen addiert. Bestimmung des LVESV: Identisches Vorgehen wie bei der Berechnung des LVEDV unter Heranziehen der endsystolischen Einzelbilder. Zur Berechnung der LVEF wurde die Formel $LVEF = LVSV / LVEDV \times 100 \%$ verwendet. Zur Kalkulation der LVM wurde die von Segment errechnete Fläche B mit der Schichtdicke (1 mm) multipliziert. Abschließend wurde das myokardiale Gewebeprodukt mit einer angenommenen Myokardgewebedichte von 1,05 g/ml multipliziert (201).

LVEDV = linksventrikuläres end-diastolisches Volumen; LVESV = linksventrikuläres end-systolisches Volumen; LVEF = linksventrikuläre Ejektionsfraktion; LVM = linksventrikuläre Masse.

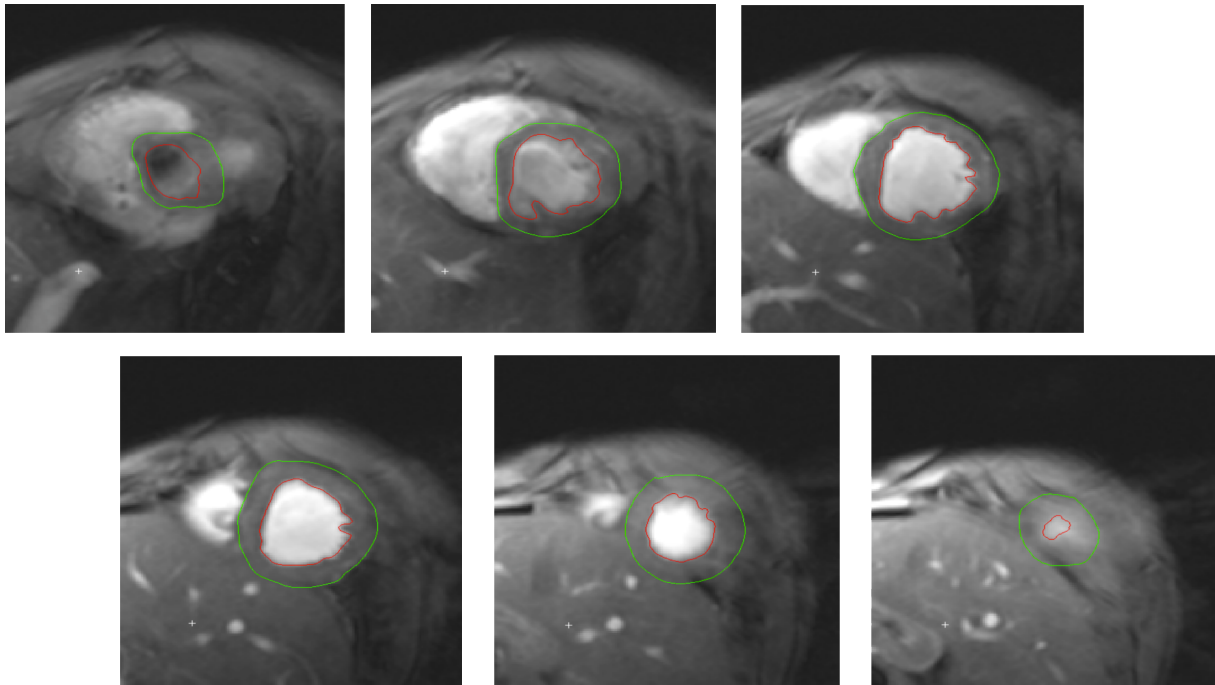


Abb. 11: Endo- und epikardiale Konturierung mittels der *Software Segment*.

Repräsentatives *Full-volume*-Datenset einer Cyclin T1/*Gαq*-Maus von basal (links oben) nach apikal (rechts unten) während der Diastole. Das Myokard erscheint hypo- und das Blut hyperintens. Die rote und grüne Linie repräsentieren jeweils die Endokard- bzw. Epikardkontur des linken Ventrikels. Die von der roten Linie umschlossene Fläche stellt das linksventrikuläre Lumen dar; die Fläche zwischen Endo- und Epikardkontur entspricht dem myokardialen Gewebe.

Zur Bestimmung des *Fractional Shortenings* wurde die frei verfügbare Bildgebungssoftware Horos (Horos Project Software) herangezogen. In der midventrikulär gelegenen SAX wurden die Endokardgrenzen des linken Ventrikels im enddiastolischen und endsystolischen Einzelbild eingezeichnet. Da es sich hierbei um einen Umfang handelt, konnten daraus der Radius und anschließend der Diameter des linken Ventrikels sowohl in der Diastole (LVEDD) als auch in der Systole (LVESD) errechnet werden. Anhand der folgenden Formel wurde abschließend das FS bestimmt: $FS (\%) = [(LVEDD - LVESD) / LVEDD] \times 100$

Das linksventrikuläre Schlagvolumen wurde wie folgt errechnet: $LVSV = LVEDV - LVESV$

2.2.5 Substanzapplikation

Im Anschluss an die *Baseline*-Messung wurde den Tieren unter fortlaufender Narkose die jeweilige Substanz entsprechend ihrer Gruppenzugehörigkeit intraperitoneal mit Hilfe einer 1 ml Insulin Einmalspritze (Disposimed, Geinhausen, Deutschland) und einer 30 G Kanüle (BD Microlance™, Becton Dickinson, Heidelberg) injiziert. Um die Herz-Kreislauf-Belastung der Versuchstiere möglichst gering zu halten, wurde ein Gesamtvolumen von 100 µl gewählt. Die Injektion erfolgte verblindet.

2.2.6 Gewebeentnahme

Unter fortlaufender Narkose erfolgte unmittelbar nach der MRT-Abschlussmessung die Sakrifizierung der Tiere mittels zervikaler Dislokation sowie die Eröffnung des Thorax zur Blut- und Herzentnahme. Die Herzen wurden mit PBS gespült, in einem Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Das Blut, welches sich in der thorakalen Kavität gesammelt hatte, wurde mit Hilfe einer 2 ml Spritze (BD, Franklin Lakes, USA) ohne Kanülenaufsatz entnommen, um eine artifizielle Hämolyse zu vermeiden. Anschließend wurde die Blutprobe unter Zugabe von EDTA (50 µl 0,3 M EDTA/ 0,5 ml Blut) in ein Eppendorfgefäß überführt und bei Raumtemperatur für 15 Minuten bei 1500 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Das EDTA-Plasma wurde in ein neues Gefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

2.2.7 Plasmaanalyse

Mittels *enzyme-linked immunosorbent Assay* (ELISA) wurden die Plasmakonzentrationen von Gal-1 (*Galectin-1* ELISA Kit Maus (ab119595), Abcam, Cambridge, UK), Gal-3 (*Galectin-3* ELISA Kit Maus (ab203369), Abcam, Cambridge, UK), C-reaktives Protein (CRP) (*CRP* ELISA Kit Maus (ab222511), Abcam, Cambridge, UK), NT-proBNP (*NT-proBNP* ELISA Kit Maus (CEA485Mu), Cloud Clone Corp., Houston, USA), IL-17A (IL-17A ELISA Kit Maus (LS-F24837, LSBio, Seattle, USA) und IL-6 (IL-6 ELISA Kit Maus (ab222503), Abcam, Cambridge, UK) nach Herstellervorgaben bestimmt. Die in den Kits bereitgestellten Mikrotiterplatten sind mit Antigen-spezifischen Antikörpern beschichtet. Plasmaproben (Gal-1: 1:10 verdünnt; Gal-3: 1:100 verdünnt; CRP: 1:20 verdünnt; NT-proBNP: 1:25 verdünnt; IL-17A: 1:10 verdünnt; IL-6: 1:5 verdünnt) und Standards wurden in die entsprechenden *wells* gegeben und laut Vorschrift inkubiert. Im darauffolgenden Schritt erfolgte die Zugabe eines spezifischen Biotin-konjugierten Antikörpers gegen das jeweilige Antigen. Nach erneuter Inkubation erfolgte die Zugabe eines Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplexes. Durch einen anschließenden Waschschrift wurden alle ungebundenen Konjugate entfernt. Nach Zugabe einer TMB-Substratlösung erfolgte ein Farbumschlag von farblos in blau. Nach Beendigung der Enzym-Substrat-Reaktion wurde die Absorption spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm bestimmt. Die Erstellung der Standardkurve erfolgte anhand der eingesetzten Standardverdünnungen, sodass die Konzentrationen von Gal-1, Gal-3, CRP, NT-proBNP, IL-17A und IL-6 ermittelt werden konnten.

Die Plasmakonzentrationen der Interleukine 1 β , -2, -5, -6, -17A, -10, -18, -22, und -27, von GM-CSF, TNF- α und IFN- γ wurden mittels eines Maus Th1/Th2/Th9/Th17/Th22/Treg Cytokine 17-Plex (Affymetrix, eBioscience, Wien, Österreich) unter Verwendung der xMAP[®] Technologie nach Herstellerangaben bestimmt. Hierbei wurden die zu untersuchenden

Analyten zunächst an einen Luminex *bead*-gekoppelten spezifischen Antikörper gebunden. Nach vorgegebener Inkubationszeit von 60 min erfolgte die Zugabe von analytspezifischen Biotin-gebundenen Detektionsantikörpern. Für die Quantifizierung des Analyt-Antikörper-Gemisches wurde Streptavidin-Phycoerythrin hinzugefügt. Das mit Phycoerythrin konjugierte Streptavidin bindet an das Biotin der Detektionsantikörper. Für die Messung wurde ein Luminex FlexMAP 3D Instrument (Luminexcorp, Austin, USA) genutzt. Die magnetischen *Beads* wurden während der Messung in einer Einzelschicht angeordnet und von zwei Leuchtdioden (LED) angestrahlt. Die erste LED identifizierte den untersuchten Analyten, während die zweite LED die Stärke des durch Phycoerythrin-Streptavidin emittierten Signals bestimmte. Für die Akquisition und Analyse der Ergebnisse wurde die Software xPonent[®] (Luminexcorp, Austin, Tx, USA) genutzt. Die Quantifizierung der einzelnen Analyten im Plasma der Versuchstiere (n=6-10 pro Gruppe) erfolgte mit Hilfe einer mitgeführten Standardreihe.

2.2.8 RNA-Analytik

An die Ribonukleinsäure (RNA)-Isolation wurde eine Untersuchung der mRNA-Expression im Herzgewebe mittels quantitativer *Real-Time* Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und NanoString nCounter[®]-Methode angeschlossen.

2.2.8.1 RNA-Isolation

Die Homogenisierung des Herzgewebes erfolgte mit Hilfe des BeadBlaster[™] (Benchmark Scientific, Sayreville, USA) in 2 ml-Röhrchen unter Zugabe von 700 µl RLT-Lysepuffer und vier Zirconium *Beads* (2.8 mm Zirconiumoxid *Beads*, Precellys, Bertin Instruments, Frankfurt) in zwei 1-minütigen Zyklen à 6 m/s.

Die anschließende Isolation und Aufreinigung der RNA aus dem Lysat wurde mittels eines RNA-Isolations-*Kits* nach den Anwendungsvorschriften des Herstellers durchgeführt. Nach Zugabe von 70 % Ethanol wurden die Proben in eine RNeasy Spin Säule überführt und bei 10.000 Umdrehungen pro Minute für 15 Sekunden zentrifugiert. Nach dreimaliger Aufreinigung mittels Pufferlösungen (1x 700 µl RW1, 2x 500 µl RPE Puffer) und anschließender Zentrifugation wurden die Proben in ein neues Eppendorfgefäß überführt und die RNA nach Zugabe von 30-50 µl RNase-freiem Wasser durch erneute Zentrifugation eluiert (10.000 Umdrehungen pro Minute, 1 Minute). Abschließend wurde die RNA-Konzentration spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bzw. 280 nm bestimmt. Die Absorption bei 260 nm ist ein Maß für die Gesamtmenge der RNA in der Probe, während die Absorptionsmessung bei 280 nm der Bestimmung der Reinheit der Proben bzw. der Verunreinigung durch Proteine dient und als Quotient A260/A280 dargestellt wird.

2.2.8.2 Genexpressionsanalyse mittels quantitativer *Real-Time* PCR (TaqMan®)

Um eine PCR durchführen zu können, ist es notwendig, die initial vorliegende Gesamt-RNA in eine komplementäre Einzelstrang-Desoxyribonukleinsäure (cDNA) umzuschreiben. In der vorliegenden Arbeit wurde die reverse Transkription von 300 ng RNA in cDNA mittels des *TaqMan® Reverse Transcription Reagents-Kit* (Applied Biosystems, Foster City, USA) durchgeführt. Unter Einsatz der gewonnenen cDNA erfolgte mit Hilfe des *Taq DNA-Polymerase recombinant Kit* (Applied Biosystems, Foster City, USA) eine quantitative PCR. Die Quantifizierung der gewonnenen DNA-Amplifikate wurde unter Zuhilfenahme von fluoreszenzmarkierten (FAM), zu den Ziel-DNA-Sequenzen komplementären Sonden ermöglicht. Als interne PCR-Kontrolle wurde eine mit dem Fluoreszenzfarbstoff VIC markierte Sonde mitgeführt, welche komplementär an ein synthetisches, dem Reaktionsgemisch beigefügtes Templat bindet und gut von den FAM-markierten Zielsequenzen abzugrenzen ist. Die Quantifizierung der Fluoreszenzsignale erfolgte in der exponentiellen Phase der PCR, da hier optimale Reaktionsbedingungen herrschen.

Die Daten aus der PCR-Analyse wurden zunächst mit Hilfe des *CFX Manager Version Software Paketes* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) und anschließend mittels relativer Quantifizierung unter Anwendung der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode analysiert. Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase (GAPDH) wurde als Referenzgen mitgeführt. Die Expressionsdaten wurden auf eine unbehandelte Kontrolle bezogen.

2.2.8.3 Genexpressionsanalyse mittels der NanoString nCounter®-Methode

Eine weitere Methode zur Analyse der Genexpression im Herzgewebe stellt die nCounter® Technologie von NanoString (Seattle, USA) dar. Sie basiert auf einem molekularen Barcode-Prinzip und erlaubt, im Gegensatz zur quantitativen PCR, eine direkte, enzymfreie Messung der *Messenger* (m)RNA ohne vorherige Umschreibung in cDNA oder Amplifikation. Dies ermöglicht eine geringe Variabilität und hohe Replizierbarkeit der Daten. Das Verfahren ermöglicht es, in einer einzigen Probe unterschiedliche mRNA-Sequenzen zeitgleich zu detektieren.

Universelle *Capture*- und spezifische fluoreszenzmarkierte *Reporter*-Tags hybridisieren mit Oligonukleotid-Sondenpaaren (Sonden A und B, *Integrated DNA Technologies*, Leuven, Belgien), welche spezifisch an die Ziel-mRNA binden (Abb. 12). In ihrer Gesamtheit werden Oligonukleotid-Sondenpaare, *Capture*- und *Reporter*-Tags als TagSet bezeichnet. Durch Hybridisierung der TagSets mit der mRNA entstehen fluoreszierende Tag-Komplexe. Die unterschiedlichen Ziel-mRNA-Sequenzen werden dabei durch individuelle Fluoreszenzfarbstoffkombinationen aus sechs Farbkugeln, einem Barcode gleich, repräsentiert. Zur Quantifizierung der mRNA misst das Fluoreszenzmikroskop nicht die

Fluoreszenzintensität, sondern bestimmt die genaue Anzahl der Tag-Komplexe. Softwarebasiert werden die Daten anschließend automatisiert ausgewertet und mit Hilfe endogener Haushaltsgenkontrollen normalisiert.

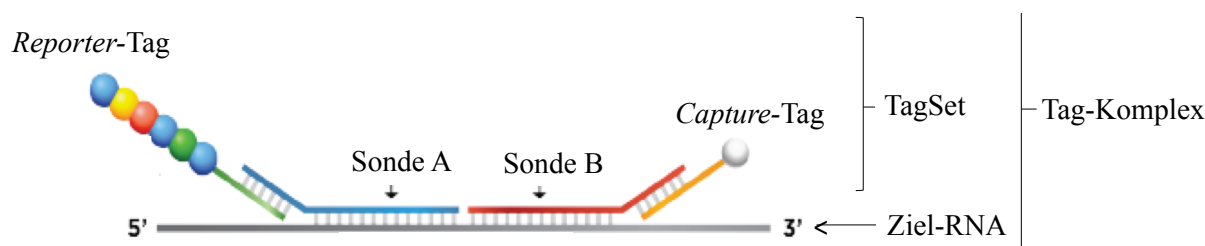


Abb. 12: Prinzip der NanoString nCounter® Technologie zur Analyse der Genexpression im murinen Herzgewebe. In Anlehnung an „NanoString: nCounter® XT Assay User Manual“. *Capture-* und *Reporter-*Tags hybridisieren mit Oligonukleotid-Sondenpaaren (Sonden A und B), welche ihrerseits direkt und spezifisch an die Ziel-mRNA-Sequenzen binden. Dabei hybridisiert Sonde A mit einem spezifischen fluoreszenzmarkierten *Reporter-*Tag und dem 5'-Ende der mRNA-Sequenz; Sonde B hybridisiert mit einem *Capture-*Tag und dem 3'-Ende der mRNA-Sequenz. Es entsteht ein sog. Tag-Komplex, welcher mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie ausgelesen werden kann.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Anzahl der mRNA-Kopien von 12 Haushaltsgenen und 24 Zielgenen bestimmt. Hierfür wurde der nCounter® XT TagSet Assay (NanoString, Seattle, USA) genutzt. Mit Hilfe mRNA-spezifischer Oligonukleotid-Pools wurden *Master Stocks* mit je für 12 Haushaltsgen-mRNA- bzw. 24 Ziel-mRNA-Sequenzen spezifische Oligonukleotid-Sonden A und B erstellt. Hierfür wurden je 5 µl des jeweiligen Oligonukleotids in 2 ml-Eppendorfgefäße pipettiert und durch Auffüllen mit TE-Puffer (10 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA) ein Gesamtvolumen von 1 ml erreicht. Ausgehend von den *Master Stocks* wurden *Working Pools* generiert. Zu diesem Zweck wurden 3 µl des jeweiligen *Master Stocks* mit 22 µl TE-Puffer aufgefüllt. Abschließend wurde nach Angaben des Herstellers ein *Master Mix* erstellt (Abb. 13). Dieser enthielt 70 µl Hybridisierungspuffer, je 7 µl der Oligonukleotid-Sonden A und B aus den zuvor hergestellten *Working Pools* und je 28 µl *Reporter-* und *Capture-*Tags, welche spezifisch für die Oligonukleotid-Sonden A und B waren. Dabei wurde ein Gesamtvolumen für 14 Proben angesetzt, um spätere Pipettierverluste ausgleichen zu können. Der *Master Mix* wurde in 12 Aliquots à 11 µl abgefüllt und je 4 µl der zu untersuchenden mRNA hinzugegeben.

Die Hybridisierung der Proben erfolgte in einem Thermocycler bei 67°C für 16 Stunden. Nach erfolgter Bildung der Tag-Komplexe wurden die Proben in die nCounter® Prep Station *Hardware* (NanoString, Seattle, USA) überführt und alle darauffolgenden Prozesse automatisiert durch das Gerät durchgeführt: Nach zweimaliger Aufreinigung der Proben zur Entfernung überschüssiger TagSets mithilfe magnetischer *Beads* und Immobilisierung auf einer automateninternen Kassettenoberfläche, erfolgte die circa 5-stündige digitale Analyse der Proben im *Digital Analyzer*. Anschließend wurde die Auswertung der Daten mithilfe der

nSolver[®] *Analysis Software* (NanoString, Seattle, USA) durchgeführt. Die Ergebnisse wurden auf fünf Haushaltsgene (β -Aktin, β 2-Mikroglobulin (B2m), Eukaryoter Translations- und Elongationsfaktor γ (EEF1G), Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und Ribosomales Protein L19 (Rpl19)) als endogene Kontrollen normalisiert. Die notwendigen Einstellungen an der nCounter[®] Prep Station und die Bedienung der Auswertungssoftware wurden entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt.

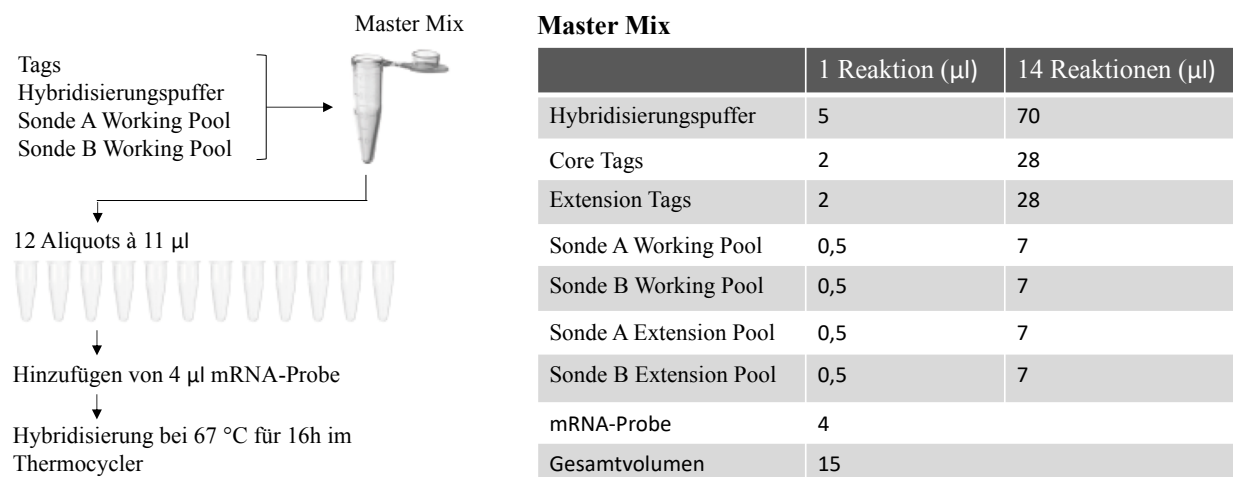


Abb. 13: Herstellung des Master Mixes und Vorbereitung der Reaktionsgefäße für die RNA-Hybridisierung. In Anlehnung an „nanoString: nCounter[®] XT Assay User Manual“.

2.2.9 Protein-Analytik

2.2.9.1 Western Blot

Um Proteine mittels Western Blot-Analyse nachweisen zu können, müssen diese zunächst elektrophoretisch aufgetrennt werden. Anschließend kann eine quantitative Bestimmung mittels Antigen-Antikörper-Reaktion erfolgen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Proteinanalyse an kardialem Gewebe aus dem Apex der Herzen durchgeführt. Nach manuellem Mörsern des tiefgefrorenen Gewebes erfolgte die Homogenisierung der Proben mit Hilfe des BeadBlasters[™] in 2 ml-Röhrchen (Precellys 24, Bertin Instruments, Frankfurt) unter Zugabe von 200 µl Lysepuffer und vier Zirconium *Beads* (2.8 mm, Precellys, Berlin Instruments, Frankfurt). Um eine möglichst vollständige Denaturierung der Proben zu erreichen, wurde das Lysat für 5 min bei 100°C erhitzt. Zur Beendigung des Denaturierungsschrittes wurden die Proben 5 min auf Eis heruntergekühlt. Abschließend erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 300 g für 15 min (RT), um möglichen Zelldebris zu entfernen. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfröhrchen gegeben.

Anschließend erfolgte die Auftrennung der Proteine entsprechend ihres Molekulargewichts mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE). 25 µg der Proteinproben wurden in die Taschen des Sammelgels gegeben und die Elektrophorese bei 100

V für circa 1,5 Stunden durchgeführt. Zur Erleichterung der Größenbestimmung der Proteine wurde ein vorgefärbter Größenstandard mitgeführt (10 µl, *Dual color Precision Plus Protein*™, Biorad).

Im Anschluss an ihre Auftrennung wurden die Proteine zum immunologischen Nachweis auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und unter Zugabe von Methanol immobilisiert. Nach Inkubation der Membran mit einem antigenspezifischen Primärantikörper über Nacht sowie mehreren Waschschrritten wurden spezifische *horse radish peroxidase* (HRP)-konjugierte Sekundärantikörper auf die Membran gegeben, die mit einem Färbereagenz reagierten. Die entstandene Chemolumineszenz konnte mit Hilfe eines Western Blot-Detektionssystems (ChemiDoc™MP, BioRad Laboratories, Cressier, Schweiz) und der zugehörigen Software (*ImageLab™ 4.1*) quantifiziert werden. Abschließend erfolgte die quantitative Auswertung der Bandenintensitäten der Zielproteine bezogen auf die jeweils mitgeführten Referenzen GAPDH oder β-Aktin.

2.2.10 Histologie

2.2.10.1 Hypertrophieanalyse

Die Mikroskopie-gestützte Bestimmung der Kardiomyozytengröße erfolgte anhand Hämatoxylin-Eosin (HE)-gefärbter, in Paraffin gebetteter LV-Gewebequerschnitte. Die HE-Färbung wurde dabei nach Standardprotokoll durchgeführt und die Querschnittsfläche (CSA) von 80 Kardiomyozyten pro Herz mit Hilfe des Bildbearbeitungsprogramms *ImageJ* (Universität von Wisconsin-Madison, USA) bestimmt. Pro Versuchsgruppe wurden die Herzen von 5 Tieren untersucht.

2.2.10.2 Bestimmung des Fibrosegrades

Um Kollagen spezifisch anzufärben und den Fibrosegrad des murinen Herzgewebes zu bestimmen, wurde an 5 µm dicken LV-Paraffinschnitten eine Picro-Siriusrot-Färbung nach Standardprotokoll durchgeführt. Die Bestimmung der prozentualen interstitiellen Fibrosefläche erfolgte mit Hilfe der BZ-Analysesoftware Keyence (Keyence GmbH, Neu-Isenburg). Es wurden 5 Versuchstiere pro Gruppe untersucht.

2.2.11 Immunhistochemie

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden 5 µm dicke LV-Kryogewebeschnitte nach 1-stündiger Permeabilisierung mit Triton/PBS/FBS mit einem fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper (Anti-Ratte Alexa Fluor 488, Verdünnung 1:1000) gegen den IL-6R Antikörper Tocilizumab Klon MR16-1 bei Raumtemperatur für 1 Stunde im Dunkeln inkubiert. Nach einem Waschgang mit Triton/PBS/FBS erfolgte die Färbung der Zellkerne mittels DAPI

(Verdünnung 1:5000). Die histologische Auswertung wurde mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops (Keyence) durchgeführt.

2.2.12 Statistische Datenanalyse

Die statistischen Analysen wurden mit Hilfe des Statistikprogramms GraphPad Prism® (Version 7.0a) durchgeführt. Zur Berechnung der Signifikanzniveaus wurden zunächst *one-way* ANOVA-Analysen und anschließend zweiseitige t-Tests ausgeführt. Die Daten wurden als Mittelwert \pm Standardfehler (SEM) angegeben. Als signifikant wurden Ergebnisse mit p-Werten $\leq 0,05$ bewertet und das Signifikanzniveau in den Graphiken durch Symbole (*, \$, ...) dargestellt.

3. Ergebnisse

3.1 Charakterisierung des murinen HI-Modells α -MHC-Cyclin T1/G α q hinsichtlich der Rollen von IL-6 und IL-17A

Zur Charakterisierung der Rollen von IL-6 und IL-17A im verwendeten Herzinsuffizienzmodell wurden an Herzgewebe- und Blutplasmaproben laborchemische Analysen durchgeführt und die Ergebnisse mit denen von Wildtyptieren verglichen.

Die Blutplasmaspiegel von IL-6, IL-17A und CRP wurden mittels ELISA bestimmt. Sowohl die IL-17A- ($256,5 \pm 33,9$ pg/ml vs. $141,9 \pm 27,8$ pg/ml, $p=0,039$, Abb. 14A) als auch die IL-6-Konzentrationen ($65,5 \pm 9,5$ pg/ml vs. $12,3 \pm 3,1$ pg/ml, $p=0,002$, Abb. 14B) waren bei den herzinsuffizienten Tieren signifikant erhöht.

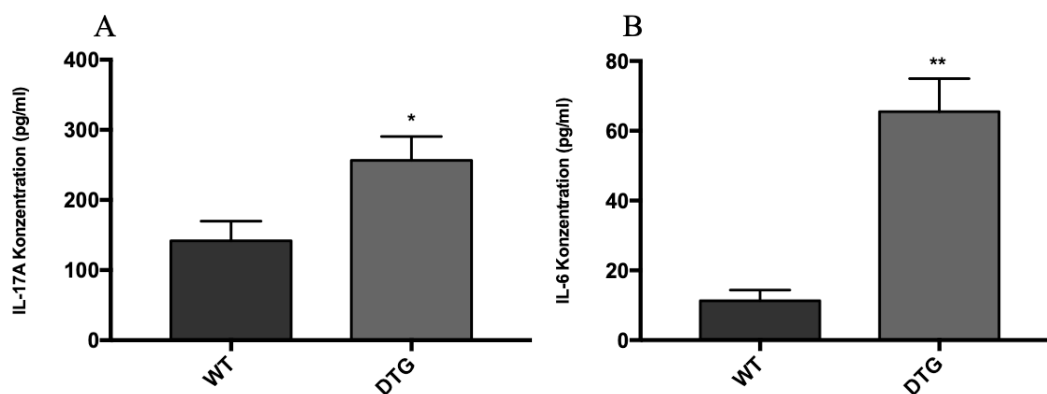


Abb. 14: Plasmakonzentrationen der Interleukine IL-6 und IL-17A im Cyclin T1/G α q-Mausmodell.

Die Plasmakonzentrationen von IL-6 (A) und IL-17A (B) wurden mittels ELISA ermittelt. Die doppelt transgenen herzinsuffizienten Cyclin T1/G α q-Tiere (DTG) wurden mit herzgesunden Wildtyptieren (WT) verglichen. (Mittelwert \pm SEM; $n=4$; * $p<0,05$ vs. WT, ** $p<0,01$ vs. WT).

Als Surrogatparameter der IL-6-Aktivität wurde das CRP herangezogen, da IL-6 die hepatische Produktion von Akute-Phase-Proteinen stimuliert. Dabei zeigte sich eine geringe, nicht signifikante Erhöhung des Plasmaspiegels verglichen mit den Wildtyptieren ($428,1 \pm 85,4$ ng/ml vs. $332,2 \pm 48,8$ ng/ml, $p=0,48$, Abb. 15).

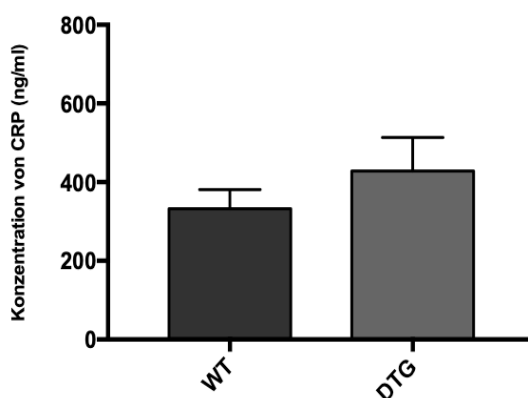


Abb. 15: Plasmakonzentration des C-reaktiven Proteins (CRP).

Die CRP-Plasmakonzentration im Cyclin T1/G α q-Mausmodell (DTG) und in Wildtyptieren (WT) wurden mittels ELISA ermittelt. (Mittelwert \pm SEM; $n=3$ (WT), $n=6$ (DTG)).

Des Weiteren wurden die IL-6-mRNA-Expression sowie das Aktivierungsniveau zweier IL-6 R-assoziierter Signaltransduktionswege, PI3K/Akt und JAK/STAT3, mittels Western Blot auf Proteinebene bestimmt. Die Herzgewebeanalysen zeigten für IL-6 eine geringe, nicht signifikante Erhöhung der Expression bei den doppelt transgenen Tieren verglichen mit Wildtyptieren ($1,4 \pm 0,24$ vs. $1,0 \pm 0,12$, $p=0,18$, Abb. 16A). Während sich für das Verhältnis des biologisch aktiven pAkt zum inaktiven Akt ebenfalls nur eine geringe, nicht signifikante Erhöhung nachweisen ließ ($1,3 \pm 0,12$ vs. $1,0 \pm 0,13$, $p=0,17$, Abb. 16B), ergaben die Analysen bezüglich des Verhältnisses von pSTAT3 zu STAT3 keine nachweisbaren Unterschiede zwischen den beiden Gruppen ($0,95 \pm 0,08$ vs. $0,99 \pm 0,1$, $p=0,72$, Abb. 16C).

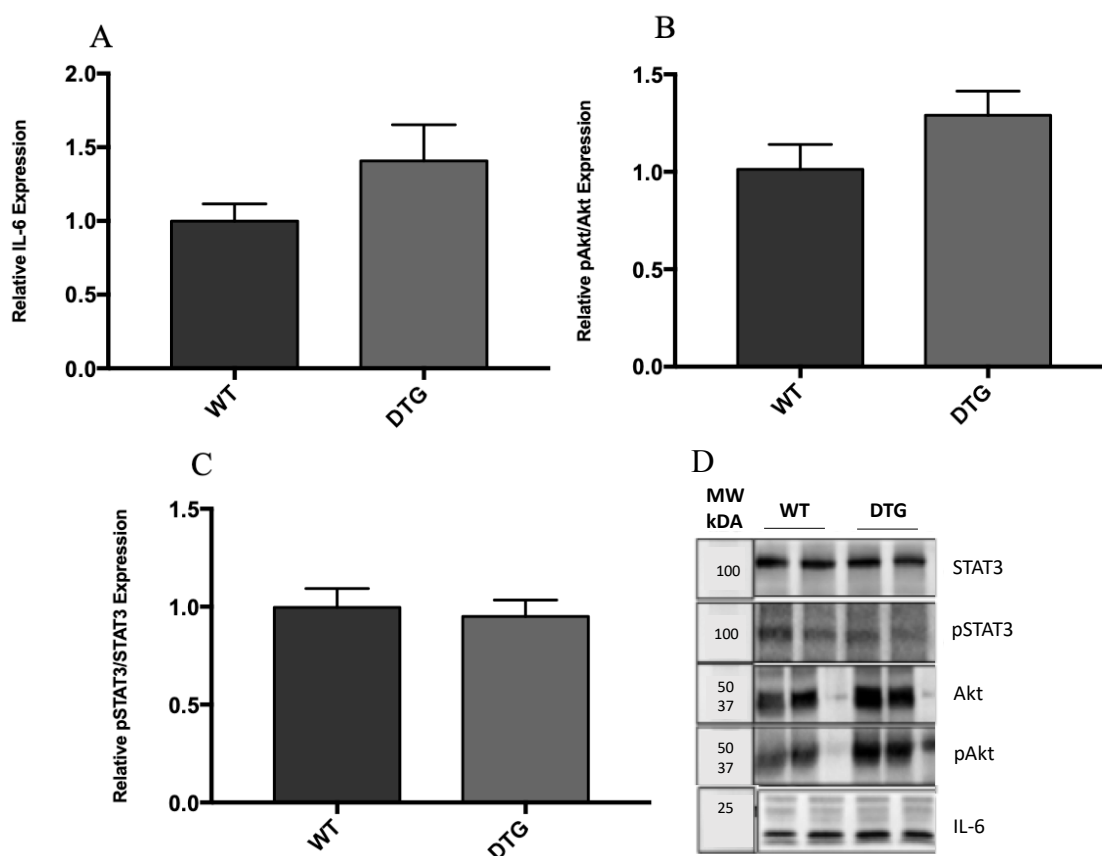


Abb. 16: Relative Proteinexpression von IL-6 und IL-6-assoziierten Signaltransduktionswegen im Herzgewebe doppelt transgener Cyclin T1/Gαq-Tiere im Vergleich zu Wildtyptieren.

Dargestellt sind die relativen Unterschiede in der IL-6- (A), pAkt/Akt- (B) und pSTAT3/STAT3- Proteinexpression (C) in CyclinT1/Gαq-Tieren (DTG) im Vergleich zu Wildtyptieren (WT) sowie repräsentative Western Blots (D). Die Werte wurden auf die Wildtypgruppe normalisiert. (Mittelwert±SEM; n=4).

3.2 Effekte der direkten IL-6 Rezeptorblockade auf das Herz

3.2.1 *In vivo* Analyse der Herzfunktion mittels Kleintier-MRT

Die Auswirkungen des IL-6 Rezeptorblockers MR16-1 und des korrespondierenden IgG auf die kardiale Funktion wurden mit Hilfe des Kleintier-MRT anhand der Parameter LVEF, LVFS, LVSV, LVM, LVEDV und LVESV evaluiert. Die Differenz zwischen der *Baseline*-Messung an Tag 0 und der Abschlussuntersuchung an Tag 7 (Tab. 5, siehe Anhang) wird nachfolgend als *delta* (Δ) gekennzeichnet.

Die Behandlung der Tiere mit MR16-1 hatte einen signifikanten Einfluss auf die Änderung der kardialen Pumpfunktion verglichen mit den Kontrolltieren: Sowohl für die LVEF ($-2,1 \pm 1,8$ % vs. $-10,7 \pm 2,6$ %, $p=0,014$, Abb. 17A) als auch für das *Fractional shortening* ($-0,6 \pm 1,8$ vs. $-9,0 \pm 3,5$ %, $p=0,031$, Abb. 17B), welches als Maß der myokardialen Kontraktilität gilt, konnte eine signifikant geringere Abnahme über die Zeit festgestellt werden als bei den Tieren, die NaCl erhielten. Durch die IgG-Gabe wurden ähnliche Änderungen (Δ LVEF: $-1,6 \pm 1,4$ % vs. $-10,7 \pm 2,6$ %, $p=0,004$, Abb. 17A bzw. Δ LVFS: $-1,8 \pm 1,8$ % vs. $-9,0 \pm 3,5$ %, $p=0,056$, Abb. 17B) erzielt. Darüber hinaus wiesen Rezeptorblocker-behandelte Tiere eine deutliche Zunahme des LVSV im Beobachtungszeitraum auf, die bei der NaCl-Gruppe niedriger ausfiel ($1,8 \pm 1,1$ μ l vs. $-3,8 \pm 2,8$ μ l, $p=0,053$, Abb. 17C). Die Gabe von IgG hatte auf diesen Parameter im Vergleich zur NaCl-Gruppe keinen relevanten Einfluss ($0,5 \pm 1,0$ μ l vs. $-3,8 \pm 2,8$ μ l, $p=0,1$, Abb. 17C).

Kardiale Hypertrophieprozesse wurden durch die MR16-1-Behandlung nicht relevant beeinflusst (Δ LVM: $2,5 \pm 2,0$ mg vs. $10,3 \pm 5,0$ mg, $p=0,11$, Abb. 17D). Die Administration von IgG hatte hingegen eine deutlich geringere Zunahme der LVM über den Untersuchungszeitraum verglichen mit der NaCl-Gruppe zur Folge ($1,3 \pm 2,0$ mg vs. $10,3 \pm 5,0$ mg, $p=0,066$, Abb. 17D).

Während die Behandlung mit MR16-1 weder auf das LVESV ($4,1 \pm 1,5$ μ l vs. $7,8 \pm 2,7$ μ l, $p=0,21$, Abb. 17E) noch das LVEDV ($1,8 \pm 1,5$ μ l vs. $4,0 \pm 5,0$ μ l, $p=0,62$, Abb. 17F) einen signifikanten Einfluss hatte, konnte im Rahmen der IgG-Injektion eine signifikant geringere Zunahme des LVESV im Vergleich zu NaCl-Gruppe beobachtet werden ($2,6 \pm 1,0$ μ l vs. $7,8 \pm 2,7$ μ l, $p=0,044$, Abb. 17E).

Für keinen der gemessenen Parameter konnten signifikante Unterschiede zwischen den Effekten der MR16-1- und der IgG-Gabe festgestellt werden (Abb. 17A-E).

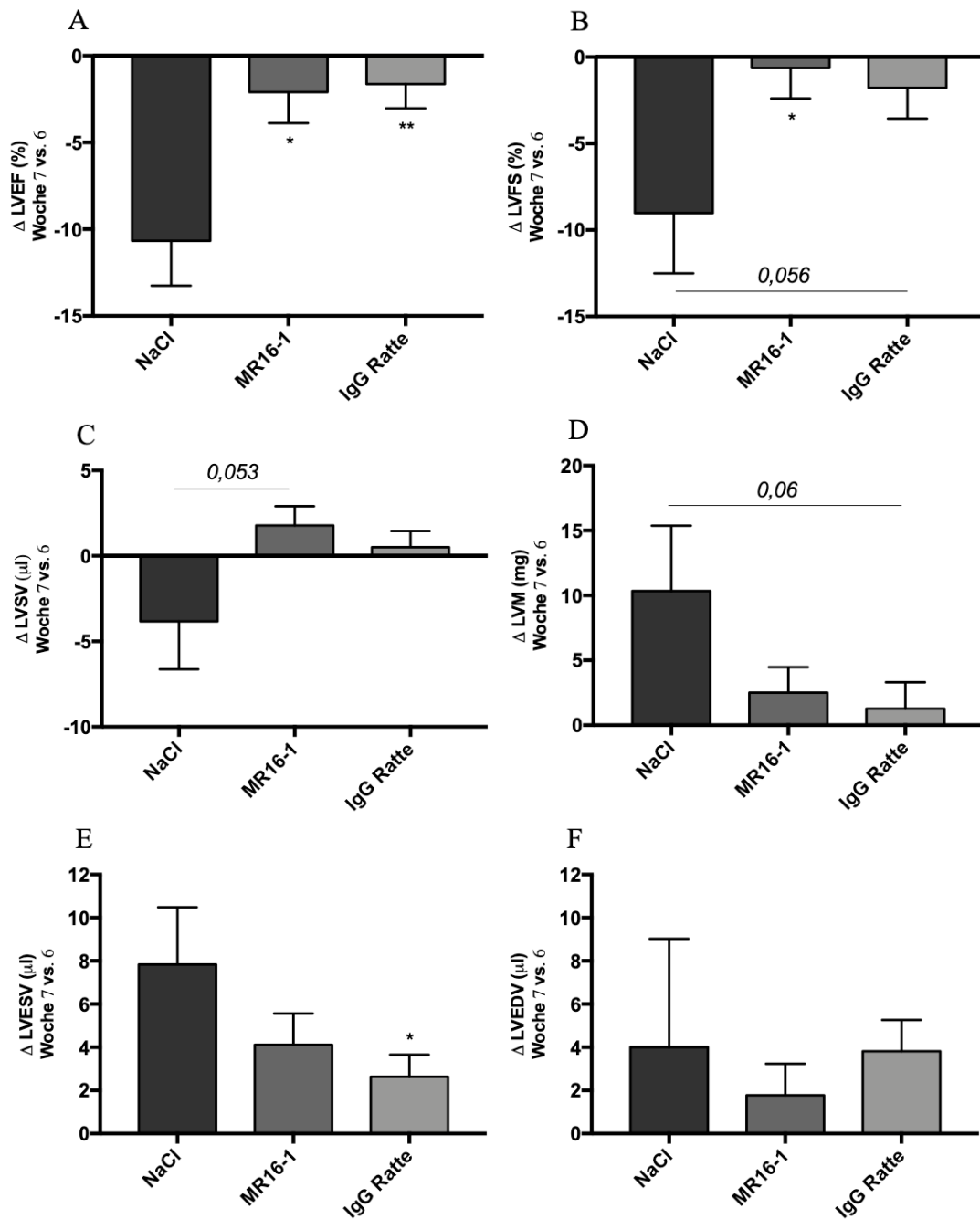


Abb. 17: Einfluss der IL-6 Rezeptorinhibition auf die Progression der HI.

Änderungen von LVEF (A), LVFS (B), LVSV (C), LVM (D), LVESV (E) und LVEDV (F) von der *Baseline*-Messung zur Abschlussuntersuchung nach NaCl-Gabe bzw. MR16-1- oder IgG-Behandlung. Die Werte der NaCl-Gruppe spiegeln den physiologischen Verlauf der Erkrankung wider. Die IgG-Gruppe diente als Ig-Isotypkontrolle. (Mittelwert±SEM; n=9-10 (MR16-1), n=10-11 (IgG Ratte), n=6 (NaCl); * p<0,05 vs. NaCl, ** p<0,01 vs. NaCl).

3.2.2 *In vitro* Analysen

3.2.2.1 Einfluss der IL-6 Rezeptorinhibition auf die Konzentration und Expression von IL-6 und IL-17A

Der Einfluss einer direkten IL-6 Rezeptorinhibition auf die Konzentration und Expression der Zytokine IL-6 und IL-17A wurde einerseits im Blutplasma mit Hilfe eines *Multiplex Bead-based Luminex Assays* und andererseits mittels PCR im Herzgewebe untersucht.

Im Blutplasma führte die Gabe von MR16-1 zu einem deutlichen Anstieg der IL-6-Konzentration verglichen mit der NaCl-Gruppe ($300,4 \pm 108$ % bezogen auf die NaCl-Gruppe, $p=0,08$, Abb. 18A). Im Gegensatz dazu hatte die Applikation von IgG eine signifikante Senkung der IL-6-Konzentration im Vergleich zur NaCl-Gabe zur Folge ($53,9 \pm 13,7$ % bezogen auf die NaCl-Gruppe, $p=0,004$). Dabei war ein signifikanter Unterschied in der IL-6-Konzentration zwischen der MR16-1- und der IgG-Behandlungsgruppe nachweisbar ($300,4 \pm 108$ % vs. $53,9 \pm 13,7$ % bezogen auf die NaCl-Gruppe, $p=0,04$).

Hinsichtlich der IL-17A-Konzentration war eine Abnahme in den MR16-1-behandelten Tieren zu verzeichnen ($39,2 \pm 3,0$ % bezogen auf die NaCl-Gruppe, $p<0,0001$, Abb. 18B). Auch hier führte die IgG-Gabe zu einer signifikanten Abnahme der Plasmakonzentration verglichen mit der NaCl-Gruppe ($41,3 \pm 6,0$ % bezogen auf die NaCl-Gruppe, $p<0,0001$).

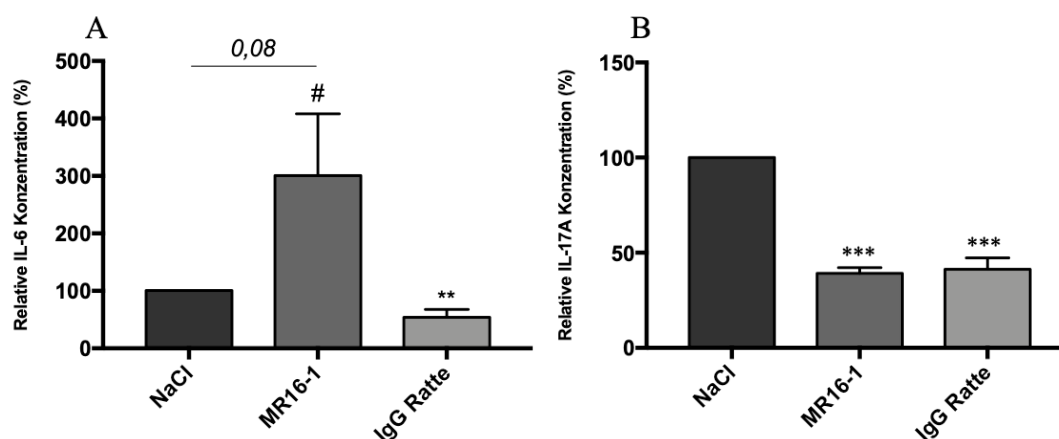


Abb. 18: Einfluss der IL-6 Rezeptorinhibition auf die Konzentration von IL-6 und IL-17A im Plasma herzinsuffizienter Mäuse.

Dargestellt ist die Konzentration von IL-6 (A) und IL-17A (B) im Blutplasma herzinsuffizienter Cyclin T1/Gαq-Mäuse nach Gabe von MR16-1 (IL-6-Rezeptorblocker), IgG Ratte (Isotypkontrolle) oder NaCl (Kontrollgruppe). Die Plasmakonzentrationen wurden mittels *Multiplex Bead-based Luminex Assay* bestimmt. Die Werte wurden auf die NaCl-Kontrollgruppe normalisiert. (Mittelwert±SEM; n=6-9; ** $p<0,01$ und *** $p<0,001$ vs. NaCl, # $p<0,05$ vs. IgG Ratte).

Auf mRNA-Ebene zeigten sich ähnliche Ergebnisse. Die MR16-1-Gruppe wies eine signifikant höhere IL-6-Expression auf als die NaCl- ($261,8 \pm 68,2$ % bezogen auf NaCl, $p=0,03$, Abb. 19A) und die IgG-Gruppe ($261,8 \pm 68,2$ % vs. $67,7 \pm 22,1$ %, $p=0,04$). Zugleich zeigte sich bei der IL-17A-Expression, genau wie schon bei der Plasmakonzentration, eine signifikante Senkung durch die Behandlung mit dem Rezeptorblocker ($23,1 \pm 7,4$ % bezogen auf NaCl, $p<0,0001$,

Abb. 19B). Zwischen der MR16-1- und der Ig-Isotypkontrollgruppe ergab sich für dieses Zytokin kein signifikanter Unterschied.

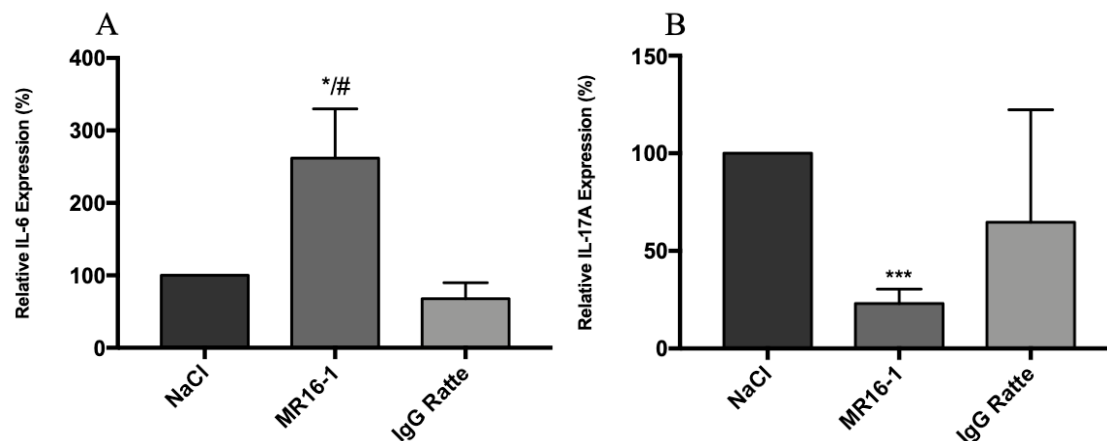


Abb. 19: Einfluss der IL-6 Rezeptorblockade auf die Genexpression der Interleukine IL-6 und IL-17A in herzinsuffizienten Mäusen.

Dargestellt ist die mRNA-Expression von IL-6 (A) und IL-17A (B) im Herzgewebe von Cyclin T1/Gαq-Mäusen nach Gabe von MR16-1 (IL-6-Rezeptorblocker), IgG Ratte (Isotypkontrolle) oder NaCl (Kontrollgruppe). Die Bestimmung erfolgte mittels *Real-Time* PCR. GAPDH fungierte als Referenzgen. Die Werte wurden auf die NaCl-Kontrollgruppe normalisiert. (Mittelwert±SEM; n=4-5; * p<0,05 vs. NaCl, *** p<0,0001 vs. NaCl, #p<0,05 vs. IgG).

Die CRP-Plasmakonzentration, Surrogatparameter der IL-6-Aktivität, wurde weder durch die Behandlung mit MR16-1 noch durch die IgG-Isotypkontrolle relevant beeinflusst (Daten nicht gezeigt).

3.2.2.2 Effekte der IL-6 Rezeptorblockade auf HI-assoziierte Biomarker

Im Blutplasma der Versuchstiere wurden zusätzlich die Konzentrationen der HI-assoziierten Biomarker Gal-1, Gal-3 und NT-proBNP mittels ELISA untersucht.

Für Gal-1 konnten sowohl in Folge der Behandlung mit MR16-1 (15951±417 pg/ml vs. 12226±139 pg/ml, p<0,0001, Abb. 20A) als auch nach IgG-Gabe (15913±1330 pg/ml vs. 12226±139 pg/ml, p=0,01) signifikant höhere Plasmakonzentrationen im Vergleich zur NaCl-Gruppe nachgewiesen werden. Die zwischen beiden Gruppen beobachteten Unterschiede waren dabei nicht signifikant. In Bezug auf die Plasmakonzentration von Gal-3 wurde zwischen den Versuchsgruppen kein signifikanter Unterschied festgestellt (Daten nicht gezeigt). NT-proBNP wurde durch die Behandlung mit MR16-1 sowohl im Vergleich zu der NaCl-Gruppe (3831±147 pg/ml vs. 7248±1098 pg/ml, p=0,004, Abb. 20B) als auch der IgG-Gruppe (3831±147 pg/ml vs. 5600±537 pg/ml, p=0,008) signifikant im Plasma gesenkt. Unterschiede zwischen der IgG- und der NaCl-Gruppe bestanden hinsichtlich der Konzentration des natriuretischen Peptids nicht.

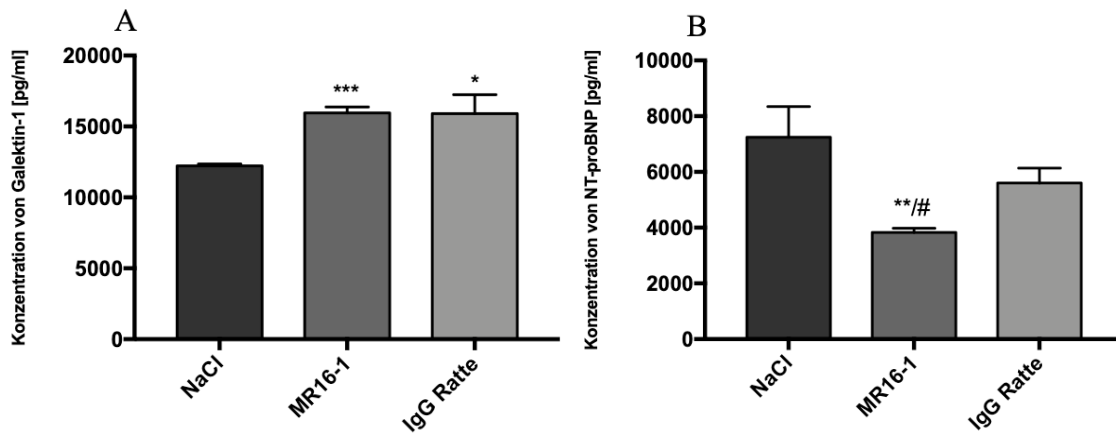


Abb. 20: Einfluss der IL-6 Rezeptorblockade auf die Blutplasmakonzentrationen HI-assoziiertes Biomarker in Cyclin T1/Gαq-Mäusen.

Vergleich der Plasmakonzentrationen von Gal-1 (A) und NT-proBNP (B) MR16-1 (IL-6-Rezeptorblocker)-, IgG Ratte (Isotypkontrolle)- oder NaCl (Kontrollgruppe)-behandelter Tiere. Die Bestimmung der Konzentrationen erfolgte mittels ELISA (Mittelwert±SEM; n=6-10; * p<0,05, ** p<0,01 und *** p<0,001 vs. NaCl, # p<0,05 vs. IgG Ratte).

Zusätzlich erfolgte die Analyse der ET-1- und BNP-Expressionsmuster im Herzgewebe.

Während die Behandlung mit MR16-1 keinen relevanten Einfluss auf die ET-1-Expression hatte, konnte in der IgG-Gruppe eine signifikante Abnahme der mRNA-Kopiezahl nachgewiesen werden (14,1±2,1 Transkripte vs. 25,4±3,7 Transkripte, p=0,027, Abb. 21A). Der Unterschied zwischen der MR16-1- und der Ig-Gruppe war dabei signifikant (14,1±2,1 Transkripte vs. 28,9±4,9 Transkripte, p=0,031). In Bezug auf die BNP-Expression ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen (Abb. 21B).

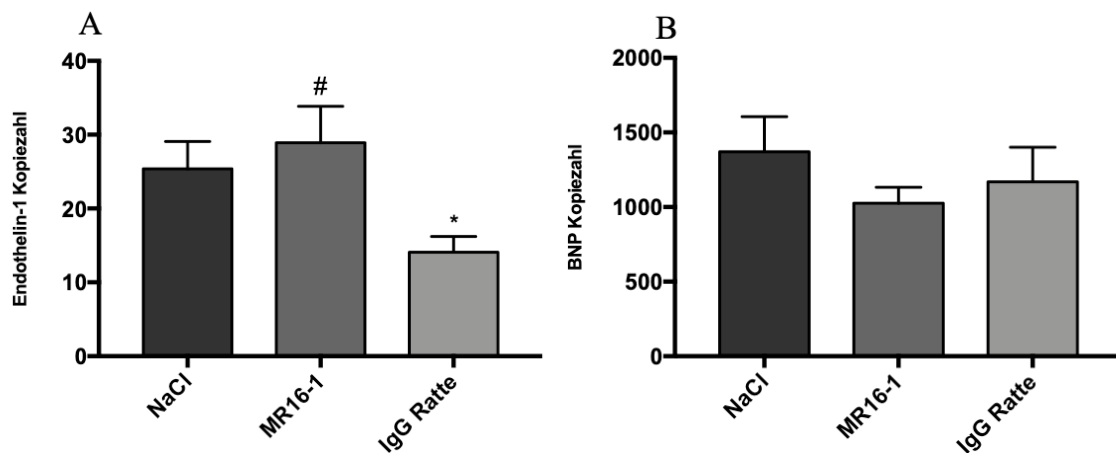


Abb. 21: Einfluss der direkten IL-6 Rezeptorinhibition auf die Genexpression HI-assoziiertes Biomarker im Herzgewebe von Cyclin T1/Gαq-Mäusen.

Die Expression von ET-1 (A) und BNP (B) wurde nach Gabe von MR16-1 (IL-6-Rezeptorblocker), IgG Ratte (Isotypkontrolle) oder NaCl (Kontrollgruppe) mittels des NanoString nCounter® Systems bestimmt. Angegeben ist die absolute Anzahl der mRNA-Transkripte. Als Referenz fungierten fünf Haushaltsgene (β-Aktin, B2m, EEF1G, GAPDH und Rp19). (Mittelwert±SEM; n=5-7; * p<0,05 vs. NaCl, # p<0,05 vs. IgG).

3.2.2.3 Auswirkungen der IL-6 Rezeptorinhibition auf die Konzentration und Expression weiterer ausgewählter inflammatorischer Zytokine

Um den Einfluss einer direkten IL-6 Rezeptorinhibition auf ausgewählte weitere inflammatorische Zytokine zu untersuchen, erfolgte die Analyse von GM-CSF, IL-1 β , IL-18, TNF- α , IL-22 und IL-23 (pro-inflammatorisch) und IL-10 (anti-inflammatorisch) mittels *Multiplex Bead-based Luminex Assay* im Blutplasma sowie mit Hilfe einer quantitativen *Real-Time* PCR im Herzgewebe.

Die Quantifizierung im Blutplasma ergab für GM-CSF (MR16-1: 41,0 \pm 14,2 % bezogen auf die NaCl-Gruppe, p=0,0003; IgG: 55,5 \pm 11,5 % bezogen auf die NaCl-Gruppe, p=0,0009, Abb. 22A), Interferon- γ (MR16-1: 65,8 \pm 4,4 % bezogen auf die NaCl-Gruppe, p<0,0001; IgG: 59,7 \pm 6,8 % bezogen auf die NaCl-Gruppe, p<0,0001, Abb. 22B) und IL-1 β (MR16-1: 29,1 \pm 9,2 % bezogen auf die NaCl-Gruppe, p=0,0002; IgG: 42,7 \pm 12,5 % bezogen auf die NaCl-Gruppe, p=0,004, Abb. 22C) in allen Versuchsgruppen signifikant niedrigere Spiegel verglichen mit der NaCl-Gruppe.

Die Behandlung mit MR16-1 senkt signifikant die IL-18- (79,1 \pm 4,9 % bezogen auf die NaCl-Gruppe, p=0,0006, Abb. 22D) und die IL-10-Konzentrationen (59,3 \pm 10,4 % bezogen auf die NaCl-Gruppe, p=0,0029, Abb. 22E) im Blutplasma, verglichen mit der NaCl-Injektion. Die Gabe von IgG hat hingegen keine Effekte.

Für die Zytokine TNF- α , IL-22 und IL-23 ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (Daten nicht gezeigt).

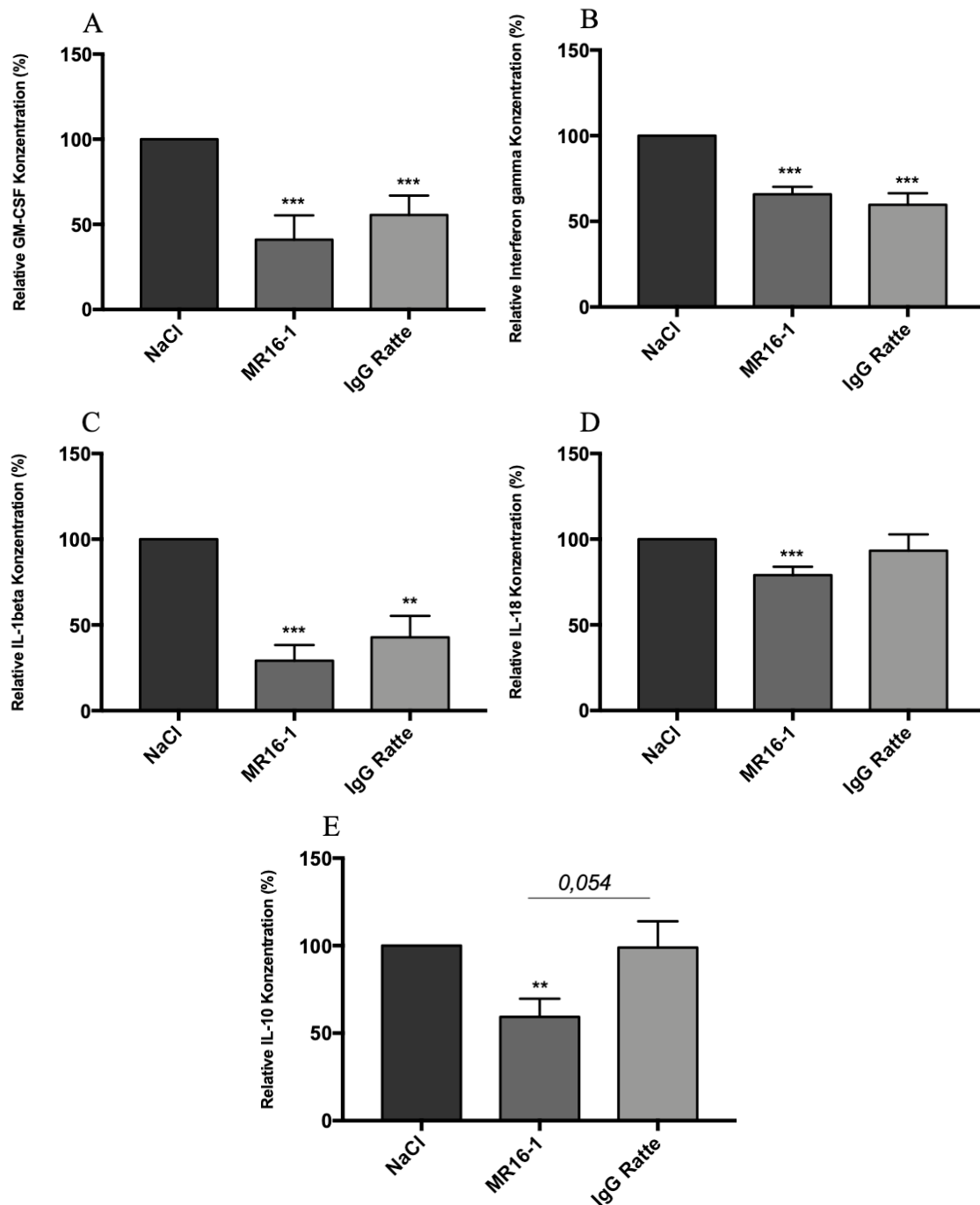


Abb. 22: Einfluss der IL-6 Rezeptorblockade auf die Konzentration ausgewählter inflammatorischer Zytokine im Blutplasma herzinsuffizienter Mäuse.

Die Plasmakonzentrationen der Zytokine GM-CSF (A), IFN γ (B), IL-1 β (C), IL-18 (D) und IL-10 (E) wurden nach Gabe von MR16-1 (IL-6-Rezeptorblocker), IgG Ratte (Isotypkontrolle) oder NaCl (Kontrollgruppe) mittels *Multiplex Bead-based Luminex Assay* bestimmt. Die Werte wurden auf die NaCl-Kontrollgruppe normalisiert. (Mittelwert \pm SEM; n= 4-10; ** p<0,01 und *** p<0,001 vs. NaCl).

Verglichen mit der NaCl-Gruppe führte sowohl die Behandlung mit MR16-1 (28,2 \pm 13,8 % bezogen auf die NaCl-Gruppe, p=0,007) als auch mit dem korrespondierenden IgG (21,1 \pm 4,7 % bezogen auf die NaCl-Gruppe, p<0,0001) zu einer signifikanten Abnahme der TNF- α -Expression (Abb. 23A).

Bezüglich IL-1 β war die Reduktion der Expression nicht signifikant. In der MR16-1-Gruppe konnte dennoch eine deutliche Abnahme im Vergleich zur NaCl-Gruppe beobachtet werden

(60,3±15,1 % bezogen auf die NaCl-Gruppe, p=0,07, Abb. 23B). Für beide Zytokine ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der MR16-1- und der Ig-Isotypkontrollgruppe.

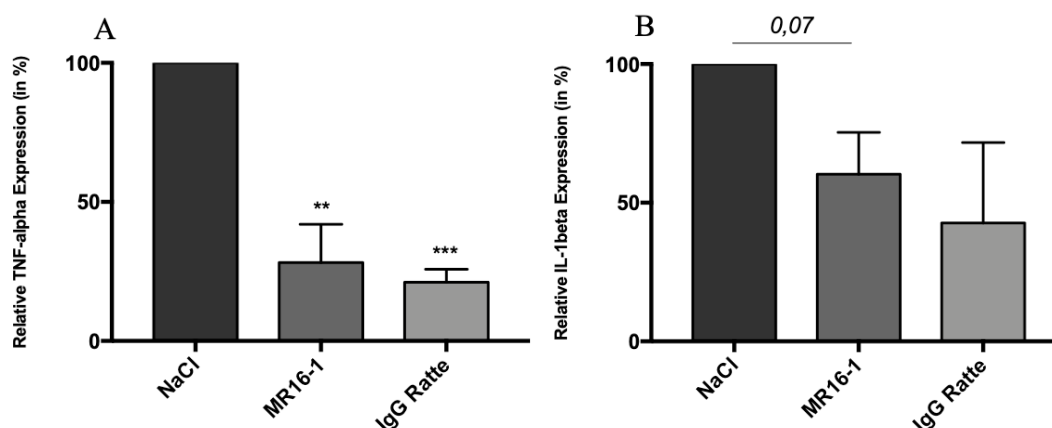


Abb. 23: Einfluss der IL-6 Rezeptorblockade auf die Genexpression ausgewählter inflammatorischer Zytokine im Herzgewebe von Cyclin T1/G α q-Mäusen.

Die mRNA-Expression der Zytokine TNF- α (A) und IL-1 β (B) wurde im Myokardgewebe nach Gabe von MR16-1 (IL-6-Rezeptorblocker), IgG Ratte (Isotypkontrolle) oder NaCl (Kontrollgruppe) mittels *Real-Time* PCR bestimmt. GAPDH fungierte als Referenzgen und die Werte wurden auf die NaCl-Kontrollgruppe normalisiert. (Mittelwert \pm SEM; n=3-4; ** p<0,01 und *** p<0,001 vs. NaCl).

3.2.2.4 Einfluss der IL-6 Rezeptorblockade auf das kardiale Remodeling

Die an den Kardiomyozyten durchgeführten Hypertrophieanalysen ergaben bezüglich der zellulären Querschnittsfläche keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen (Abb. 35, Anhang).

Eine zusätzlich durchgeführte Bestimmung des Fibrosegrades ergab ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (Abb. 36, Anhang).

Um den Einfluss einer IL-6 Rezeptorblockade auf Fibrose- und Remodeling-Prozesse näher zu untersuchen, erfolgte eine Genexpressionsanalyse typischer Marker im Herzgewebe. Diese ergab eine deutlich niedrigere Col1 α 1-Expression in der MR16-1- (66,6±15,2 % bezogen auf die NaCl-Gruppe, p=0,058) und der korrespondierenden IgG-Gruppe (27,1±5,2 % vs. 100 %, p<0,0001) als in der NaCl-Kontrolle (Abb. 24A). Bezüglich der Col3 α 1-Expression konnten hingegen keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Auch für MMP-2 und -9 ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (Abb. 24C,D). Hinsichtlich der TGF- β -Expression zeigte sich in der MR16-1-Gruppe eine signifikante Reduktion verglichen mit der NaCl-Gruppe (79,5±8,1 % vs. 100 %, p=0,036, Abb. 24B). Für keinen der gemessenen Parameter waren die Unterschiede zwischen den Effekten einer MR16-1-Behandlung und einer Ig-Administration signifikant.

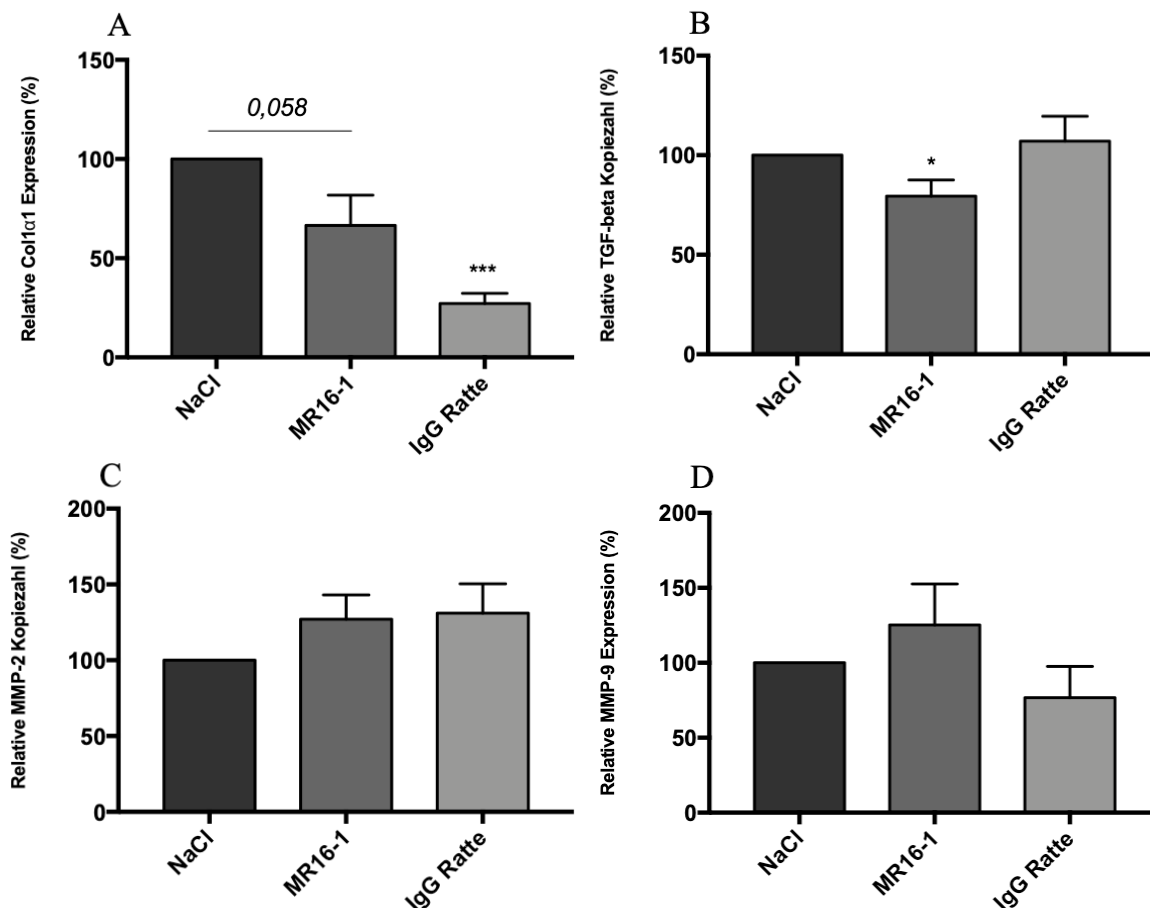


Abb. 24: Einfluss der IL-6 Rezeptorinhibition auf die Expression Fibrose-assoziiierter Marker im Herzgewebe von Cyclin T1/Gαq-Mäusen.

Die Abbildung zeigt die mRNA-Expression von Col1α1 (A), TGF-β (B), MMP-2 (C) und MMP-9 (D) MR16-1 (IL-6-Rezeptorblocker)-, IgG Ratte (Isotypkontrolle)- oder NaCl (Kontrollgruppe)-behandelter Tiere. Die absolute Kopiezahl der TGF-β-, MMP-2- und MMP-9-Transkripte wurde mittels des NanoString nCounter® System bestimmt; als Referenz dienten fünf Haushaltsgene (β-Aktin, B2m, EEF1G, GAPDH und Rpl19). Die Kollagenexpression wurde mittels *Real-Time* PCR gemessen; GAPDH fungierte als Referenzgen. Alle Werte wurden auf die NaCl-Kontrollgruppe normalisiert. (Mittelwert±SEM; n=4-6; * p<0,05 und *** p<0,001 vs. NaCl).

3.2.2.5 Effekte der IL-6 Rezeptorinhibition auf IL-6-assoziierte Signaltransduktionswege und Mitglieder der IL-6-Typ Zytokinfamilie

Um auf Proteinebene die Auswirkungen einer IL-6 Rezeptorinhibition auf das Aktivierungsniveau IL-6-assoziiierter Signaltransduktionswege zu untersuchen, wurden Western Blot Analysen mit Proteinproben aus dem Herzgewebe durchgeführt.

Die Behandlung mit MR16-1 führte zu keiner signifikanten Änderung des Verhältnisses von pSTAT3 zu STAT3 (Abb. 25A). Ebenso wurde keine Beeinflussung von SOCS3, Zielgen des Transkriptionsfaktors STAT3 und Teil einer negativen *Feedback*-Schleife im JAK/STAT3-Signalweg, verglichen mit der NaCl-Gruppe beobachtet (Daten nicht gezeigt). Darüber hinaus kam es unter dem Rezeptorblocker zu einem signifikanten Anstieg des Verhältnisses pAkt/Akt im Vergleich zur NaCl-Gruppe (247,0±37,7 % bezogen auf die NaCl-Gruppe, p=0,027, Abb. 25B). Während die IgG-Gabe keinen Einfluss auf das Verhältnis pSTAT3/STAT3 hatte (119,0±57,9 % bezogen auf die NaCl-Gruppe, p=0,73, Abb. 25A), führte sie zu einer

signifikanten Erhöhung von pAkt/Akt ($327,3 \pm 55,6$ % bezogen auf die NaCl-Gruppe, $p=0,018$, Abb. 25B) verglichen mit der NaCl-Kontrolle. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der MR16-1- und Ig-Isotypkontrollgruppe (Abb. 25A,B).

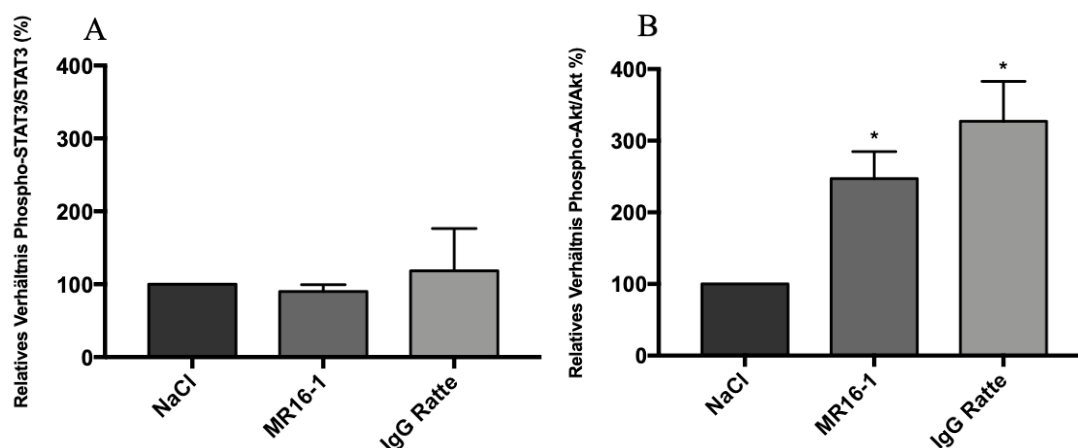


Abb. 25: Einfluss der IL-6 Rezeptorblockade auf IL-6-assoziierte Signaltransduktionswege im Myokardgewebe herzinsuffizienter Mäuse.

Dargestellt sind die relativen Unterschiede in der pSTAT3/STAT3- (A) und pAkt/Akt-Proteinexpression (B), die mittels Western Blot gemessen wurden. Die Werte wurden auf die NaCl-Gruppe normalisiert; als Referenz dienten 2 Haushaltsgene (GAPDH und β -Aktin). (Mittelwert \pm SEM; $n=4-5$; * $p<0,05$ vs. NaCl).

Da die Signalwege der IL-6 Rezeptorkaskade nur geringfügig durch die Rezeptorblockade beeinflusst wurden, erfolgten zusätzlich *Real-Time* PCR-Analysen weiterer Mitglieder der IL-6-Typ Zytokinfamilie. LIF und CT-1 üben ähnliche biologische Effekte wie IL-6 aus, da sie Liganden von gp130 sind und dieselben Signalwege wie IL-6 aktivieren können. Die Analysen dienten daher der Untersuchung einer möglichen kompensatorischen Hochregulation dieser Mediatoren im Herzgewebe unter IL-6 Inhibition, was den Effekt der IL-6 Rezeptorblockade abschwächen könnte.

Die Analysen ergaben eine signifikant höhere LIF-Expression in der MR16-1-Gruppe als in der NaCl-Kontrolle ($150,5 \pm 12,3$ % bezogen auf die NaCl-Gruppe, $p=0,015$, Abb. 26A). Die Applikation von IgG hatte hingegen keinen signifikanten Einfluss auf den LIF-Spiegel ($158,6 \pm 49,6$ % bezogen auf die NaCl-Gruppe, $p=0,36$). Zwischen der MR16-1- und der Ig-Isotypkontrollgruppe ergab sich kein signifikanter Unterschied.

Für CT-1 waren keine relevanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen nachweisbar (Abb. 26B).

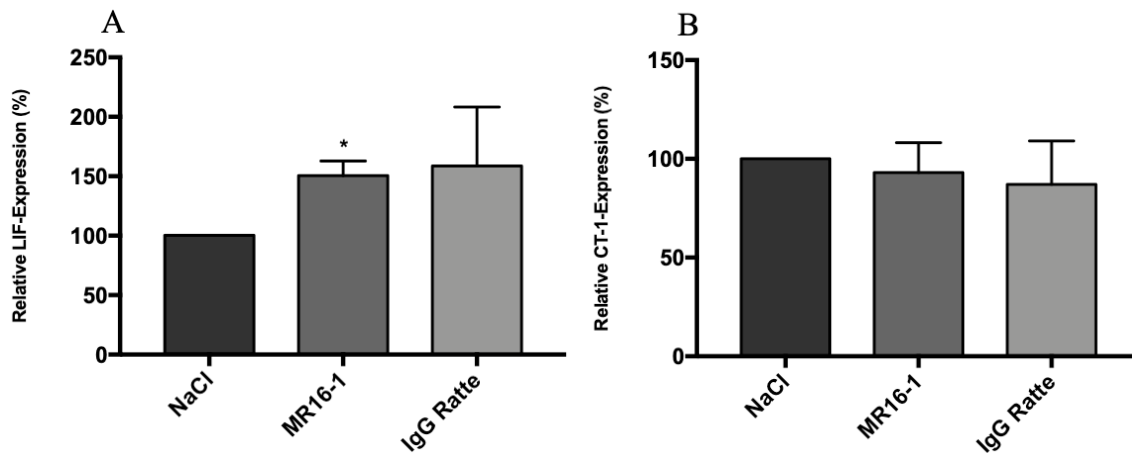


Abb. 26: Einfluss der IL-6 Rezeptorblockade auf die Genexpression von Mitgliedern der IL-6 Typ Zytokinfamilie im Myokardgewebe herzinsuffizienter Mäuse.

Dargestellt ist die mRNA-Expression des Leukämiehemmenden Faktors (LIF) (A) und von Cardiothropin-1 (CT-1) (B), die mittels *Real-Time* PCR im Herzgewebe MR16-1 (IL-6-Rezeptorblocker)-, IgG Ratte (Isotypkontrolle)- oder NaCl (Kontrollgruppe)-behandelter Tiere gemessen wurde. GAPDH fungierte als Referenzgen und die Werte wurden auf die NaCl-Kontrollgruppe normalisiert. (Mittelwert \pm SEM; n=4; * p<0,05 vs. NaCl).

3.2.2.6 Immunhistochemische Analysen zum Nachweis des IL-6 Rezeptorblockers MR16-1 im Herzgewebe

Der Nachweis des IL-6 Rezeptorblockers MR16-1 im Herzgewebe erfolgte mittels einer spezifischen immunhistochemischen Färbung. Die detektierten Signale zeigten eine homogene Verteilung des Rezeptorblockers im Herzgewebe (Abb. 27).

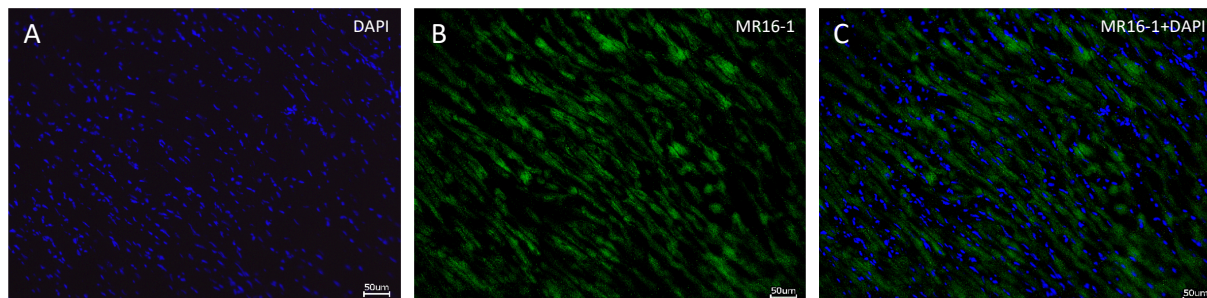


Abb. 27: Immunhistochemischer Nachweis des IL-6 Rezeptor Antikörpers MR16-1.

Repräsentative Gewebeschnitte des linken Ventrikels nach MR16-1-Injektion. Markierung der Zellkerne mittels DAPI (blau) (A); grüne Fluoreszenz des IL-6R Antikörpers Tocilizumab Klon MR16-1 durch den sekundären Antikörper Alexa Fluor 488 (B); Kombinationsaufnahme mit Überlagerung der blauen und grünen Signale (C). Vergrößerung: 20 x.

3.3 Effekte einer indirekten IL-6 Inhibition auf das Herz

Um die Auswirkungen einer IL-6 Inhibition auf die HI differenziert evaluieren zu können, ohne dabei den IL-6R sowie die assoziierten Signalwege und ggf. damit verbundene kardioprotektive Effekte gänzlich zu blockieren, wurden in einem zweiten, parallel erfolgten Versuchsansatz neutralisierende anti-IL-17A Antikörper zur indirekten IL-6 Blockade verabreicht.

3.3.1 Einfluss von anti-IL-17A Antikörpern auf die Herzfunktion

Sowohl die Gabe von anti-IL-17A Antikörpern ($-3,7 \pm 1,3$ % vs. $-10,7 \pm 2,6$ %, $p=0,02$, Abb. 28A) als auch die Injektion der korrespondierenden IgG-Isotypkontrolle ($-2,3 \pm 2,5$ % vs. $-10,7 \pm 2,6$ %, $p=0,044$) hatten eine signifikant geringere Abnahme der LVEF über den Beobachtungszeitraum zur Folge als die Applikation von NaCl. Für die übrigen Parameter (Δ LVM, Δ LVFS, Δ LVSV, Δ LVEDV und Δ LVESV) ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (Abb. 28B-F).

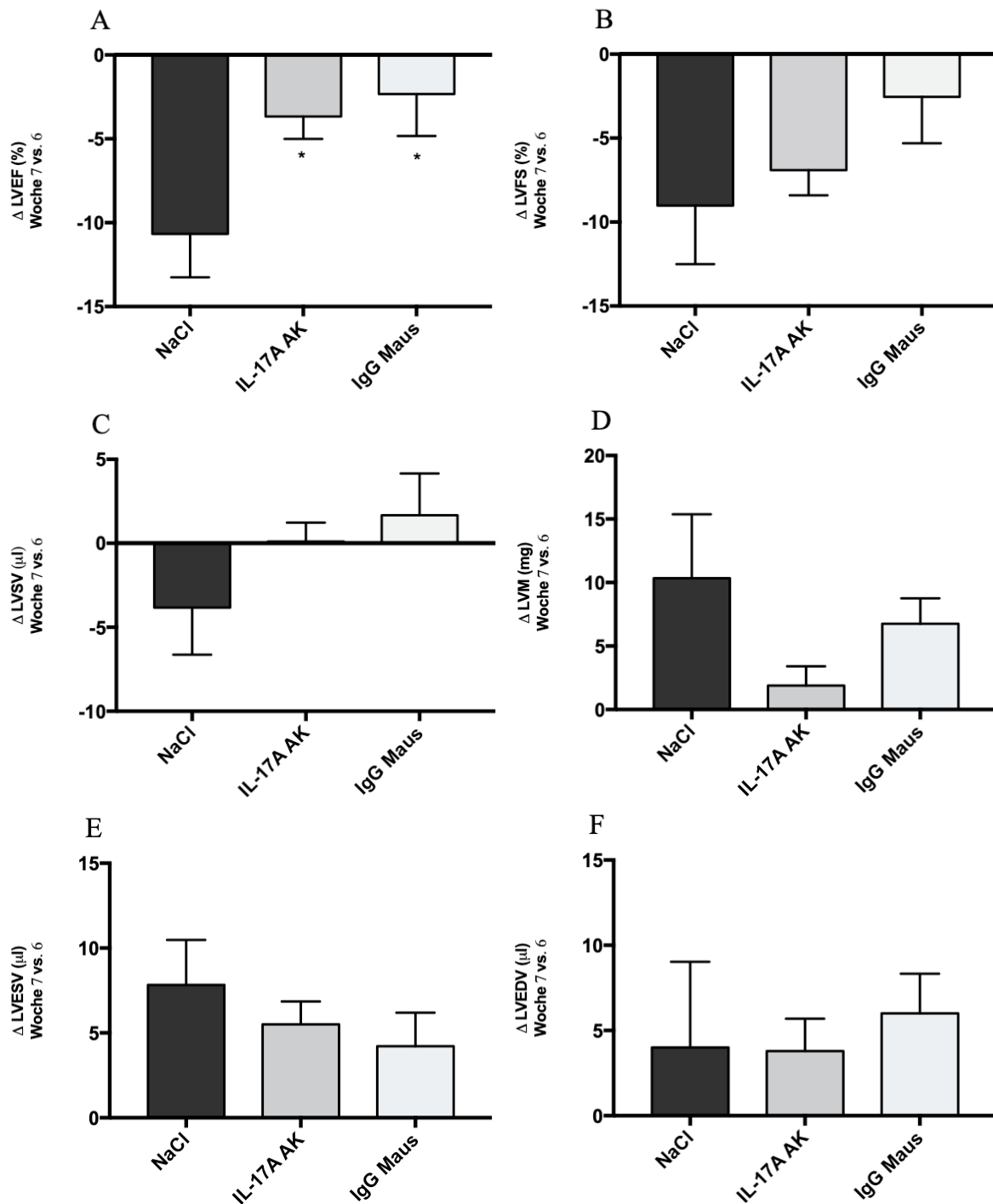


Abb. 28: Einfluss von anti-IL-17A Antikörpern auf die Progression der HI. Änderungen von LVEF (A), LVFS (B), LVSV (C), LVM (D), LVEDV (E) und LVESV (F) zwischen der *Baseline*-Messung und der Abschlussuntersuchung. Die Werte der NaCl-Gruppe spiegeln den physiologischen Verlauf der Erkrankung wider. Die IgG-Gruppe diente als Ig-Isotypkontrolle. (Mittelwert±SEM; n=9-10 (anti-IL-17A AK), n=8-9 (IgG Maus), n=6 (NaCl); * p<0,05 vs. NaCl).

3.3.2 Effekte von anti-IL-17A Antikörpern auf *in vitro* Parameter

Die Auswirkungen der Gabe neutralisierender anti-IL-17A Antikörper wurden laborchemisch in Blutplasma- und Herzgewebeproben analysiert.

3.3.2.1 Einfluss auf die Zytokine IL-17A und IL-6

Die Gabe von anti-IL-17A Antikörpern führte zu keiner signifikanten Änderung der Konzentrationen von IL-6 und IL-17A im Blutplasma verglichen mit der NaCl-Gruppe (Abb. 29A,B). Während die Applikation von IgG einen deutlichen Anstieg der IL-6-Plasmakonzentration nach sich zog ($342,3 \pm 134$ % bezogen auf die NaCl-Gruppe, $p=0,054$, Abb. 29A), wurde die Konzentration von IL-17A nicht relevant beeinflusst (Abb. 29B).

Auf die CRP-Plasmakonzentration, Surrogatparameter der IL-6-Aktivität, zeigten weder die anti-IL-17A Antikörper noch die IgG-Isotypkontrolle relevante Effekte verglichen mit der NaCl-Gruppe (Daten nicht gezeigt).

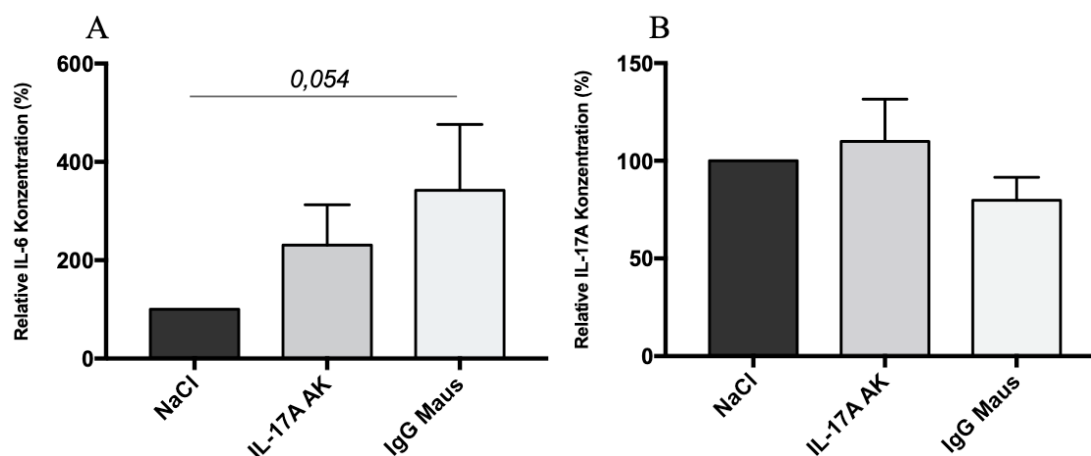


Abb. 29: Einfluss von anti-IL-17A Antikörpern auf die Konzentration von IL-6 und IL-17A im Blutplasma herzinsuffizienter Mäuse.

Dargestellt sind die Blutplasmakonzentrationen von IL-6 (A) und IL-17A (B) nach Gabe von neutralisierenden anti-IL-17A Antikörpern, IgG Maus (Isotypkontrolle) oder NaCl (Kontrollgruppe). Die Werte wurden mittels *Multiplex Bead-based Luminex Assay* bestimmt und auf die NaCl-Kontrollgruppe normalisiert. Mit NaCl behandelte Tiere dienten der Kontrolle; die IgG-Gruppe als Ig-Isotypkontrolle. (Mittelwert \pm SEM; n=5-7).

Während die neutralisierenden anti-IL-17A Antikörper keinen signifikanten Einfluss auf die IL-17A-Konzentration im Blutplasma hatten, zeigte die Behandlung eine signifikante Senkung der mRNA-Expression verglichen mit der NaCl-Gruppe ($13,6 \pm 1,7$ % bezogen auf die NaCl-Kontrolle, $p < 0,001$, Abb. 30A). Auch die Administration von IgG führte zu einer signifikanten IL-17A-mRNA-Expressionsabnahme im Vergleich zur NaCl-Gabe ($25,9 \pm 13,4$ % bezogen auf die NaCl-Gruppe, $p < 0,001$). Die Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen waren dabei nicht signifikant. In Bezug auf die IL-6-mRNA-Expression konnten hingegen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden (Abb. 30B).

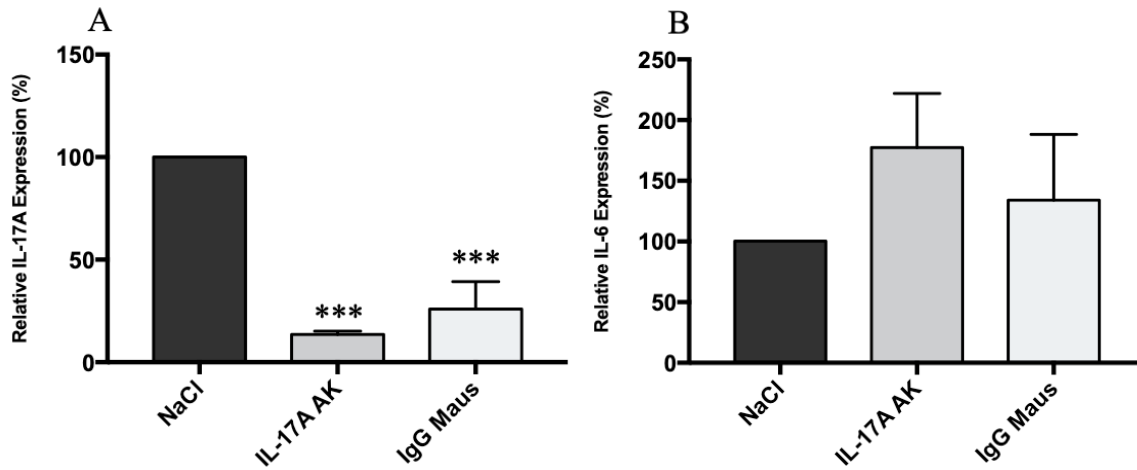


Abb. 30: Einfluss von anti-IL-17A Antikörpern auf die mRNA-Expression der Interleukine IL-6 und IL-17A im Myokardgewebe herzinsuffizienter Mäuse.

Dargestellt ist die mRNA-Expression von IL-6 (A) und IL-17A (B) nach Gabe von anti-IL-17A Antikörpern, IgG Maus (Isotypkontrolle) oder NaCl (Kontrollgruppe). Die Bestimmung erfolgte mittels *Real-Time* PCR. GAPDH fungierte als Referenzgen und die Werte wurden auf die NaCl-Kontrollgruppe normalisiert. (Mittelwert±SEM; n=3-4; *** p<0,001 vs. NaCl).

3.3.2.2 Einfluss auf IL-6-assoziierte Signalwege und IL-6-Typ Zytokinfamilienmitglieder

Die Applikation von anti-IL-17A Antikörpern führte im Herzgewebe zu einer signifikanten Aktivitätsminderung der STAT3- (24,3±3,8 % bezogen auf die NaCl-Kontrolle, p<0,0001, Abb. 31A) und Akt-Signalwege (60,5±8,9 % bezogen auf die NaCl-Kontrolle, p=0,02, Abb. 31B) im Vergleich zur NaCl-Injektion. Auch die IgG-Gabe führte zu einer signifikanten Abnahme des Verhältnisses pSTAT3/STAT3 (31,9±3,7 % bezogen auf die NaCl-Kontrolle, p<0,0001, Abb. 31A) verglichen mit der NaCl-Injektion. Der Akt-Signalweg blieb durch die Administration von IgG hingegen unbeeinflusst.

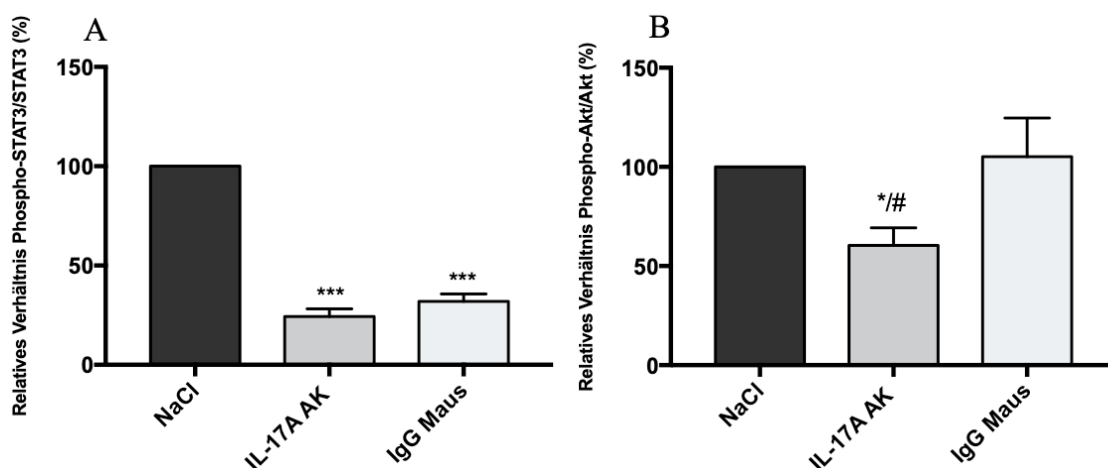


Abb. 31: Einfluss von anti-IL-17A Antikörpern auf IL-6-assoziierte Signaltransduktionswege im Myokardgewebe herzinsuffizienter Mäuse. Mittels Western Blot auf Proteinebene bestimmte Verhältnisse von pSTAT3 zu STAT3 (A) und von pAkt zu Akt (B) in anti-IL-17A Antikörper-, IgG Maus (Isotypkontrolle)- oder NaCl (Kontrolle)-behandelten Tieren. Die Werte wurden auf die NaCl-Kontrolle normalisiert. (Mittelwert±SEM; n=4-6; * p<0,05, *** p<0,001 vs. NaCl, # p<0,05 vs. IgG)

Um zu untersuchen, welche Auswirkungen die Gabe von anti-IL-17A Antikörpern auf andere IL-6-Typ Zytokinfamilienmitglieder hat, wurde das Genexpressionsmuster von LIF und CT-1 im Herzgewebe bestimmt. Es zeigte sich, dass sowohl nach anti-IL-17A Antikörper- (LIF: $73,5 \pm 6,9$ % verglichen mit der NaCl-Gruppe, $p=0,02$; CT-1: $53,8 \pm 12,0$ % vs. 100 %, $p=0,006$) als auch nach IgG-Gabe (LIF: $42,1 \pm 7,6$ % verglichen mit der NaCl-Gruppe $p=0,002$; CT-1: $53,7 \pm 9,4$ % vs. 100 %, $p=0,003$) die Expression verglichen mit denen der NaCl-Kontrollgruppe signifikant reduziert waren (Abb. 32A,B).

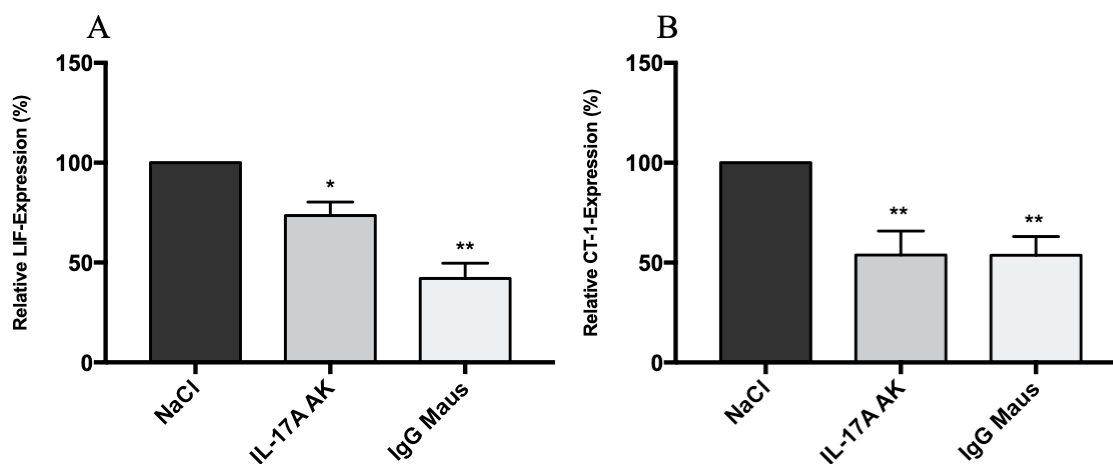


Abb. 32: Einfluss von anti-IL-17A Antikörpern auf IL-6-Typ Zytokinfamilienmitglieder im Myokardgewebe herzinsuffizienter Mäuse.

Die Abbildung zeigt die mRNA-Expression des Leukämiehemmenden Faktors (LIF) (A) und von Cardiothropin-1 (CT-1) (B), welche nach Gabe von neutralisierenden anti-IL-17A Antikörpern, IgG Maus (Isotypkontrolle) oder NaCl (Kontrollgruppe) mittels *Real-Time* PCR im Herzgewebe gemessen wurden; GAPDH fungierte als Referenzgen. Die Werte wurden auf die NaCl-Kontrollgruppe normalisiert. (Mittelwert \pm SEM; $n=3-6$; * $p<0,05$ und ** $p<0,01$ vs. NaCl).

3.3.2.3 Einfluss einer IL-17A Inhibition auf die Plasmaspiegel ausgewählter Zytokine

Während die Gabe von anti-IL-17A Antikörpern keinen signifikanten Einfluss auf die Plasmaspiegel von TNF- α und IL-1 β im Vergleich zu einer NaCl-Administration hatte, führte die Applikation der IgG-Isotypkontrolle zu einem signifikanten Anstieg von TNF- α ($178,1 \pm 30,6$ % bezogen auf die NaCl-Kontrolle, $p=0,018$, Abb. 33A,B). Ein Effekt auf die Plasmakonzentration von IL-1 β war hingegen nicht nachweisbar. Bezüglich GM-CSF wurde keine Beeinflussung durch die Gabe von anti-IL-17A Antikörpern festgestellt. Die Injektion von IgG führte hingegen zu einer signifikanten Senkung des Faktors verglichen mit der NaCl-Gabe ($87,6 \pm 5,1$ % bezogen auf die NaCl-Gruppe, $p=0,023$, Daten nicht gezeigt). Für die Plasmakonzentrationen von IL-18, IL-22, IL-23 und IFN γ wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen beobachtet (Daten nicht gezeigt).

Hinsichtlich der Expression hatte die Gabe der anti-IL-17A Antikörper einen inhibierenden Effekt auf TNF- α und IL-1 β (TNF- α : $21,6 \pm 15,4$ % bezogen auf die NaCl-Kontrolle, $p=0,007$;

IL-1 β : 22,4 \pm 8,9 % bezogen auf die NaCl-Kontrolle, p=0,0007, Abb. 33C,D). Auch in der IgG-Gruppe ergab sich eine signifikante Senkung der TNF- α -Expression verglichen mit der NaCl-Kontrollgruppe (10,6 \pm 2,7 % bezogen auf die NaCl-Gruppe, p<0,0001). Dieser Effekt konnte für IL-1 β nicht beobachtet werden. Hier ergab sich verglichen mit der NaCl-Gruppe eine nur geringe Abnahme der IL-1 β -Expression, die signifikant über der der anti-IL-17A Antikörper-behandelten Tiere lag (66,4 \pm 15,3 % vs. 44,0 \pm 17,7 %, p=0,048). Das anti-inflammatorische Zytokin IL-10 wurde weder durch die Behandlung mit anti-IL-17A Antikörpern noch durch die Injektion von IgG signifikant beeinflusst (Daten nicht gezeigt).

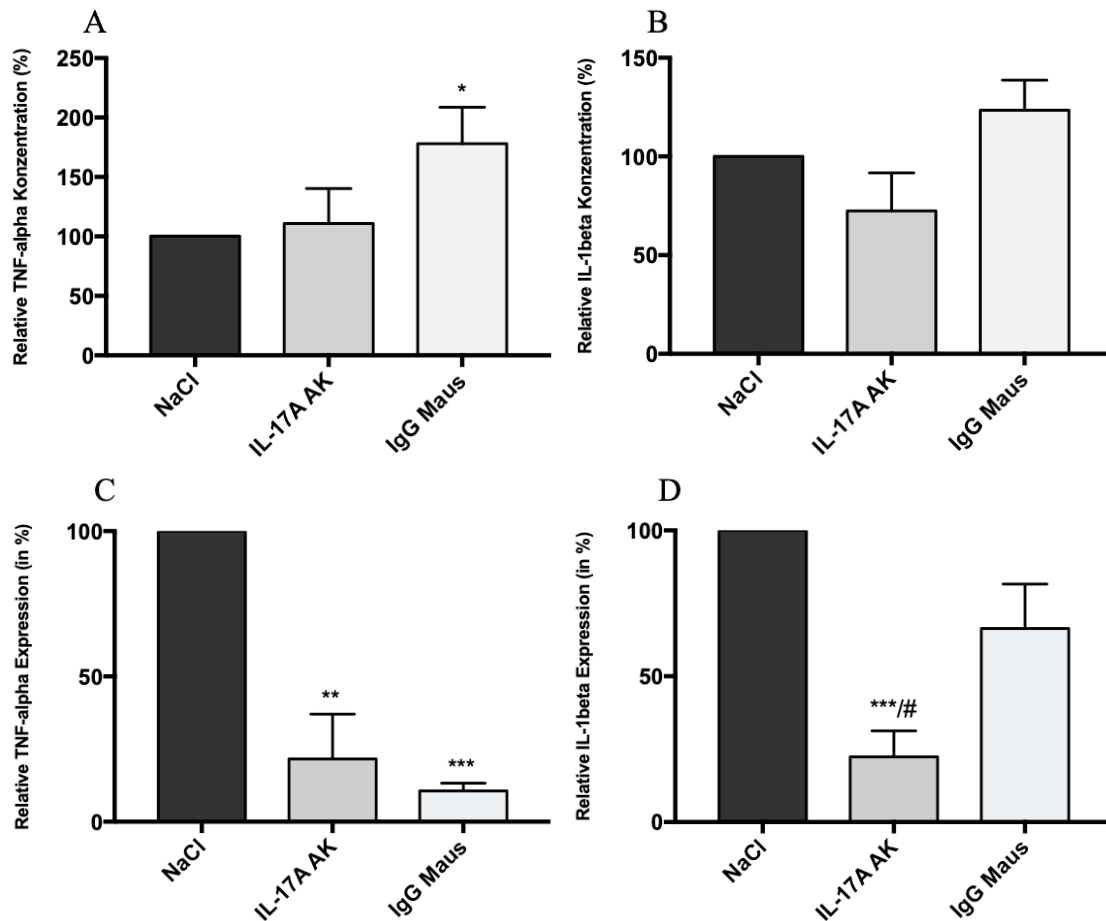


Abb. 33: Einfluss von anti-IL-17A Antikörpern auf die Plasmakonzentration und mRNA-Expression von TNF- α und IL-1beta in herzinsuffizienten Mäusen.

Die Blutplasmakonzentrationen der Zytokine TNF- α (A) und IL-1beta (B) wurden mittels *Multiplex Bead-based Luminex Assay* nach Gabe von neutralisierenden anti-IL-17A Antikörpern, IgG Maus (Isotypkontrolle) oder NaCl (Kontrollgruppe) bestimmt. Die Quantifizierung der mRNA-Expression von TNF- α (C) und IL-1beta (D) erfolgte mittels *Real-Time PCR*; GAPDH fungierte als Referenzgen. Die Werte wurden auf die NaCl-Kontrollgruppe normalisiert. (Mittelwert \pm SEM; n= 4-10 für die Plasmaanalyse, n=3-4 für die Expressionsanalyse; * p<0,05, ** p<0,01 und *** p<0,001 vs. NaCl, # p<0,05 vs. IgG).

3.3.2.4 Effekte auf die Konzentration HI-assoziiierter Biomarker

Um die Effekte einer anti-IL-17A Antikörper-Gabe auf HI-assoziierte Biomarker zu evaluieren, wurden die Plasmakonzentrationen von Gal-1, Gal-3 und NT-proBNP bestimmt. Während die Behandlung mit anti-IL-17A Antikörpern eine signifikante Steigerung der Gal-1-Konzentration im Plasma verglichen mit einer NaCl- (13931 ± 291 pg/ml vs. 12226 ± 139 pg/ml, $p=0,0002$, Abb. 34A) und IgG-Gabe (13931 ± 291 pg/ml vs. 12275 ± 122 pg/ml, $p=0,0004$) zur Folge hatte, konnten sowohl für Gal-3 (Daten nicht gezeigt) als auch für NT-proBNP (Abb. 34B) keine relevanten Unterschiede in den Plasmakonzentrationen zwischen den Gruppen nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde die Expression von BNP und ET-1 im Herzgewebe bestimmt. Für diese Parameter konnten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

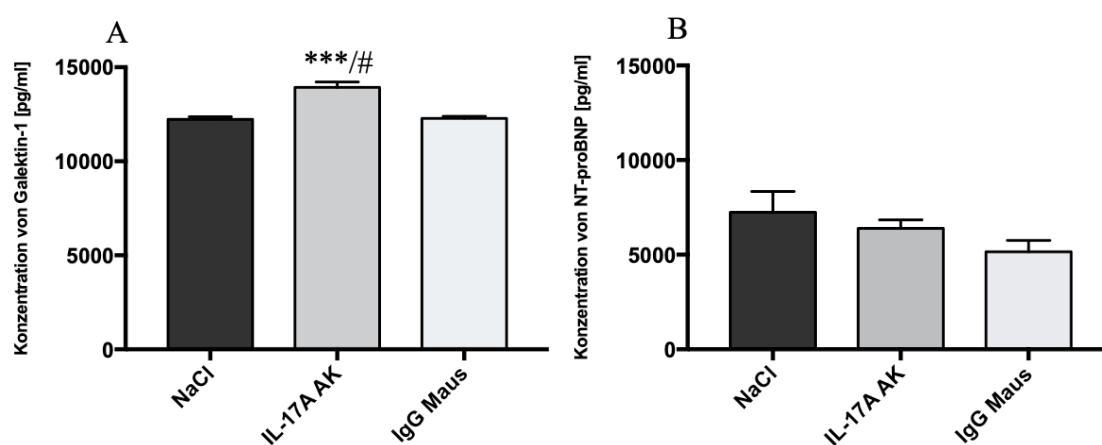


Abb. 34: Einfluss von anti-IL-17A Antikörpern auf die Konzentration HI-assoziiierter Biomarker im Blutplasma herzinsuffizienter Mäuse.

Die Plasmakonzentrationen von Gal-1 (A), Gal-3 (B) und NT-proBNP (C) wurden mittels ELISA nach Gabe von neutralisierenden anti-IL-17A Antikörpern, IgG Maus (Isotypkontrolle) oder NaCl (Kontrollgruppe) ermittelt. (Mittelwert \pm SEM; $n=4-7$; *** $p<0,001$ vs. NaCl, # $p<0,05$ vs. IgG).

3.3.2.5 Einfluss auf das kardiale Remodeling

Die durchgeführten Hypertrophieanalysen ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen (siehe Anhang, Abb. 35). Die zusätzlich durchgeführte Bestimmung des Fibrosegrades (Anhang: Abb. 36) und die Genexpressionsanalyse für die Parameter MMP-2, MMP-9, TGF- β , Col1 α 1 und Col31 α 1 im Herzgewebe (Daten nicht gezeigt) zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen auf.

4. Diskussion

4.1 Charakterisierung des murinen HI-Modells hinsichtlich der Rollen von IL-6 und IL-17A sowie der krankheitsspezifischen Morbidität

In der vorliegenden Arbeit kam das transgene Herzinsuffizienzmodell Cyclin T1/Gαq zum Einsatz. Erstmals wurde das für die HI typische, durch einen Anstieg inflammatorischer Botenstoffe charakterisierte Zytokinmilieu des Tiermodells genauer betrachtet. Die Analysen ergaben, dass bei den transgenen Tieren im Vergleich zum Wildtyp die Blutplasmaspiegel von IL-17A 1,8-fach ($p=0,039$) und die von IL-6 5-fach ($p=0,002$) erhöht sind. Die durchgeführten Herzgewebeanalysen ergaben nicht signifikant erhöhte IL-6-Proteinspiegel. Das als Surrogatparameter der IL-6-Aktivität zusätzlich bestimmte CRP war in den transgenen Mäusen verglichen mit den Wildtyptieren nur geringfügig erhöht. Möglicherweise hätte eine Bestimmung des hochsensitiven (hs)-CRP eine deutlichere Erhöhung nachweisen können. Die beiden IL-6-assoziierten Signaltransduktionswege PI3K/Akt und JAK/STAT3 waren im Mausmodell nicht stärker aktiviert als bei den Wildtyptieren. Diese Ergebnisse bestätigen, dass sich die Tiere noch in einem frühen Stadium der Erkrankung befanden. Für das niedrige IL-6-Aktivitätsniveau zu Beginn inflammatorischer Erkrankungen wird der im Folgenden erläuterte Regulationsmechanismus verantwortlich gemacht. Da nahezu alle Körperzellen auf ihrer Oberfläche gp130-Moleküle exprimieren und durch IL-6 über die lösliche IL-6 Rezeptorform via Transsignaling stimuliert werden können, stehen zur Vermeidung einer unkontrollierten Aktivierung der sich anschließenden Signalwege verschiedene regulierende Mechanismen zur Verfügung. Der Biochemiker Rose-John postulierte, dass das Konzentrationsverhältnis von IL-6, dessen löslichen Rezeptor und der Anzahl physiologischerweise im Blut vorkommenden sgp130-Moleküle, die den IL-6/sIL-6R Komplex binden und neutralisieren können, eine entscheidende Rolle spielt (149). Während im gesunden Organismus der IL-6-Plasmaspiegel nahe der Detektionsgrenze liegt, kann er bei schweren Entzündungsgeschehen millionenfach ansteigen (202). Die Plasmaspiegel von sIL-6R und sgp130 liegen hingegen bereits unter physiologischen Bedingungen 1000-fach höher als die von IL-6 und steigen im Rahmen von Entzündungsgeschehen nur rund 2,5-fach an (203). Dementsprechend kann IL-6 bei niedriger Plasmakonzentration zwar an seine löslichen Rezeptoren binden, der Komplex wird jedoch vom quantitativ deutlich überwiegenden sgp130 neutralisiert. Erst wenn die Zytokinspiegel die von sIL-6R und sgp130 übersteigen, kann IL-6 seine Wirkung systematisch entfalten. In der vorliegenden Arbeit wurde bewusst ein früher Untersuchungszeitpunkt gewählt, da zu diesem Zeitpunkt die IL-6-Plasmaspiegel verglichen mit den Wildtyptieren bereits deutlich (5-fach) erhöht waren. Zugleich sollte einer überschießenden IL-6-Aktivität jedoch noch möglichst frühzeitig entgegengewirkt werden, um negativen Effekten von Beginn an vorzubeugen.

Savvatis et al. untersuchten an einem virusinduzierten Myokarditis-Mausmodell ebenfalls die Auswirkungen einer IL-6 Rezeptorblockade auf die Herzfunktion und konnten signifikante kardioprotektive Effekte nachweisen (193). 7 Tage nach der Infektion wurde im Herzgewebe der infizierten Tiere fluoreszenzmikroskopisch ein 3-fach höherer IL-6-Proteinspiegel als bei den gesunden Kontrollindividuen nachgewiesen und darüber hinaus eine signifikante Aktivierung des JAK/STAT3-Signalweges festgestellt. In zukünftigen Versuchen wären Untersuchungen zu einem späteren Zeitpunkt mit noch höheren IL-6-Plasmaspiegeln denkbar, um den Einfluss der IL-6 Inhibition im Rahmen einer höheren IL-6-Aktivität zu untersuchen. Die Effekte könnten unter diesen Bedingungen noch stärker ausfallen. Die Versuchsdauer ist dann jedoch durch die deutlich reduzierte Lebenserwartung der Tiere limitiert und es ist damit zu rechnen, dass einige bereits vor Abschluss des Versuches versterben.

Durch die Verwendung des Cyclin T1/Gαq-Tiermodells ergaben sich für die *in vivo* Bestimmung der kardialen Funktion mittels MRT zusätzliche Herausforderungen. Die ausgeprägte HI-assoziierte Morbidität der Tiere führte zu einer deutlichen Verlängerung der Datenaquisitionsdauer sowie einer Reduktion der Bildqualität und folglich erschwerten Auswertung des Bildmaterials. Neben einer rechtsdominanten Dilatation der Herzkammern fielen Wandbewegungsstörungen und pulmonale Veränderungen auf, die als Pleuraergüsse im Rahmen der HI gewertet werden können. Zudem bestand eine intermittierende Bradyarrhythmie. Diese Veränderungen wurden auch im Zuge von früheren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe nachgewiesen (197).

4.2 Effekte einer direkten IL-6 Rezeptorblockade

Im Rahmen dieses Projektes konnte nachgewiesen werden, dass die intraperitoneale Gabe von MR16-1 positive Effekte auf die Herzfunktion hat. Sieben Tage nach Injektion war die in der Rezeptorblocker-Gruppe gemessene Abnahme der LVEF signifikant geringer als in der NaCl-Gruppe ($-2,1 \pm 1,8$ % vs. $-10,7 \pm 2,6$ %, $p=0,014$). Auch für das LVFS konnte in der MR16-1-Gruppe eine signifikant geringere Abnahme über die Zeit verglichen mit der NaCl-Kontrollgruppe beobachtet werden ($-0,6 \pm 1,8$ % vs. $-9,0 \pm 3,5$ %, $p=0,031$). Das LVFS ist dabei ein Maß für die linksventrikuläre Kontraktilität. Es vergleicht den linksventrikulären Durchmesser in der Enddiastole mit dem der Endsystole. Nach MR16-1-Gabe zeigte sich zudem eine deutliche Zunahme des LVSV um $1,8 \pm 1,1$ μ l verglichen mit der NaCl-Injektion ($-3,8 \pm 2,8$ μ l, $p=0,053$). Die IL-6 Rezeptorblockade konnte demnach den Krankheitsverlauf der transgenen Tiere verglichen mit einer NaCl-Injektion nachweislich positiv beeinflussen. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit denen von Savvatis et al., die zeigen konnten, dass die Gabe von MR16-1 bei Mäusen, die eine Coxsackievirus B3-induzierte Myokarditis aufweisen, zu

einer signifikanten Besserung der systolischen linksventrikulären Funktion verglichen mit unbehandelten infizierten Tieren führt (193).

Anhand der *in vitro* erhobenen Daten konnten ebenfalls Hinweise für eine kardioprotektive Wirkung von MR16-1 gesammelt werden. Nach Verabreichung des Rezeptorblockers zeigten sich signifikant niedrigere Plasmakonzentrationen des Herzinsuffizienzmarkers NT-proBNP als in der NaCl-Gruppe ($p=0,004$). Diese Veränderung deutet auf eine signifikante Besserung der kardialen Funktion durch die Gabe von MR16-1 hin.

Auch auf die Konzentration des HI-assoziierten Biomarkers Gal-1 hatte die Injektion von MR16-1 einen positiven Effekt. In unserer Studie führte sie zu einem signifikanten, 1,3-fachen Anstieg dessen Plasmakonzentration verglichen mit einer NaCl-Gabe ($p<0,0001$). Das Lektin wird mit der Modulation inflammatorischer Prozesse sowie der Angiogenese und Wundheilung in Verbindung gebracht (86). Seropian et al. haben gezeigt, dass es postinfarziell im Herzgewebe zu einem signifikanten Anstieg der Gal-1-Expression kommt. In Gal-1-defizienten Mäusen wurde dagegen eine stärkere Einschränkung der Pumpfunktion mit einer stärkeren ventrikulären Dilatation und vermehrtem Remodeling beobachtet, die mit einer Aktivierung von Entzündungsprozessen einherging (87). Daher wird Gal-1 im geschädigten Herzen ein kardioprotektiver Effekt zugeschrieben. Neben dem Anstieg von Gal-1 kam es in der vorliegenden Untersuchung passend dazu, wie bereits beschrieben, zu einer signifikant geringeren Abnahme der LVEF über die Zeit verglichen mit der NaCl-Gruppe.

Auf Gal-3, das mit kardiodepressiven Remodeling-Prozessen im Anschluss an einen MI assoziiert ist und eine pro-fibrotische Wirkung zu haben scheint (204), hatte der Rezeptorblocker keinen signifikanten Einfluss. Hinsichtlich der Expression von extrazellulären Matrixproteinen, Kollagenen und TGF- β , die ebenfalls eine relevante Rolle im Remodeling-Prozess spielen, ergaben sich dagegen relevante Änderungen unter der Behandlung. Es zeigte sich, neben einer deutlich niedrigeren Col1 α 1-mRNA-Expression in der MR16-1- verglichen mit der NaCl-Gruppe ($p=0,058$), ein signifikant niedrigeres TGF- β ($p=0,036$). Letztgenanntes Zytokin gilt als wichtiger Modulator von Remodeling-Prozessen. Es wird aufgrund seiner pleiotropen, zum Teil widersprüchlichen zellulären Effekte kontrovers diskutiert. Studien weisen auf eine Beteiligung an Fibrose- und Hypertrophieprozessen im Anschluss an eine kardiale Schädigung hin (205). Auf die Expression von Col3 α 1 sowie MMP-2 und -9 hatte die MR16-1-Gabe dagegen keinen signifikanten Einfluss verglichen mit der NaCl-Injektion. MMP und deren Inhibitoren kontrollieren die Degradation von Kollagenen und spielen somit eine zentrale Rolle im ECM-Metabolismus. Es scheint ein Zusammenhang zwischen hohen MMP-Konzentrationen im Herzen, einem verstärkten Kollagenstoffwechsel und vermehrtem kardialen Remodeling zu bestehen (206), der die kardiale Funktion negativ beeinflusst. Die an Herzgewebeschnitten durchgeführten Hypertrophieanalysen ergaben, dass die Behandlung mit

dem Rezeptorblocker keinen signifikanten Effekt auf die Größe der Kardiomyozyten verglichen mit einer NaCl-Injektion hatte. Passend dazu ließ sich MR-tomographisch in der MR16-1-Gruppe während des Beobachtungszeitraums keine signifikante Änderung der LVM verglichen mit der NaCl-Kontrollgruppe nachweisen. Auf den Fibrosegrad des Herzgewebes, der anhand Sirius-Rot-gefärbter Gewebeschnitte beurteilt wurde, hatte der Rezeptorblocker ebenfalls keinen signifikanten Einfluss. Da der Fibrosegrad im Mausmodell insgesamt nur gering war, wurden leichtgradige Effekte möglicherweise übersehen. Während einige der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Parameter auf eine anti-fibrotische Wirkung des IL-6 Rezeptorblockers hindeuten, wurden andere kaum beeinflusst. Diese Ergebnisse stehen in Kontrast zu denen von Kobara et al. (207). Die Arbeitsgruppe konnte in einem MI-Mausmodell eine signifikante Reduktion der MMP-2-Aktivität sowie eine Abnahme der Hypertrophie und interstitiellen Fibrose 28 Tage nach ischämischem Ereignis nachweisen. Diese Veränderungen gingen mit einer Besserung der kontraktilen Funktion der Herzen und der Überlebensrate der Tiere verglichen mit der Kontrollgruppe einher. Das Versuchsprotokoll sah eine einmalige intraperitoneale Injektion von 500 µl MR16-1 im direkten Anschluss an das ischämische Ereignis vor. Das gewählte Modell (ischämisches Akutereignis vs. chronische HI), der Beobachtungszeitraum (28 vs. 7 Tage) und der Behandlungszeitpunkt (unmittelbar nach dem gesetzten Akutereignis ohne weitere Vorschädigung vs. vorbestehende Fibrose) unterscheiden sich grundlegend voneinander, sodass die abweichenden Ergebnisse auf das unterschiedliche Studiendesign zurückzuführen sein könnten.

Weiterhin ist es vorstellbar, dass die Dosis des verabreichten IL-6 Rezeptorblockers bei den Cyclin T1/Gαq-Tieren nicht ausreichend war, um auf alle untersuchten Parameter nachweisbare Effekte zu erzielen. Die laborchemischen Analysen konnten im Mausmodell 5-fach höhere IL-6-Plasmaspiegel als bei den Wildtyp-Tieren nachweisen. Da MR16-1 ein kompetitiver Rezeptorblocker ist, könnte der Antikörper aufgrund seiner dosisabhängigen Wirkungsweise bei hohen IL-6-Plasmaspiegeln von der Bindungsstelle am Rezeptor verdrängt werden. Okazaki et al. zeigten, dass MR16-1 die Proliferation IL-6-sensibler Zellen hemmt, der inhibitorische Effekt bei steigender IL-6-Konzentration jedoch abgeschwächt wird (208). In der vorliegenden Arbeit wurde sich bei der Dosisfindung an der Studie von Savvatis et al. orientiert, die durch die Behandlung eine signifikante Besserung der Herzfunktion erzielten (193). Leider wurde die IL-6-Plasmakonzentration in der genannten Arbeit nicht untersucht, sodass ein direkter Vergleich nicht möglich ist.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführte Zytokinuntersuchung ergab darüber hinaus, dass die Plasmakonzentration von IL-6 durch die Gabe des kompetitiven Rezeptorblockers MR16-1 im Vergleich zur NaCl-Injektion um das 3-fache ansteigt ($p=0,08$). Ursächlich sind vermutlich ein vermindertes Binden des Zytokins an seinen Rezeptor und eine

dadurch verlangsamte Eliminationszeit (209). Auch in anderen Studien konnte ein Anstieg des IL-6 Plasmaspiegels durch die Gabe des IL-6 Rezeptorblockers beobachtet werden und wurde von den Autoren als entsprechender Nachweis einer erfolgreichen IL-6 Inhibition gewertet (210-212). Anhand des CRPs, das als Surrogatparameter der IL-6-Aktivierung bestimmt wurde, konnte keine inhibierende Beeinflussung durch MR16-1 festgestellt werden, da dieser Parameter im Mausmodell verglichen mit den Wildtyptieren nur geringfügig erhöht war. Kleveland et al. gelang bei MI-Patienten der Nachweis, dass die einmalige Injektion des IL-6 Rezeptorblockers Tocilizumab zu einer Reduktion des hsCRP-Spiegels um mehr als das 2-fache verglichen mit der Placebo-Gruppe führt (213). Wie bereits zuvor diskutiert, sollte in zukünftigen Arbeiten daher das sensitivere hsCRP bestimmt werden. Des Weiteren ließ sich in der vorliegenden Arbeit eine 2,6-fache Zunahme der IL-6-mRNA-Expression im Herzgewebe feststellen, die verglichen mit der NaCl-Gruppe signifikant war ($p=0,03$). Diese Beobachtung könnte auf eine kompensatorische Hochregulierung des Zytokins im Rahmen der Rezeptorblockade zurückzuführen sein. Wie bereits in vorherigen Ausführungen beschrieben, könnte es bei hohen IL-6-Plasmaspiegeln zu einer Verdrängung und konsekutiven Wirkungsabschwächung des kompetitiven Rezeptorblockers kommen. Aus diesem Grund wäre bei einer therapeutischen Anwendung von MR16-1 auf eine ausreichende Dosierung zu achten. Ein Vorteil des Rezeptorblockers scheint dabei dessen geringe Immunogenität zu sein, sodass es bei seiner Verwendung nur selten zu einer Bildung von *anti-drug* Antikörpern kommt (214), die mittelfristig ein Scheitern der Antikörpertherapie zur Folge hätte. Bezüglich IL-17A konnte durch die Behandlung mit MR16-1 eine im Vergleich zur NaCl-Gabe signifikante Abnahme der Serumkonzentration und der mRNA-Expression gemessen werden ($p<0,0001$). Aus Studien geht hervor, dass verschiedene Zytokine an der Differenzierung von naiven CD4-positiven T-Zellen zu Th17-Zellen, die für die Produktion von IL-17A verantwortlich gemacht werden, beteiligt sind. Hierzu zählen IL-6, TGF- β und GM-CSF (110, 176). In der vorliegenden Arbeit wurde einerseits die Wirkung von IL-6 durch die MR16-1-Gabe gezielt inhibiert, andererseits kam es durch die Injektion des Rezeptorblockers zu einer signifikanten Abnahme des GM-CSF-Plasmaspiegels ($p<0,001$) und der TGF- β -mRNA-Expression ($p=0,036$) verglichen mit einer NaCl-Gabe. Diese Veränderungen könnten die beobachtete Abnahme von IL-17A erklären. Eine Senkung des Zytokins könnte sich als vorteilhaft erweisen, da Li et al. zufolge die IL-17-Spiegel bei HI-Patienten erhöht und mit schlechteren NYHA-Stadien assoziiert sind (185). Das ebenfalls an der Differenzierung von naiven CD4-positiven T-Zellen zu Th17-Zellen beteiligte GM-CSF gilt als wichtiger Faktor im Rahmen der Initiierung und Aufrechterhaltung myokardialer Entzündungsreaktionen, da es neben einem Anstieg von IL-17A zu einer Erhöhung weiterer pro-inflammatorischer Zytokine, beispielsweise IL-6 und IL-23, beiträgt (215, 216). Zudem ist es eines der meiststudierten Zytokine in Bezug auf das kardiale

Remodeling. Kovacic et al. schreiben ihm darüber hinaus jedoch auch positive Effekte auf das kardiovaskuläre System zu, indem es Neovaskularisationsprozesse im ischämischen Myokard fördert (217). Ungeachtet dieser kardioprotektiven Eigenschaften, könnte sich der anti-inflammatorische Nettoeffekt einer MR16-1-vermittelten GM-CSF-Suppression vorteilhaft auf die Herzfunktion auswirken. Die anti-inflammatorische Wirkung von MR16-1 spiegelte sich des Weiteren in einer signifikanten Abnahme der pro-inflammatorischen Zytokine IFN γ , IL-18 und IL-1 β im Blutplasma ($p < 0,001$) sowie einer deutlichen Senkung der mRNA-Expression von IL-1 β und TNF- α im Herzgewebe der betroffenen Tiere verglichen mit der NaCl-Gruppe wider. Für IL-1 konnten in diversen experimentellen Modellen negativ inotrope Effekte demonstriert werden (218). Abbate et al. wiesen darüber hinaus in einer Pilotstudie mit 30 Patienten durch die Behandlung mit Anakinra, einem anti-IL-1-Rezeptor Antagonist, eine Abnahme der HI-Inzidenz nach MI nach (219). Bezüglich IL-18 konnte gezeigt werden, dass dessen spezifische Blockade nach Ischämie-/Reperfusionsschädigung zu einer Besserung der myokardialen Kontraktilität beiträgt (220). Die zugrunde liegenden Signalkaskaden sind jedoch noch nicht gänzlich entschlüsselt. Im Zuge der vorliegenden Untersuchung wurde weiterhin die Plasmakonzentration von IL-10 untersucht. Die Analysen ergaben, dass die Behandlung mit MR16-1 eine signifikante Abnahme des Zytokinspiegels verglichen mit der NaCl-Gruppe zur Folge hatte. IL-10 gilt als anti-inflammatorisch wirksames Zytokin, das die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine inhibiert (221, 222). Ohtsuka et al. wiesen eine positive Korrelation zwischen der Höhe der IL-10- und der TNF- α -Plasmaspiegeln bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie nach (223). Zugleich stellte die Arbeitsgruppe fest, dass es unter der Behandlung mit β -Blockern, die Teil der HI-Standardtherapie sind, zu einer signifikanten Abnahme der TNF- α -Spiegel kam, infolge derer auch die erhöhten IL-10-Plasmaspiegel deutlich sanken. Die Autoren postulierten, dass β -Blocker bei HI-Patienten erhöhte TNF- α -Plasmaspiegel senken können und IL-10 dabei eine zentrale immunregulierende Rolle spielt. Da es in der vorliegenden Arbeit in der MR16-1-Gruppe ebenfalls zu einer signifikanten Abnahme pro-inflammatorischer Zytokine einschließlich TNF- α kam, kann die beobachtete Reduktion des IL-10-Plasmaspiegels als weiteres Zeichen der anti-inflammatorischen Wirkung des IL-6 Rezeptorblockers gewertet werden. Zusammenfassend konnte im Rahmen dieser Studie gezeigt werden, dass die IL-6 Rezeptorblockade mittels MR16-1 zu einer Senkung inflammatorischer Zytokine führt.

Seit der Formulierung der Zytokinhypothese zu Beginn der 1990er Jahre (50) deuten zahlreiche Studien auf eine zentrale Rolle pro-inflammatorischer Zytokine in der Entstehung und der Progression der HI hin. Bisherige anti-inflammatorische Therapieversuche zeigten jedoch widersprüchliche Effekte. Obwohl in frühen präklinischen und auch klinischen Phase-II-Studien die negativ inotropen Effekte von TNF- α durch die Behandlung mit dem TNF- α -

Blocker Etanercept reversibel erschienen (62, 224-226), verfehlte die selektive Inhibition des Zytokins in groß angelegten klinischen HI-Studien (RENAISSANCE, RECOVER und RENEWAL) in Hinblick auf klinisches *Outcome*, Hospitalisierungsrate und Mortalität ihre Wirkung (80, 81, 227). Der im Rahmen der ATTACH-Studie verwendete monoklonale Antikörper Infliximab, der spezifisch TNF- α neutralisiert, führte sogar zu einem dosisabhängigen Anstieg der Mortalitäts- und Hospitalisierungsrate verglichen mit der Plazebo-Gruppe (228). Die Studienergebnisse werden von Anker et al. allerdings kontrovers diskutiert (77). Die Autoren postulieren, dass die adäquate Dosierung und die passende Patientensubgruppe, die von einer anti-TNF- α -Therapie profitiert, lediglich noch nicht gefunden wurden.

Für die negativen Ergebnisse der anti-TNF- α -Therapie verantwortlich gemacht werden u.a. die Komplement-vermittelten, intrinsisch-toxischen Eigenschaften von Infliximab und dessen agonistische Wirkung am TNF- α Rezeptor. Für Zytokin-bindende Proteine wurde gezeigt, dass sie selbst biologisch aktiv sein und unter bestimmten Umständen als Agonisten wirken können (229). Zudem kann es durch Trägerproteine wie Etanercept zu einer Stabilisierung des gebundenen Zytokins kommen, die mit einer Verlängerung dessen biologischer Halbwertszeit einhergeht (230). Obwohl zytotoxische Effekte auch für MR16-1 denkbar sind, ergab sich bisher kein Anhalt für eine direkte oder Komplement-vermittelte Toxizität gegenüber Zellen, die den IL-6R exprimieren (231). Auch in der vorliegenden Untersuchung war die Gabe des Rezeptorblockers nicht mit dem Auftreten unerwünschter Nebenwirkungen innerhalb des Beobachtungszeitraums verbunden. Ein akutes Organversagen, typische Anzeichen für eine Infektion oder einen reduzierten Allgemeinzustand der Tiere sowie eine Erhöhung der Mortalität, wie sie bei IL-6-defizienten Mäusen beobachtet werden können, traten nicht auf (232, 233). Pleuraergüsse manifestierten sich unabhängig der Gruppenzugehörigkeit der Tiere und konnten bereits in früheren Untersuchungen der Arbeitsgruppe am selben Mausmodell festgestellt werden (197). Sie sind ein häufiges Symptom der HI. Dennoch sind weitere Studien über einen längeren Zeitraum mit größeren Fallzahlen notwendig, um auch seltenere Nebenwirkungen auszuschließen.

Darüber hinaus ist zu bedenken, dass TNF- α sowohl über den TNF-Rezeptor Typ I als auch über den Typ II seine Wirkung entfalten kann. HI-Studien zeigten, dass beide gegensätzliche Effekte bezüglich Remodeling- und Entzündungsprozessen vermitteln (234, 235). Therapeutika sollten somit spezifisch gegen den jeweiligen Rezeptortyp gerichtet sein. Auch für IL-6 konnte gezeigt werden, dass der aktivierte Rezeptortyp ausschlaggebend für die Art der erzielten Effekte ist. Es wird angenommen, dass das Transsignaling, welches über die lösliche Form des IL-6R vermittelt wird, eine pro-inflammatorische Wirkung hat, indem es die Rekrutierung mononukleärer Zellen fördert und die Apoptose von T-Lymphozyten sowie die Reifung

regulatorischer T-Zellen hemmt (144). Die granulozytäre Sezernierung proteolytischer Enzyme und reaktiver Sauerstoffspezies resultiert dabei in einem vermehrten Untergang von Kardiomyozyten (236). Der klassische Signalweg via membrangebundenem IL-6R scheint im Gegensatz dazu eine eher regenerative und anti-inflammatorische Wirkung zu haben (144, 149, 237). Für die unterschiedliche Wirkungsweise ursächlich könnte eine beim Transsignaling verglichen mit dem klassischen Signalweg deutlich höhere Signalamplitude sein. Rose-John et al. postulierten, dass während beim Transsignaling durch den IL-6-sIL6R-Komplex alle membranständigen gp130-Moleküle stimuliert werden, es beim klassischen Signalweg durch die in der Regel geringere Anzahl an membranständigen IL-6R zu einer insgesamt deutlich geringeren Aktivierung der gp130-Moleküle kommt (149). Zudem konnte die Arbeitsgruppe zeigen, dass eine IL-6-vermittelte Stimulation von Zellen durch die rasche Internalisierung des Zytokins nur von kurzer Dauer ist, das Hinzufügen von IL-6-sIL6R-Komplexen hingegen zu einer Abnahme der Internalisierungsrate und somit deutlichen Wirkungsverlängerung führt (149, 238, 239). Die Kombination aus gesteigerter Signalamplitude und verlangsamter Internalisierung könnten den unterschiedlichen zellulären Antworten zugrunde liegen. Der in der vorliegenden Arbeit eingesetzte Wirkstoff MR16-1 blockiert sowohl die membrangebundene als auch die lösliche Form des IL-6R (208, 240). Dementsprechend wurden der Trans- und der klassische Signalweg im Rahmen einer globalen IL-6 Blockade gehemmt. Eine gezielte Inhibition des vermeintlich schädlichen Transsignalings ohne Beeinflussung des kardioprotektiven klassischen Signalweges wäre bei der HI möglicherweise effektiver. Auch wenn sich in der vorliegenden Arbeit kein Hinweis für unerwünschte Nebenwirkungen durch MR16-1 ergab, ist es darüber hinaus vorstellbar, dass durch die selektive Blockade des Transsignalings etwaige unerwünschte Auswirkungen einer globalen Inhibition des pleiotropen Zytokins vermieden werden könnten.

Ein solcher Ansatz wurde bereits bei anderen Erkrankungen untersucht. Wie zuvor aufgeführt, binden und neutralisieren sgp130-Moleküle selektiv den IL-6-sIL-6R-Komplex (151, 158, 241). Auf freies IL-6 hat sgp130 dagegen keine Wirkung, sodass der klassische IL-6-Signalweg nicht beeinflusst wird. Im Rahmen eines physiologischen negativen *Feedback*-Mechanismus scheint es bei erhöhten IL-6/sIL-6R-Spiegeln vermehrt sezerniert zu werden (242). Barkhausen et al. demonstrierten an einem murinen Sepsismodell, dass eine globale IL-6 Blockade durch neutralisierende anti-IL-6 Antikörper zu keinem signifikanten Anstieg der Überlebensrate führt. Die gezielte Inhibition des IL-6-Transsignalings mittels sgp130-IgG1-Fusionsproteine, die die Wirkung des endogenen sgp130 imitieren sollen, konnte hingegen das Überleben aller entsprechend behandelten Tiere erreichen (243). George et al. kamen zu ähnlichen Ergebnissen. Sie zeigten an einem Rattenmodell, dass die Gabe von sgp130-Fusionsproteinen nach einem MI zu einer Reduktion der myokardialen Leukozyteninfiltration, einer Abnahme der

Infarktgröße und dem Erhalt der kardialen Funktion bis 28 Tage nach ischämischem Ereignis verglichen mit anti-IL-6 Antikörper-behandelten Tieren führt (244). Die Autoren schlussfolgerten, dass der Einsatz des Fusionsproteins, nicht aber eine globale IL-6 Blockade, die Entwicklung einer HI im Anschluss an einen akuten MI vorbeugen könnte. Bisher konnte der IL-6 Rezeptorblocker Tocilizumab insbesondere bei solchen Erkrankungen zu effektiven Ergebnissen führen, in denen hohe Spiegel der löslichen IL-6 Rezeptorform vorliegen (u.a. rheumatoide Arthritis und Morbus Crohn) (245, 246). Da auch im Rahmen der HI erhöhte sIL-6R-Plasmaspiegel nachgewiesen wurden (247-250), erscheint der Einsatz von MR16-1 bei dieser Erkrankung, trotz dessen dualer Hemmweise, sinnvoll. Ob sich die selektive Inhibition des Transsignalweges mittels gp130-Fusionsproteine als effektiver erweist, muss weiter untersucht werden.

Der Nachweis des IL-6 Rezeptorblockers im Herzgewebe konnte mittels immunhistochemischer Verfahren erfolgreich erbracht werden. Die Untersuchung der Auswirkungen von MR16-1 auf das Aktivierungsniveau der IL-6-assoziierten Signaltransduktionswege JAK/STAT3 und PI3K/Akt im Herzgewebe ergab jedoch, dass es durch die Gabe des Rezeptorblockers zu keiner signifikanten Senkung des Verhältnisses von pSTAT3 zu STAT3 im Vergleich zur NaCl-Gruppe gekommen war. Das Verhältnis pAkt/Akt war sogar 2,47-fach höher ($p=0,027$). Phosphoryliertes (p)STAT3 bzw. pAkt sind biologisch aktive Mediatoren, während ihre unphosphorylierten Formen als inaktiv gelten. Durch die Bestimmung des Verhältnisses von phosphorylierter zu nicht phosphorylierter Form kann eine Aussage über das Aktivierungsniveau der Signalwege getroffen werden. Die diesbezüglichen Ergebnisse dieser Arbeit weisen auf eine Aktivierung des PI3K/Akt- ohne signifikante Beeinflussung des JAK/STAT3-Signalweges hin. Möglicherweise liegt diesen Effekten eine durch die IL-6 Rezeptorblockade stimulierte, kompensatorische Hochregulierung anderer Mitglieder der IL-6-Typ Zytokinfamilie zugrunde. Diesen gemein ist die signaltransduzierende gp130- β -Rezeptoruntereinheit, durch die sie ihre Effekte vermitteln. Als gp130-Liganden sind sie in der Lage, die JAK/STAT3- und PI3K/Akt-Signalwege zu aktivieren und somit im Sinne einer funktionellen Redundanz ähnliche biologische Effekte wie IL-6 selbst auf das Herz auszuüben. Zur IL-6-Typ Zytokinfamilie zählen neben IL-6 u.a. IL-11, IL-27, Oncostatin M (OSM), CT-1 und LIF (101, 103, 145, 156, 207, 251-256). Savvattis et al. konnten in ihrer Arbeit nach MR16-1-Gabe keinen Anstieg der genannten Moleküle im Herzgewebe feststellen (193). In der vorliegenden Arbeit ergaben die Analysen hingegen, dass die LIF-Expression in der IL-6 Rezeptorblocker- verglichen mit der NaCl-Kontrollgruppe 1,5-fach erhöht war ($p=0,015$). Für CT-1 zeigten sich keine relevanten Änderungen. Der kompensatorische Anstieg von LIF könnte durch die funktionelle Redundanz innerhalb der IL-6-Typ Zytokinfamilie den beobachteten Signalwegveränderungen zugrunde liegen. Es ist nicht auszuschließen, dass es

durch diesen Mechanismus zu einer Effektivabschwächung des Rezeptorblockers gekommen ist. Da gezeigt werden konnte, dass sgp130 nicht nur den IL-6-Transsignalweg, sondern auch die Aktivität der IL-6 Zytokinfamilienmitglieder LIF und OSM inhibiert (257-259), könnte der Einsatz von sgp130-Fusionsproteinen daher eine Möglichkeit darstellen, zusätzlich zur selektiven Hemmung des vermeintlich schädlichen Transsignalweges eventuellen Kompensationsmechanismen vorzubeugen.

Sowohl JAK/STAT3 als auch PI3K/Akt gelten als kardioprotektive Signalwege, die das kardiomyozytäre Überleben sowie kompensatorische Hypertrophie- und Neovaskularisationsprozesse im Herzen fördern (134, 260, 261). Obwohl die genauen Mediatoren und Mechanismen dieser Signalwege bisher nicht endgültig definiert wurden, scheinen Wachstumsfaktoren, Antioxidantien und Apoptose-regulierende Proteine eine Rolle zu spielen (261-265). Obana et al. zeigten, dass die IL-11-vermittelte Aktivierung von STAT3 im Anschluss an einen MI zu einer signifikanten Abnahme kardialer Fibroseprozesse führt (266). Eine signifikante Reduktion der Kollagenexpression im Herzgewebe konnte auch in der vorliegenden Arbeit im Rahmen der MR16-1-Behandlung beobachtet werden. In einem *knockout*-Mausmodell mit Kardiomyozyten-spezifischer Deletion von gp130, das zur Aktivierung von JAK/STAT3 und PI3K/Akt benötigt wird, wurden dagegen verglichen mit den Kontrolltieren ein massiver Anstieg der kardiomyozytären Apoptoserate, eine signifikante Abnahme der kardialen Kontraktilität sowie eine Zunahme der Ventrikeldilatation beobachtet, die in die Entwicklung einer dilatativen Kardiomyopathie und gesteigerten Mortalität im Anschluss an eine Nachlasterhöhung mündeten (142). In der vorliegenden Untersuchung konnten im Rahmen der MR16-1-Behandlung eine signifikante Aktivierung des PI3K/Akt- ohne inhibierende Beeinflussung des JAK/STAT3-Signalweges verglichen mit der NaCl-Gruppe festgestellt werden. Zugleich wurde eine positive Beeinflussung der kardialen Pumpfunktion beobachtet. Diese Daten deuten darauf hin, dass die JAK/STAT3- und PI3K/Akt-Signalwege für eine physiologische Herzfunktion essentiell sind und zu den beobachteten positiven Effekten auf die kardiale Pumpfunktion, die Kollagenexpression im Herzgewebe und die protektiven Faktoren im Blutplasma im Rahmen der MR16-1-Behandlung beigetragen haben könnten. Möglicherweise spielt hierbei der oben beschriebene endogene Kompensationsmechanismus durch LIF eine zentrale Rolle und wirkt sich positiv auf die Herzfunktion aus. Die IL-6-Typ Zytokinfamilie sollte daher als eine funktionelle Einheit aufgefasst werden, die es dem Organismus in bestimmten Situationen ermöglicht, die kardioprotektiven Effekte IL-6-assoziierter Signalwege trotz äußerer Einflüsse aufrechtzuerhalten.

Die vorliegende Arbeit konnte positive Effekte einer IL-6 Rezeptorblockade aufzeigen. Insbesondere auf etablierte Herzinsuffizienzmarker, pro-inflammatorische Zytokine und

Prozesse des kardialen Remodelings hatte die IL-6 Rezeptorinhibition mittels MR16-1 einen positiven Einfluss. Diese Ergebnisse unterstützen die in den *in vivo* Untersuchungen gemachte Beobachtung, dass der Rezeptorblocker den Krankheitsprogress der transgenen Tiere im Vergleich zur NaCl-Gabe signifikant hemmt. Zusammenfassend stimmen die Ergebnisse dieser Arbeit mit denen von Savvatis et al. überein, die zeigten, dass MR16-1 durch anti-inflammatorische und anti-fibrotische Effekte zu einer Besserung der kardialen Funktion beiträgt (193). Es erscheint möglich, dass die kurzfristige IL-6 Rezeptorblockade einen additiven therapeutischen Nutzen zur konventionellen HI-Therapie beiträgt. Welche Rolle andere IL-6-Typ Zytokinfamilienmitglieder dabei spielen, sollte in zukünftigen Studien näher untersucht werden.

4.3 Effekte einer indirekten IL-6 Inhibition

Wie bereits oben dargestellt, vermittelt IL-6 neben negativen auch kardioprotektive Effekte. IL-6 und IL-17A sind Teil einer positiven pro-inflammatorischen *Feedback*-Schleife, in der IL-6 zu einer vermehrten Produktion von IL-17A führt, welches dann die Sekretion von IL-6 fördert (105, 110, 267). Basierend auf diesem Mechanismus sollte in der vorliegenden Arbeit die Plasmakonzentration von IL-6 durch die Gabe neutralisierender anti-IL-17A Antikörper gesenkt werden. Ziel dieses zweiten Versuchsansatzes war es zu untersuchen, ob eine Teilblockade von IL-6 positive Effekte auf die Herzfunktion transgener herzinsuffizienter Mäuse hat. Ein solcher Therapieansatz wurde bei der HI bislang noch nicht untersucht.

Bei der Wahl der Injektionsschemas der anti-IL-17A Antikörper (Häufigkeit, Dosis und Applikationsart) wurde sich in der vorliegenden Arbeit an der vorhandenen Literatur orientiert (193, 268, 269). Basierend auf den Herstellerangaben und den Ergebnissen anderer Studien zufolge, wäre ein signifikanter Abfall der IL-17A- und IL-6-Serumspiegel nach Injektion der neutralisierenden Antikörper zu erwarten gewesen (105, 194, 268). Dieser Effekt konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht nachgewiesen werden. Verglichen mit der NaCl-Gruppe waren weder die IL-17A- noch die IL-6-Plasmakonzentrationen signifikant erniedrigt. Die mRNA-Expression von IL-17A dagegen zeigte sich in den anti-IL-17A-Antikörper-behandelten Tieren signifikant reduziert ($p < 0,001$). Bezüglich IL-6 konnte keine relevante Expressionsänderung festgestellt werden. Die Analysen ergaben, dass auch weitere inflammatorische Zytokine in ähnlicher Weise beeinflusst wurden. Während die mRNA-Expression von TNF- α ($p = 0,007$) und IL-1 β ($p = 0,0007$) verglichen mit der NaCl-Gruppe signifikant gesenkt wurde, waren die Plasmakonzentrationen dieser Zytokine sowie die von IL-18, IL-22, IL-23, IFN γ und des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 nicht wesentlich verändert im Vergleich zur NaCl-Gruppe. Aufgrund des im Mausmodell nur geringfügig erhöhten CRPs, hatten die neutralisierenden Antikörper auf diesen Marker, wie auch die MR16-

1-Behandlung, keinen signifikanten Einfluss. Aufgrund der hier beschriebenen signifikanten Effekte auf mRNA-Ebene sowie der im Folgenden diskutierten signifikanten Hemmung IL-6-assoziierter Signalwege, ist von einer Wirksamkeit der eingesetzten anti-IL-17A Antikörper dennoch auszugehen.

Die Herzgewebeanalysen ergaben, dass es durch die Injektion der anti-IL-17A Antikörper im Vergleich zur NaCl-Gabe zu einer signifikanten Abnahme der Verhältnisse von pSTAT3/STAT3 ($p < 0,001$) und pAkt/Akt ($p < 0,05$) auf Proteinebene gekommen war. Diese Ergebnisse sprechen für eine Hemmung der IL-6-assozierten Signalwege, obwohl der Nachweis einer signifikanten Beeinflussung des Zytokins selbst nicht erbracht werden konnte. Für die beobachtete Hemmung der IL-6-assozierten Signalwege mit verantwortlich sein könnte eine, verglichen mit der NaCl-Gruppe, signifikante Abnahme der LIF- und CT-1-mRNA-Expression im Herzgewebe der anti-IL-17A Antikörper-behandelten Tiere. Chabaud et al. zeigten anhand einer Zellkultur aus Synoviozyten von Patienten mit rheumatoider Arthritis, dass die Behandlung der Zellen mit IL-17A sieben Tage später zu einem 4-fachen Anstieg der LIF-Konzentration führt (270). Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Abnahme von LIF könnte demnach auf die Wirkung der neutralisierenden anti-IL-17A Antikörper zurückzuführen sein. Wie bereits im Zuge der direkten IL-6 Rezeptorblockade beschrieben, aktivieren CT-1 und LIF als IL-6-Typ Zytokinfamilienmitglieder und gp130-Liganden dieselben Signalwege wie IL-6, sodass ihr Abfall zu der Aktivitätsminderung von STAT3 und Akt beigetragen haben könnte. Darüber hinaus konnten verschiedene Autoren nachweisen, dass IL-17A selbst in der Lage ist STAT3 (271-273) und Akt (267) zu aktivieren. Die verminderte Aktivität dieser Signalwege kann daher als weiteres Zeichen der neutralisierenden Wirkung der anti-IL-17A Antikörper interpretiert werden. In ihrem Zusammenspiel könnten die genannten Mechanismen ein vom IL-6-Plasmaspiegel unabhängiges Zustandekommen der Ergebnisse erklären.

Song et al. untersuchten die Effekte der neutralisierenden anti-IL-17A Antikörper im murinen Darm nach Hitze-induzierter Schädigung der intestinalen Mukosa. Zu diesem Zweck injizierten sie die Antikörper am Vortag sowie zum Zeitpunkt der Verbrennung und untersuchten die Protein- und Plasmaspiegel relevanter pro-inflammatorischer Zytokine 24 Stunden später. Die Analysen ergaben, dass IL-17A, IL-6, TNF- α und IL-1 β sowohl auf Proteinebene im Herzgewebe als auch im Blutplasma nach der Antikörper-Behandlung signifikant niedriger waren als in der Kontrollgruppe (268). Hou et al. demonstrierten an einem Virus-induzierten Myeloenzephalitis-Mausmodell, dass die Gabe der anti-IL-17A Antikörper am Tag der Infektion sowie sieben Tage später zu einer signifikanten Senkung der IL-17A-Plasmakonzentration einen Tag nach der zweiten Injektion führte (269). Darüber hinaus existieren auch Untersuchungen zu den Auswirkungen einer Einmalgabe der Antikörper. Die Arbeitsgruppe von Reich und Kollegen untersuchte die Effekte einer IL-17A Inhibition auf die

Krankheitsaktivität von Psoriasis-Patienten (274). Entsprechend der Gruppenzugehörigkeit erhielten die Patienten eine intravenöse Einmaldosis des neutralisierenden anti-IL-17A Antikörpers Secukinumab. Bereits in der ersten Untersuchung nach zwei Wochen konnte eine Besserung krankheitstypischer Veränderungen beobachtet und eine signifikante Abnahme der mRNA-Expression von IL-17A verglichen mit der Placebo-Gruppe festgestellt werden. Die Dauer einiger dieser Effekte war dabei zeitlich begrenzt. Die Ergebnisse von Reich et al. zeigen, dass bereits die Einmalgabe neutralisierender anti-IL-17A Antikörper, wie sie auch in der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurde, zu signifikanten Effekten führen kann. Aufgrund eines Wirksamkeitsverlustes der Antikörper über die Zeit können diese Effekte jedoch reversibel sein. In Mäusen beträgt die Halbwertszeit injizierter Antikörper nur wenige Tage (275, 276), beim Menschen deutlich länger (z.B. Secukinumab 22-31 Tage) (277). In der vorliegenden Untersuchung wurden die biologischen Proben jedoch erst 7 Tage nach der Behandlung entnommen. Dies könnte erklären, weshalb die erwarteten Zytokineffekte der anti-IL-17A Antikörper verglichen mit anderen Arbeiten schwach ausfielen. Möglicherweise hätten eine frühzeitigere Analyse nach Antikörper-Gabe oder eine Wiederholung der Injektionen auch in der vorliegenden Untersuchung weitere signifikante Effekte, insbesondere auch auf IL-6, nachweisen können. Aufgrund des schnellen Krankheitsverlaufes und der damit verbundenen erhöhten Mortalität der Tiere, wurden in Anlehnung an die Studie von Savvatis et al. (193) jedoch bewusst eine Einmalgabe und ein Untersuchungsintervall von einer Woche gewählt.

Die verabreichte Antikörpermengung von 100 µg sollte gemäß Herstellerangaben das frei im Plasma zirkulierende IL-17A theoretisch ausreichend neutralisiert haben. Da sich die Herstellerangaben auf *in vitro* Untersuchungen beziehen, die Versuche der vorliegenden Arbeit hingegen *in vivo* stattfanden, könnten die Effekte durch eine veränderte Stabilität der Antikörper dennoch abweichen. Möglicherweise hätte auch eine größere Antikörpermengung zu stärkeren Veränderungen geführt.

Die Analysen zeigten weiterhin, dass die Behandlung mit anti-IL-17A Antikörpern einen signifikanten Anstieg der Gal-1-Plasmakonzentration verglichen mit der NaCl-Gabe zur Folge hatte ($p=0,0002$). Andere HI-assoziierte Biomarker wie Gal-3, NT-proBNP und ET-1 blieben dagegen unbeeinflusst.

Die an Gewebeschnitten durchgeführten Hypertrophieanalysen ergaben, dass die Behandlung mit anti-IL-17A Antikörpern keinen signifikanten Einfluss auf die Größe der Kardiomyozyten verglichen mit der NaCl-Injektion hatte. Passend dazu ließ sich MR-tomographisch in den anti-IL-17A Antikörper-behandelten Tieren während des Beobachtungszeitraums keine signifikante Änderung der LVM verglichen mit der NaCl-Kontrollgruppe nachweisen. Ebenso wurden der Fibrosegrad und das mRNA-Expressionsmuster von MMP-2, MMP-9, TGF-β, Col1α1 und Col31α1 im Herzgewebe nicht signifikant beeinflusst. Zusammenfassend konnte die Gabe von

anti-IL-17A Antikörpern in der vorliegenden Arbeit keinen signifikanten Effekt auf das kardiale Remodeling erzielen. Allgemein wird IL-17A jedoch mit kardiodepressiven Remodeling-Prozessen in Verbindung gebracht. Während es in IL-17A-behandelten Mäusen einen Tag nach MI zu einer Zunahme der Infarktgröße, der kardiomyozytären Apoptoserate und nach einem Monat der Fibrosierung im Herzgewebe kam, wurden in der Kontrollgruppe aus transgenen IL-17A-*knockout*-Mäusen gegensätzliche Effekte beobachtet (187). Zhou et al. schrieben dem Zytokin daher eine wichtige Rolle in der Pathogenese ventrikulärer Remodeling-Prozesse nach ischämischen Ereignissen zu. Baldeviano et al. untersuchten an einem Myokarditis-Mausmodell die Auswirkung einer Behandlung mit anti-IL-17A Antikörpern auf die Herzfunktion und Remodeling-assoziierte Parameter (178). Die Arbeitsgruppe konnte in den Herzen der anti-IL-17A Antikörper-behandelten Tiere eine signifikante Abnahme von Hypertrophie und interstitieller Fibrose verglichen mit den Kontrollgruppen nachweisen. Der Versuch umfasste die tägliche intraperitoneale Injektion von 100 µg Antikörper über 12 Tage und eine Analyse des Herzgewebes 9 Tage später. Möglicherweise war die in der vorliegenden Arbeit erfolgte Einmalinjektion von neutralisierenden anti-IL-17A Antikörpern nicht ausreichend und der Beobachtungszeitraum zu kurz, um signifikante Remodeling-bezogene Effekte nachweisen zu können.

Die MRT-gestützten *in vivo* Untersuchungen ergaben, dass die Injektion der neutralisierenden anti-IL-17A Antikörper zu einer signifikant geringeren Abnahme der LVEF über die Zeit verglichen mit der NaCl-Gabe führte ($-3,7 \pm 1,3$ % vs. $-10,7 \pm 2,6$ %, $p=0,02$). Dabei war die Effektstärke mit derer der direkten IL-6 Rezeptorblockade vergleichbar. Andere kardiale Funktionsparameter, wie das LVFS und LVSV, wurden nicht wesentlich beeinflusst. Diese Ergebnisse gleichen in Teilen denen der bereits zitierten Arbeit von Baldeviano et al. (178). Die Autoren beschrieben, zusätzlich zu der erwähnten positiven Beeinflussung von Remodeling-Prozessen, eine signifikante Besserung der LVEF (und LVFS) durch die Gabe von anti-IL-17A Antikörpern.

Zusammenfassend kann auf eine insgesamt kardioprotektive Wirkung der anti-IL-17A Antikörper geschlossen werden. Diese Erkenntnis steht im Einklang mit den Ergebnissen von Baldeviano et al. (178). Obwohl die Behandlung im Beobachtungszeitraum nicht zu der erwarteten Senkung von IL-6 geführt hat, wurden die IL-6-assoziierten Signalwege inhibiert und der *in vivo* untersuchte Krankheitsprogress der transgenen Tiere signifikant gehemmt. Entgegen der ursprünglichen Erwartung sollten die Ergebnisse jedoch, mangels entsprechender Nachweise, auf vom IL-6-Zytokinpiegel unabhängige Effekte der anti-IL-17A Antikörper, wie eine Senkung anderer IL-6-Typ Zytokinfamilienmitglieder sowie der pro-inflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-1 β und IL-17A, zurückgeführt werden. Sie unterstreichen, wie bereits von anderen Autoren postuliert (51, 55, 58, 219, 242), dass einem anti-inflammatorischen Ansatz

in der Behandlung der HI eine zentrale Rolle zukommen könnte. Im direkten Vergleich hat die Behandlung mit anti-IL-17A Antikörpern jedoch weniger Effekte als die IL-6 Rezeptorblockade mittels MR16-1.

4.4 Einfluss von Immunglobulinen auf die kardiale Funktion und ihre mögliche Rolle bei der Therapie der HI

Entgegen den Erwartungen zeigten die Immunglobulin-Isotypkontrollen selbst signifikante Effekte auf eine Vielzahl der untersuchten Parameter.

Die mittels MRT erhobenen Daten zeigten, dass die Gabe von Immunglobulinen auf einige der gemessenen Parameter ähnliche Effekte wie die Behandlung mit MR16-1 bzw. den anti-IL-17A-Antikörpern hatte. Sowohl in der IgG-Ratte- ($-1,6 \pm 1,4$ % vs. $-10,7 \pm 2,6$ %, $p=0,004$) als auch in der IgG-Maus-Gruppe ($-2,3 \pm 2,5$ % vs. $-10,7 \pm 2,6$ %, $p=0,044$) wurde eine signifikant geringere Abnahme der LVEF über die Zeit verglichen mit der NaCl-Kontrolle beobachtet. Auch hinsichtlich des LVFS konnte eine deutlich geringere Verschlechterung in der IgG-Ratte- ($-1,8 \pm 1,8$ % vs. $-9,0 \pm 3,5$ %, $p=0,056$) und der IgG-Maus-Gruppe ($-2,5 \pm 2,8$ % vs. $-9,0 \pm 3,5$ %, $p=0,17$) im Vergleich zur NaCl-Kohorte festgestellt werden. Die Effekte waren dabei vergleichbar mit denen von MR16-1 bzw. den anti-IL-17A Antikörpern. Während im Rahmen der MR16-1-Behandlung eine relevante Beeinflussung des LVESV ausblieb, wurde durch die Injektion von IgG-Ratte eine signifikant geringere Zunahme des Parameters über den Untersuchungszeitraum verglichen mit der NaCl-Gruppe erzielt ($2,6 \pm 1,0$ μ l vs. $7,8 \pm 2,7$ μ l, $p=0,044$). Diese Veränderungen sprechen für eine positive Beeinflussung der systolischen Herzfunktion durch die Immunglobuline. Zu ähnlichen Ergebnissen kam auch die Arbeitsgruppe von Savvatis et al. (193). IgG-behandelte Virus-infizierte Myokarditis-Mäuse zeigten eine signifikant bessere Pumpfunktion, gemessen anhand des Schlagvolumens und der Ejektionsfraktion, als solche, die MR16-1 erhielten. Kobara et al. wiesen in einem MI-Mausmodell sieben Tage nach ischämischem Ereignis ein signifikant besseres *Fractional shortening* und LVEF durch die Behandlung mit MR16-1 als durch die Gabe der IgG-Isotypkontrolle nach (207). Welchen Effekt die Immunglobuline konkret auf die Herzfunktion hatten, wurde jedoch nicht dargestellt. Möglicherweise wirkte sich die Gabe von IgG ebenfalls positiv auf die Herzfunktion aus. Die Ergebnisse von Baldeviano et al. an einem Myokarditis-Mausmodell deuten darauf hin, dass sowohl die Verabreichung von anti-IL-17A Antikörpern als auch die Injektion von IgG zu einer Besserung des *Fractional shortenings* und der LVEF führen, obwohl die Signifikanzniveaus nicht für beide Behandlungen angegeben wurden (178). Die Zytokinuntersuchung ergab, dass die Plasmaspiegel der pro-inflammatorischen Zytokine GM-CSF, IFN- γ und IL-1 β inklusive der zentralen Zytokine dieser Arbeit, IL-6 und IL-17A, durch die Gabe von IgG-Ratte verglichen mit der NaCl-Gruppe signifikant gesenkt wurden.

Die Auswirkungen einer IgG-Maus-Injektion waren weniger einheitlich. Während GM-CSF signifikant reduziert wurde ($p=0,023$), kam es zu einem deutlichen Anstieg von IL-6 und TNF- α verglichen mit der NaCl-Gruppe. IL-17A und IL-1 β wurden nicht signifikant beeinflusst. Auch auf mRNA-Ebene zeigten die Immunglobuline Effekte. In beiden IgG-Gruppen wurde die TNF- α -Expression signifikant gesenkt. In der IgG-Maus-Gruppe kam es darüber hinaus zu einer signifikanten Abnahme der IL-17A-Expression verglichen mit der NaCl-Gruppe ($p<0,001$). Die erzielten Effekte stehen größtenteils im Einklang mit den Ergebnissen von Gullestad et al.. Die Autoren konnten bei HI-Patienten durch eine Behandlung mit IVIG eine Abnahme pro-inflammatorischer Zytokine im Blutplasma sowie eine Steigerung der LVEF erzielen (97). Ein darüber hinaus beschriebener Anstieg anti-inflammatorischer Zytokine, der positiv mit der Besserung der Pumpfunktion korrelierte, konnte in der vorliegenden Arbeit dagegen nicht beobachtet werden; IL-10 wurde durch die Immunglobuline nicht signifikant beeinflusst.

Auch auf einige der untersuchten Remodeling-Parameter hatten die Immunglobuline signifikante Effekte. Die Injektion von IgG-Ratte führte zu einer deutlich geringeren Gewichtszunahme des linken Ventrikels über den Beobachtungszeitraum als in der NaCl-Gruppe ($1,3\pm 2,0$ mg vs. $10,3\pm 5,0$ mg, $p=0,066$). Die Gabe von IgG-Maus hatte auf die LVM hingegen keinen nachweisbaren Effekt. Die *in vitro* Analysen ergaben weiterhin, dass die Col1 α 1-Expression durch die Injektion von IgG-Ratte signifikant gesenkt werden konnte ($p<0,0001$) und dabei den Effekt von MR16-1 deutlich überstieg. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der Arbeit von Gurantz et al., in der es bei Ratten zu einer IVIG-induzierten Abnahme der Kollagenexpression im Anschluss an einen MI kam (278). Auf die ebenfalls im Herzgewebe gemessenen Fibrose- und Remodeling-assoziierten Marker MMP-2, MMP-9, TGF- β und Col3 α 1 übten die Immunglobuline im Rahmen unserer Untersuchungen dagegen keinen signifikanten Einfluss aus. Auch die Analysen der Herzgewebeschnitte deuteten auf keine signifikante Beeinflussung der Kardiomyozytengröße oder des Fibrosegrades durch die Immunglobuline hin.

Die Untersuchung HI-assoziiierter Biomarker ergab, dass die Plasmakonzentration des kardioprotektiven Gal-1 durch die Gabe von IgG-Ratte 1,3-fach gesteigert werden konnte ($p<0,001$). Der Effekt war dabei vergleichbar mit dem von MR16-1. Zudem konnte das ebenfalls prognostisch relevante ET-1, das als unabhängiger Mortalitätsprädiktor im Rahmen der HI gilt (88), auf mRNA-Ebene durch die Gabe von IgG-Ratte im Vergleich zur NaCl-Gruppe signifikant gesenkt werden ($p=0,027$); auch verglichen mit der MR16-1-Gruppe war der erzielte Effekt signifikant ($p=0,031$). Auf den NT-proBNP-Spiegel hatte die Behandlung dagegen keinen signifikanten Einfluss.

Des Weiteren beeinflusste die Injektion der Immunglobuline deutlich die IL-6-assoziierten Signalwege. Verglichen mit der NaCl-Gabe führte die Administration von IgG-Ratte zu einer signifikanten Aktivierung des Akt-Signalweges ($p=0,018$). Der JAK/STAT3-Signalweg wurde dagegen nicht beeinflusst. Die Effekte waren dabei mit denen von MR16-1 vergleichbar. Im Gegensatz dazu führte die Gabe von IgG-Maus zu einer signifikanten Aktivitätsminderung des JAK/STAT3-Signalweges ($p<0,0001$). Dieser Effekt war wiederum vergleichbar mit dem der anti-IL-17A Antikörper. Der Akt-Signalweg wurde dagegen nicht relevant beeinflusst. Auf das Regulationsprotein SOCS3 hatten die Immunglobuline, genau wie MR16-1 und die anti-IL-17A-Antikörper, keinen signifikanten Effekt. Die Untersuchungen ergaben weiterhin, dass die Expression der IL-6-Typ Zytokinfamilienmitglieder LIF und CT-1 durch IgG-Ratte nicht signifikant beeinflusst wurde, die Injektion von IgG-Maus dagegen eine signifikante Reduktion beider Moleküle verglichen mit der NaCl-Gruppe bewirkte ($p<0,003$). Diese Veränderungen könnten, wie auch schon im Rahmen der Behandlung mit MR16-1 und den anti-IL-17A Antikörper diskutiert, eine Erklärung für die beobachtete Aktivitätsänderung der IL-6-assoziierten Signalwege bieten.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass viele der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Parameter durch die Immunglobuline signifikant beeinflusst wurden. Pro-inflammatorische Zytokine wurden sowohl im Blutplasma als auch auf mRNA-Ebene signifikant reduziert. Darüber hinaus konnten positive Effekte auf Remodeling-Prozesse festgestellt werden. Insbesondere wurden eine überschießende Hypertrophie vermieden und der Kollagengehalt im Herzgewebe reduziert. HI-assoziierte Proteine wie Gal-1 und ET-1 konnten nachweislich positiv beeinflusst werden und die MRT-Daten ergaben eine deutliche Verlangsamung der Krankheitsprogression. Diese Ergebnisse weisen auf eine kardioprotektive Wirkung der Immunglobuline hin. Dabei scheint IgG-Ratte bessere Effekte als IgG-Maus zu erzielen. Diese Beobachtung könnte auf die Tatsache zurückzuführen sein, dass Ersteres einen aktivierenden und Letzteres einen tendenziell hemmenden Effekt auf die kardioprotektiven Signalwege JAK/STAT3 und PI3K/Akt zu haben scheint.

Studien weisen auf eine Beteiligung vieler unterschiedlicher inflammatorischer Zytokine bei der Entwicklung einer myokardialen Dysfunktion hin (62, 68, 73, 250, 279). Ihnen gemein sind eine pleiotrope Wirkungsweise und funktionelle Redundanz: Während ein Zytokin in verschiedenen Organsystemen unterschiedliche Effekte ausübt, kann ein bestimmter Effekt wiederum durch verschiedene Zytokine vermittelt werden (103). Darüber hinaus beeinflussen sich viele Botenstoffe kaskadenartig gegenseitig und es können Kompensationsmechanismen innerhalb einer Zytokinfamilie zum Tragen kommen. Möglicherweise kann eine Wiederherstellung der physiologischen Verhältnisse in diesem komplexen, interaktiven Zytokinnetzwerk nicht durch die Inhibition eines einzelnen erreicht werden. Ganz im Gegenteil

könnte sich bei der HI, aufgrund ihrer multifaktoriellen Genese, eine breiter angelegte, unspezifische Blockade als vorteilhafter erweisen. Lyman et al. deuten auf die Überlegenheit einer kombinierten, gegen IL-6 und IL-17A gerichteten Antikörpertherapie gegenüber den Effekten der einzelnen monovalenten Antikörper hin (280). In einem inflammatorischen Mausmodell demonstrierten sie, dass die Gabe des bispezifischen Antikörpers zu einer signifikant geringeren Einwanderung inflammatorischer Zellen in das Gewebe verglichen mit der Ig-Isotypkontrollgruppe und den jeweiligen Monotherapien führte. Die Autoren postulieren, dass diese Beobachtungen auf Redundanzen und Kompensationsmechanismen innerhalb des Zytokinnetzwerkes zurückzuführen seien. Diese könnten zu einer Abschwächung der Wirksamkeit monovalenter Antikörper führen. Wie bereits weiter oben diskutiert, könnten diese Prozesse auch in der vorliegenden Arbeit bei der Behandlung mit MR16-1 eine Rolle gespielt haben. Ob die beschriebenen Kompensationsmechanismen möglicherweise auch eine kardioprotektive Wirkung haben, muss weiter überprüft werden.

Eine Form der nichtselektiven Immunmodulation stellt die Gabe von IVIG dar, die bereits im Rahmen verschiedener systemischer Inflammations- und Autoimmunerkrankungen erprobt wurde und positive Effekte erzielen konnte (281, 282). IVIG scheinen über unterschiedliche Mechanismen, beispielsweise eine Inhibition der Komplementaktivierung, Fc-Rezeptorblockade auf Phagozyten, Neutralisierung von Autoantikörpern, Restriktion der Leukozyteneinwanderung und Beeinflussung von Zytokinen, einen anti-inflammatorischen Nettoeffekt zu haben (69, 97, 283-285). Unerwünschte Nebenwirkungen sind dabei selten. In der vorliegenden Arbeit konnte der modulierende Einfluss auf das Zytokinnetzwerk im Sinne eines anti-inflammatorischen Effektes bestätigt werden. Darüber hinaus scheinen IVIG das kardiale Remodeling positiv zu beeinflussen (278). Auch diese Veränderungen konnten zumindest teilweise in der vorliegenden Arbeit beobachtet werden. Da die genannten Prozesse auch bei der Entwicklung und Progression der HI eine Rolle spielen, ist eine positive Beeinflussung durch IVIG denkbar. In der bereits zitierten doppelblinden Plazebokontrollierten Studie von Gullestad et al. zeigten die Autoren, dass auch bei HI-Patienten unter optimaler medikamentöser Therapie noch eine Modulation der Immunantwort durch den Einsatz von IVIG zu erreichen ist und diese mit einer signifikanten Besserung der LVEF einhergeht (97). HI-Patienten könnten demnach von dieser additiven Therapieform profitieren. Während in der genannten Studie die Teilnehmer fünf Monate lang wiederholt IVIG- bzw. Plazebo-Infusionen erhielten, konnten McNamara et al. zeigen, dass bereits eine einmalige IVIG-Bolusgabe zu einem Anstieg der LVEF bei Patienten mit neu aufgetretener dilatativer Kardiomyopathie führt (99). Obwohl IVIG teuer und ein langfristiger Einsatz in der Routineversorgung der chronischen HI womöglich nicht umsetzbar ist, könnte sich ein gezielter

kurzfristiger Einsatz, beispielsweise in der Frühphase nach einer myokardialen Schädigung, als vorteilhaft erweisen und die Entwicklung einer HI verhindern.

Die vorliegende Untersuchung ergab, dass eine Vielzahl der Effekte in ähnlicher Ausprägung sowohl in der MR16-1- und anti-IL-17A Antikörpergruppe als auch in den korrespondierenden IgG-Isotypkontrollgruppen erzielt werden konnte. Inwiefern die Wirkung der spezifischen monovalenten Antikörper auf ihre IgG-Struktur zurückzuführen ist, kann hier nicht abschließend geklärt werden. Weiterführende Studien sind notwendig, um zu untersuchen, inwiefern es sich bei den nachgewiesenen Veränderungen um spezifische Antikörpervermittelte Effekte oder kardioprotektive Auswirkungen einer unspezifischen Immunmodulation handelt. Die Komplexität des Zytokinnetzwerkes, innerhalb dessen sich die Mediatoren gegenseitig beeinflussen und je nach Konzentration, Dauer und Zeitpunkt ihrer Aktivierung sowie stimuliertem Rezeptortyp sowohl kardioprotektiv als auch -depressiv wirken können, wird auch in Zukunft eine große Herausforderung auf diesem Gebiet der HI-Forschung darstellen.

5. Zusammenfassung

Die chronische HI ist eine der häufigsten Todesursachen in Deutschland. Aufgrund der hohen Behandlungskosten stellt sie ein wachsendes sozio-ökonomisches Problem unserer Gesellschaft dar. Trotz einer etablierten und prognostisch wirksamen Standardtherapie, bleibt die HI eine progrediente Erkrankung. Dies suggeriert, dass zentrale pathogenetische Mechanismen durch die aktuelle konventionelle Therapie nicht berücksichtigt werden. Hierzu gehört ein dysreguliertes, chronisch aktives Inflammationsgeschehen. Pro-inflammatorischen Zytokinen im Allgemeinen und IL-6 im Speziellen werden eine zentrale Rolle in der Induktion von kardiomyozytärer Apoptose, kardiodepressivem Remodeling und ventrikulärer Dysfunktion zugeschrieben. Seit Formulierung der Zytokinhypothese im Jahr 1994 stehen anti-inflammatorische Therapieansätze daher im Mittelpunkt vieler Untersuchungen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde analysiert, wie sich die Gabe des IL-6 Rezeptorblockers MR16-1 auf die Progression der HI bei transgenen herzinsuffizienten Mäusen auswirkt. Da IL-6 als pleiotropes Zytokin Funktionen im Gesamtorganismus ausübt und ihm darüber hinaus auch kardioprotektive Effekte zugeschrieben werden, wurden in einem zweiten Versuchsansatz die Effekte einer indirekten IL-6 Inhibition mittels neutralisierender anti-IL-17A Antikörper untersucht. Basierend auf den erhobenen Daten sollte evaluiert werden, welcher Ansatz bessere Ergebnisse erzielt.

Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurde das transgene Herzinsuffizienzmodell Cyclin T1/Gαq genutzt. Im Alter von 6 Wochen wurde die Herzfunktion der Mäuse mit Hilfe eines Kleintier-MRT *in vivo* evaluiert (*Baseline*-Messung). Im Anschluss an die Untersuchung erhielten die Mäuse entsprechend ihrer Gruppenzugehörigkeit eine intraperitoneale Injektion der Antikörper bzw. Kontrollsubstanzen. Die abschließende MRT-gestützte Verlaufsuntersuchung fand am 7. Tag nach der *Baseline*-Messung statt. Sie sollte Funktions- und Struktur-bezogene Änderungen des Herzens über den Untersuchungszeitraum aufzeigen. Nach Beendigung der Abschlussmessung wurden das Herz und Blut entnommen, um laborchemische Analysen durchzuführen. In diesen wurden mittels PCR, ELISA, LUMINEX, Western Blot sowie immunohistochemischer und histologischer Verfahren inflammatorische Zytokine, Remodeling-Prozesse, Herzinsuffizienzmarker und IL-6-assoziierte Signaltransduktionswege im Blutplasma und Herzgewebe untersucht.

Die MRT-gestützten *in vivo* Untersuchungen ergaben, dass die Behandlung mit MR16-1 zu einer signifikant geringeren Verschlechterung der LVEF und des LVFS über die Zeit sowie einer deutlichen Zunahme des LVSV im Vergleich zur NaCl-Gabe führt. Die PCR-Analysen demonstrierten darüber hinaus eine signifikant niedrigere Kollagenexpression. Anhand der ELISA- und LUMINEX-Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass es durch die Behandlung mit dem IL-6 Rezeptorblocker zu einer signifikanten Senkung von NT-proBNP

und einer Steigerung der Gal-1-Plasmakonzentration verglichen mit einer NaCl-Injektion kommt. Darüber hinaus konnten die mRNA-Expression und Konzentration einer Vielzahl proinflammatorischer Zytokine gesenkt werden. Kardioprotektive IL-6-assoziierte Signalwege wurden dabei nicht negativ beeinflusst. Da auch die IgG-Isotypkontrollen einige Parameter signifikant beeinflussten, ist die Spezifität dieser Effekte jedoch nicht sicher belegt. Um den Einfluss der neutralisierenden anti-IL-17A Antikörper und der Immunglobuline besser einordnen zu können, sind weitere Untersuchungen notwendig.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die direkte IL-6 Rezeptorblockade einen positiven Effekt auf den Krankheitsverlauf transgener herzinsuffizienter Mäuse hat. Inwiefern andere Mitglieder der IL-6-Typ Zytokinfamilie und unspezifische IgG-Effekte dabei eine Rolle spielen und ob sich diese Effekte auch langfristig bestätigen lassen, sodass sich eine Mortalitätsreduktion erzielen lässt, muss mittels weiterer Untersuchungen geklärt werden.

6. Literaturverzeichnis

1. McDonagh TA, Metra M, Adamo M, Gardner RS, Baumbach A, Böhm M, Burri H, Butler J, Čelutkienė J, Chioncel O, Cleland JGF, Coats AJS, Crespo-Leiro MG, Farmakis D, Gilard M, Heymans S, Hoes AW, Jaarsma T, Jankowska EA, Lainscak M, Lam CSP, Lyon AR, McMurray JJV, Mebazaa A, Mindham R, Muneretto C, Francesco Piepoli M, Price S, Rosano GMC, Ruschitzka F, Kathrine Skibelund A, Group ESD. 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: Developed by the Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) With the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur Heart J*. 2021.
2. Hummel A, Empen K, Dörr M, Felix SB. Akute und akut dekompensierte chronische Herzinsuffizienz. *Dtsch Arztebl Int*. 2015;112:298-310.
3. Jackson G, Gibbs CR, Davies MK, Lip GY. ABC of heart failure. Pathophysiology. *BMJ*. 2000;320:167-170.
4. Internet. Statistisches Bundesamt (Destatis) Download am 13.01.2022 um 10:00 [Available from: https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/_inhalt.html].
5. Holstiege J, Akmatov MK, Steffen A, Bätzing J. Prävalenz der Herzinsuffizienz – bundesweite Trends, regionale Variationen und häufige Komorbiditäten. Zentralinstitut für die kassenärztliche Versorgung in Deutschland. 2018;Versorgungsatlas-Bericht Nr. 18/09.
6. Smolina K, Wright FL, Rayner M, Goldacre MJ. Determinants of the decline in mortality from acute myocardial infarction in England between 2002 and 2010: linked national database study. *BMJ*. 2012;344:d8059.
7. Neumann T, Biermann J, Erbel R, Neumann A, Wasem J, Ertl G, Dietz R. Heart failure: the commonest reason for hospital admission in Germany: medical and economic perspectives. *Dtsch Arztebl Int*. 2009;106:269-275.
8. Schmidt S, Hendricks V, Griebenow R, Riedel R. Demographic change and its impact on the health-care budget for heart failure inpatients in Germany during 1995-2025. *Herz*. 2013;38:862-867.
9. Kemp CD, Conte JV. The pathophysiology of heart failure. *Cardiovasc Pathol*. 2012;21:365-371.
10. Internet. American Heart Association Download am 13.01.2022 um 10:15 [Available from: <https://www.heart.org/en/health-topics/heart-failure/what-is-heart-failure/classes-of-heart-failure>].

11. Bundesärztekammer (BÄK), Kassenärztliche Bundesvereinigung (KBV), Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF). Nationale VersorgungsLeitlinie Chronische Herzinsuffizienz – Langfassung. 2019;3. Auflage.
12. Lip GY, Gibbs CR, Beevers DG. ABC of heart failure: aetiology. *BMJ*. 2000;320:104-107.
13. McKee PA, Castelli WP, McNamara PM, Kannel WB. The natural history of congestive heart failure: the Framingham study. *N Engl J Med*. 1971;285:1441-1446.
14. Page RL, 2nd, O'Bryant CL, Cheng D, Dow TJ, Ky B, Stein CM, Spencer AP, Trupp RJ, Lindenfeld J, American Heart Association Clinical P, Heart F, Transplantation Committees of the Council on Clinical C, Council on Cardiovascular S, Anesthesia, Council on C, Stroke N, Council on Quality of C, Outcomes R. Drugs That May Cause or Exacerbate Heart Failure: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation*. 2016;134:e32-69.
15. Roskamm H, Neumann F-J, Kalusche D, Bestehorn H-P. *Herzkrankheiten*: Springer, Berlin, Heidelberg; 2004.
16. Westphal K. Das Bewusstsein für die chronische Herzinsuffizienz schärfen. In: Medici A, editor. Jahrestagung der Heart Failure Association (HFA) of the ESC; 23.-26.03.2015; Sevilla, Spanien2015.
17. Cui B, Zheng Y, Sun L, Shi T, Shi Z, Wang L, Huang G, Sun N. Heart Regeneration in Adult Mammals after Myocardial Damage. *Acta Cardiologica Sinica*. 2018;34:115-123.
18. Torre-Amione G. Immune activation in chronic heart failure. *Am J Cardiol*. 2005;95:3C-8C; discussion 38C-40C.
19. Braunwald E. Heart failure. *JACC Heart failure*. 2013;1:1-20.
20. Tennant R, J WC. The effect of coronary occlusion on myocardial contraction. *Am J Physiol Leg Content*. 1935;112:351-361.
21. Wu QQ, Xiao Y, Yuan Y, Ma ZG, Liao HH, Liu C, Zhu JX, Yang Z, Deng W, Tang QZ. Mechanisms contributing to cardiac remodelling. *Clin Sci (Lond)*. 2017;131:2319-2345.
22. Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. *J Am Coll Cardiol*. 2000;35:569-582.
23. Gaudron P, Eilles C, Kugler I, Ertl G. Progressive left ventricular dysfunction and remodeling after myocardial infarction. Potential mechanisms and early predictors. *Circulation*. 1993;87:755-763.
24. White HD, Norris RM, Brown MA, Brandt PW, Whitlock RM, Wild CJ. Left ventricular end-systolic volume as the major determinant of survival after recovery from myocardial infarction. *Circulation*. 1987;76:44-51.

25. Kostin S, Hein S, Arnon E, Scholz D, Schaper J. The cytoskeleton and related proteins in the human failing heart. *Heart Fail Rev.* 2000;5:271-280.
26. Sharov VG, Kostin S, Todor A, Schaper J, Sabbah HN. Expression of cytoskeletal, linkage and extracellular proteins in failing dog myocardium. *Heart Fail Rev.* 2005;10:297-303.
27. Olivetti G, Abbi R, Quaini F, Kajstura J, Cheng W, Nitahara JA, Quaini E, Di Loreto C, Beltrami CA, Krajewski S, Reed JC, Anversa P. Apoptosis in the failing human heart. *N Engl J Med.* 1997;336:1131-1141.
28. Sharov VG, Sabbah HN, Shimoyama H, Goussev AV, Lesch M, Goldstein S. Evidence of cardiocyte apoptosis in myocardium of dogs with chronic heart failure. *Am J Pathol.* 1996;148:141-149.
29. Anversa P, Olivetti G, Capasso JM. Cellular basis of ventricular remodeling after myocardial infarction. *Am J Cardiol.* 1991;68:7D-16D.
30. Grossman W, Jones D, McLaurin LP. Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. *J Clin Invest.* 1975;56:56-64.
31. Miner EC, Miller WL. A look between the cardiomyocytes: the extracellular matrix in heart failure. *Mayo Clin Proc.* 2006;81:71-76.
32. Segura AM, Frazier OH, Buja LM. Fibrosis and heart failure. *Heart Fail Rev.* 2014;19:173-185.
33. Weber KT, Pick R, Jalil JE, Janicki JS, Carroll EP. Patterns of myocardial fibrosis. *J Mol Cell Cardiol.* 1989;21 Suppl 5:121-131.
34. Kong P, Christia P, Frangogiannis NG. The pathogenesis of cardiac fibrosis. *Cell Mol Life Sci.* 2014;71:549-574.
35. Li AH, Liu PP, Villarreal FJ, Garcia RA. Dynamic changes in myocardial matrix and relevance to disease: translational perspectives. *Circ Res.* 2014;114:916-927.
36. Konstam MA, Kramer DG, Patel AR, Maron MS, Udelson JE. Left ventricular remodeling in heart failure: current concepts in clinical significance and assessment. *JACC Cardiovasc Imaging.* 2011;4:98-108.
37. Brilla CG, Zhou G, Matsubara L, Weber KT. Collagen metabolism in cultured adult rat cardiac fibroblasts: response to angiotensin II and aldosterone. *J Mol Cell Cardiol.* 1994;26:809-820.
38. Sackner-Bernstein JD. The myocardial matrix and the development and progression of ventricular remodeling. *Curr Cardiol Rep.* 2000;2:112-119.
39. Little WC, Applegate RJ. Congestive heart failure: systolic and diastolic function. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* 1993;7:2-5.

40. Spinale FG, Tomita M, Zellner JL, Cook JC, Crawford FA, Zile MR. Collagen remodeling and changes in LV function during development and recovery from supraventricular tachycardia. *Am J Physiol.* 1991;261:H308-318.
41. Heymans S, Gonzalez A, Pizard A, Papageorgiou AP, Lopez-Andres N, Jaisser F, Thum T, Zannad F, Diez J. Searching for new mechanisms of myocardial fibrosis with diagnostic and/or therapeutic potential. *Eur J Heart Fail.* 2015;17:764-771.
42. Gyongyosi M, Winkler J, Ramos I, Do QT, Firat H, McDonald K, Gonzalez A, Thum T, Diez J, Jaisser F, Pizard A, Zannad F. Myocardial fibrosis: biomedical research from bench to bedside. *Eur J Heart Fail.* 2017;19:177-191.
43. Zhang JM, An J. Cytokines, inflammation, and pain. *Int Anesthesiol Clin.* 2007;45:27-37.
44. Gullestad L, Aukrust P. Review of trials in chronic heart failure showing broad-spectrum anti-inflammatory approaches. *Am J Cardiol.* 2005;95:17C-23C; discussion 38C-40C.
45. Mann DL. Innate immunity and the failing heart: the cytokine hypothesis revisited. *Circ Res.* 2015;116:1254-1268.
46. Feuchtenberger M, Kneitz C, Tony H. Zytokine. *Z Rheumatol.* 2007;66:297-303.
47. Lower R. *Tractatus De Corde: Item De Motu Et Colore Sanguinis* 1669.
48. Torre-Amione G, Kapadia S, Benedict C, Oral H, Young JB, Mann DL. Proinflammatory cytokine levels in patients with depressed left ventricular ejection fraction: a report from the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD). *J Am Coll Cardiol.* 1996;27:1201-1206.
49. Levine B, Kalman J, Mayer L, Fillit HM, Packer M. Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure. *N Engl J Med.* 1990;323:236-241.
50. Seta Y, Shan K, Bozkurt B, Oral H, Mann DL. Basic mechanisms in heart failure: the cytokine hypothesis. *J Card Fail.* 1996;2:243-249.
51. Shirazi LF, Bissett J, Romeo F, Mehta JL. Role of Inflammation in Heart Failure. *Curr Atheroscler Rep.* 2017;19:27.
52. Aukrust P, Gullestad L, Lappegard KT, Ueland T, Aass H, Wikeby L, Simonsen S, Froland SS, Mollnes TE. Complement activation in patients with congestive heart failure: effect of high-dose intravenous immunoglobulin treatment. *Circulation.* 2001;104:1494-1500.
53. Diwan A, Tran T, Misra A, Mann DL. Inflammatory mediators and the failing heart: a translational approach. *Curr Mol Med.* 2003;3:161-182.
54. Caforio AL, Mahon NG, Baig MK, Tona F, Murphy RT, Elliott PM, McKenna WJ. Prospective familial assessment in dilated cardiomyopathy: cardiac autoantibodies predict disease development in asymptomatic relatives. *Circulation.* 2007;115:76-83.

55. Anker SD, von Haehling S. Inflammatory mediators in chronic heart failure: an overview. *Heart*. 2004;90:464-470.
56. El-Menyar AA. Cytokines and myocardial dysfunction: state of the art. *J Card Fail*. 2008;14:61-74.
57. Hedayat M, Mahmoudi MJ, Rose NR, Rezaei N. Proinflammatory cytokines in heart failure: double-edged swords. *Heart Fail Rev*. 2010;15:543-562.
58. Mann DL. Inflammatory mediators and the failing heart: past, present, and the foreseeable future. *Circ Res*. 2002;91:988-998.
59. Satoh M, Minami Y, Takahashi Y, Nakamura M. Immune modulation: role of the inflammatory cytokine cascade in the failing human heart. *Curr Heart Fail Rep*. 2008;5:69-74.
60. von Haehling S, Schefold JC, Lainscak M, Doehner W, Anker SD. Inflammatory biomarkers in heart failure revisited: much more than innocent bystanders. *Heart Fail Clin*. 2009;5:549-560.
61. Vasan RS, Sullivan LM, Roubenoff R, Dinarello CA, Harris T, Benjamin EJ, Sawyer DB, Levy D, Wilson PW, D'Agostino RB. Inflammatory markers and risk of heart failure in elderly subjects without prior myocardial infarction: the Framingham Heart Study. *Circulation*. 2003;107:1486-1491.
62. Bozkurt B, Kribbs SB, Clubb FJ, Jr., Michael LH, Didenko VV, Hornsby PJ, Seta Y, Oral H, Spinale FG, Mann DL. Pathophysiologically relevant concentrations of tumor necrosis factor-alpha promote progressive left ventricular dysfunction and remodeling in rats. *Circulation*. 1998;97:1382-1391.
63. Polunovsky VA, Wendt CH, Ingbar DH, Peterson MS, Bitterman PB. Induction of endothelial cell apoptosis by TNF alpha: modulation by inhibitors of protein synthesis. *Exp Cell Res*. 1994;214:584-594.
64. Braunwald E. Biomarkers in heart failure. *N Engl J Med*. 2008;358:2148-2159.
65. Petersen JW, Felker GM. Inflammatory biomarkers in heart failure. *Congest Heart Fail*. 2006;12:324-328.
66. Hirota H, Izumi M, Hamaguchi T, Sugiyama S, Murakami E, Kunisada K, Fujio Y, Oshima Y, Nakaoka Y, Yamauchi-Takahara K. Circulating interleukin-6 family cytokines and their receptors in patients with congestive heart failure. *Heart Vessels*. 2004;19:237-241.
67. Kubota T, Miyagishima M, Alvarez RJ, Kormos R, Rosenblum WD, Demetris AJ, Semigran MJ, Dec GW, Holubkov R, McTiernan CF, Mann DL, Feldman AM, McNamara DM. Expression of proinflammatory cytokines in the failing human heart: comparison of recent-onset and end-stage congestive heart failure. *J Heart Lung Transplant*. 2000;19:819-824.

68. Aukrust P, Ueland T, Lien E, Bendtzen K, Muller F, Andreassen AK, Nordoy I, Aass H, Espevik T, Simonsen S, Froland SS, Gullestad L. Cytokine network in congestive heart failure secondary to ischemic or idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol.* 1999;83:376-382.
69. Deswal A, Petersen NJ, Feldman AM, Young JB, White BG, Mann DL. Cytokines and cytokine receptors in advanced heart failure: an analysis of the cytokine database from the Vesnarinone trial (VEST). *Circulation.* 2001;103:2055-2059.
70. Sasayama S, Matsumori A, Kihara Y. New insights into the pathophysiological role for cytokines in heart failure. *Cardiovasc Res.* 1999;42:557-564.
71. Gullestad L, Ueland T, Vinge LE, Finsen A, Yndestad A, Aukrust P. Inflammatory cytokines in heart failure: mediators and markers. *Cardiology.* 2012;122:23-35.
72. Yokoyama T, Vaca L, Rossen RD, Durante W, Hazarika P, Mann DL. Cellular basis for the negative inotropic effects of tumor necrosis factor-alpha in the adult mammalian heart. *J Clin Invest.* 1993;92:2303-2312.
73. Panas D, Khadour FH, Szabó C, Schulz R. Proinflammatory cytokines depress cardiac efficiency by a nitric oxide-dependent mechanism. *Am J Physiol.* 1998;275:H1016-1023.
74. Zhang C. The role of inflammatory cytokines in endothelial dysfunction. *Basic research in cardiology.* 2008;103:398-406.
75. Mann DL, McMurray JJ, Packer M, Swedberg K, Borer JS, Colucci WS, Djian J, Drexler H, Feldman A, Kober L, Krum H, Liu P, Nieminen M, Tavazzi L, van Veldhuisen DJ, Waldenstrom A, Warren M, Westheim A, Zannad F, Fleming T. Targeted anticytokine therapy in patients with chronic heart failure: results of the Randomized Etanercept Worldwide Evaluation (RENEWAL). *Circulation.* 2004;109:1594-1602.
76. Chung ES, Packer M, Lo KH, Fasanmade AA, Willerson JT, Anti TNFTACHFI. Randomized, double-blind, placebo-controlled, pilot trial of infliximab, a chimeric monoclonal antibody to tumor necrosis factor-alpha, in patients with moderate-to-severe heart failure: results of the anti-TNF Therapy Against Congestive Heart Failure (ATTACH) trial. *Circulation.* 2003;107:3133-3140.
77. Anker SD, Coats AJ. How to RECOVER from RENAISSANCE? The significance of the results of RECOVER, RENAISSANCE, RENEWAL and ATTACH. *Int J Cardiol.* 2002;86:123-130.
78. Mann DL. Targeted anticytokine therapy and the failing heart. *Am J Cardiol.* 2005;95:9C-16C; discussion 38C-40C.
79. Flores-Arredondo JH, Garcia-Rivas G, Torre-Amione G. Immune modulation in heart failure: past challenges and future hopes. *Curr Heart Fail Rep.* 2011;8:28-37.

80. Coletta AP, Clark AL, Banarjee P, Cleland JG. Clinical trials update: RENEWAL (RENAISSANCE and RECOVER) and ATTACH. *Eur J Heart Fail.* 2002;4:559-561.
81. Wood S. RENEWAL trial: no improvement in CHF with etanercept 2002 [24. Juni 2021]. Available from: <https://www.medscape.com/viewarticle/786091>.
82. Lecour S, James RW. When are pro-inflammatory cytokines SAFE in heart failure? *Eur Heart J.* 2011;32:680-685.
83. Hilfiker-Kleiner D, Shukla P, Klein G, Schaefer A, Stapel B, Hoch M, Müller W, Scherr M, Theilmeier G, Ernst M, Hilfiker A, Drexler H. Continuous glycoprotein-130-mediated signal transducer and activator of transcription-3 activation promotes inflammation, left ventricular rupture, and adverse outcome in subacute myocardial infarction. *Circulation.* 2010;122:145-155.
84. Luchner A, Holmer S, Schunkert H, Riegger G. Bedeutung der Herzinsuffizienzmarker BNP und NT-proBNP für die Klinik. *Dtsch Arztebl International.* 2003;100:A334-321.
85. Hunt PJ, Richards AM, Nicholls MG, Yandle TG, Doughty RN, Espiner EA. Immunoreactive amino-terminal pro-brain natriuretic peptide (NT-PROBNP): a new marker of cardiac impairment. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1997;47:287-296.
86. Croci DO, Cerliani JP, Dalotto-Moreno T, Méndez-Huergo SP, Mascanfroni ID, Dergan-Dylon S, Toscano MA, Caramelo JJ, García-Vallejo JJ, Ouyang J, Mesri EA, Junttila MR, Bais C, Shipp MA, Salatino M, Rabinovich GA. Glycosylation-dependent lectin-receptor interactions preserve angiogenesis in anti-VEGF refractory tumors. *Cell.* 2014;156:744-758.
87. Seropian IM, Cerliani JP, Toldo S, Van Tassell BW, Ilarregui JM, Gonzalez GE, Matoso M, Salloum FN, Melchior R, Gelpi RJ, Stupirski JC, Benatar A, Gomez KA, Morales C, Abbate A, Rabinovich GA. Galectin-1 controls cardiac inflammation and ventricular remodeling during acute myocardial infarction. *Am J Pathol.* 2013;182:29-40.
88. Spieker LE, Noll G, Ruschitzka FT, Lüscher TF. Endothelin receptor antagonists in congestive heart failure: a new therapeutic principle for the future? *J Am Coll Cardiol.* 2001;37:1493-1505.
89. Grothues F, Smith GC, Moon JC, Bellenger NG, Collins P, Klein HU, Pennell DJ. Comparison of interstudy reproducibility of cardiovascular magnetic resonance with two-dimensional echocardiography in normal subjects and in patients with heart failure or left ventricular hypertrophy. *Am J Cardiol.* 2002;90:29-34.
90. Ruff J, Wiesmann F, Hiller KH, Voll S, von Kienlin M, Bauer WR, Rommel E, Neubauer S, Haase A. Magnetic resonance microimaging for noninvasive quantification of myocardial function and mass in the mouse. *Magn Reson Med.* 1998;40:43-48.

91. Hiller KH, Waller C, Haase A, Jakob PM. Magnetic resonance of mouse models of cardiac disease. *Handb Exp Pharmacol*. 2008;245-257.
92. Epstein FH. MR in mouse models of cardiac disease. *NMR Biomed*. 2007;20:238-255.
93. Wiesmann F, Ruff J, Hiller KH, Rommel E, Haase A, Neubauer S. Developmental changes of cardiac function and mass assessed with MRI in neonatal, juvenile, and adult mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000;278:H652-657.
94. Pandey A, Patel KV, Vaduganathan M, Sarma S, Haykowsky MJ, Berry JD, Lavie CJ. Physical Activity, Fitness, and Obesity in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *JACC Heart failure*. 2018;6:975-982.
95. Borlaug BA, Redfield MM. Diastolic and systolic heart failure are distinct phenotypes within the heart failure spectrum. *Circulation*. 2011;123:2006-2013; discussion 2014.
96. Dinh W, F  th R, Nickl W, Krahn T, Ellinghaus P, Scheffold T, Bansemir L, Bufe A, Barroso MC, Lankisch M. Elevated plasma levels of TNF-alpha and interleukin-6 in patients with diastolic dysfunction and glucose metabolism disorders. *Cardiovasc Diabetol*. 2009;8:58.
97. Gullestad L, Aass H, Fjeld JG, Wikeby L, Andreassen AK, Ihlen H, Simonsen S, Kjekshus J, Nitter-Hauge S, Ueland T, Lien E, Froland SS, Aukrust P. Immunomodulating therapy with intravenous immunoglobulin in patients with chronic heart failure. *Circulation*. 2001;103:220-225.
98. McNamara DM, Holubkov R, Starling RC, Dec GW, Loh E, Torre-Amione G, Gass A, Janosko K, Tokarczyk T, Kessler P, Mann DL, Feldman AM. Controlled trial of intravenous immune globulin in recent-onset dilated cardiomyopathy. *Circulation*. 2001;103:2254-2259.
99. McNamara DM, Rosenblum WD, Janosko KM, Trost MK, Villaneuva FS, Demetris AJ, Murali S, Feldman AM. Intravenous immune globulin in the therapy of myocarditis and acute cardiomyopathy. *Circulation*. 1997;95:2476-2478.
100. Oppenheim J, Feldmann M. *Cytokine Reference: A Compendium of Cytokines and Other Mediators of Host Defense*: Academic Press Inc; 2000. 2260 p.
101. Heinrich CP. Review - Principles of IL-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J*. 2003.
102. Wollert KC, Drexler H. The role of interleukin-6 in the failing heart. *Heart Fail Rev*. 2001;6:95-103.
103. Kishimoto T, Akira S, Narazaki M, Taga T. Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood*. 1995;86:1243-1254.
104. Pang G, Couch L, Batey R, Clancy R, Cripps A. GM-CSF, IL-1 alpha, IL-1 beta, IL-6, IL-8, IL-10, ICAM-1 and VCAM-1 gene expression and cytokine production in human

- duodenal fibroblasts stimulated with lipopolysaccharide, IL-1 alpha and TNF-alpha. *Clin Exp Immunol.* 1994;96:437-443.
105. Ogura H, Murakami M, Okuyama Y, Tsuruoka M, Kitabayashi C, Kanamoto M, Nishihara M, Iwakura Y, Hirano T. Interleukin-17 promotes autoimmunity by triggering a positive-feedback loop via interleukin-6 induction. *Immunity.* 2008;29:628-636.
106. Naugler WE, Karin M. The wolf in sheep's clothing: the role of interleukin-6 in immunity, inflammation and cancer. *Trends Mol Med.* 2008;14:109-119.
107. Fontes JA, Rose NR, Cihakova D. The varying faces of IL-6: From cardiac protection to cardiac failure. *Cytokine.* 2015;74:62-68.
108. May P, Schniertshauer U, Gerhartz C, Horn F, Heinrich PC. Signal transducer and activator of transcription STAT3 plays a major role in gp130-mediated acute phase protein gene activation. *Acta Biochim Pol.* 2003;50:595-601.
109. Fattori E, Cappelletti M, Costa P, Sellitto C, Cantoni L, Carelli M, Faggioni R, Fantuzzi G, Ghezzi P, Poli V. Defective inflammatory response in interleukin 6-deficient mice. *J Exp Med.* 1994;180:1243-1250.
110. Camporeale A, Poli V. IL-6, IL-17 and STAT3: a holy trinity in auto-immunity? *Frontiers in bioscience (Landmark edition).* 2012;17:2306-2326.
111. Swaak AJ, van Rooyen A, Aarden LA. Interleukin-6 (IL-6) and acute phase proteins in the disease course of patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int.* 1989;8:263-268.
112. Hirano T. Interleukin 6 in autoimmune and inflammatory diseases: a personal memoir. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2010;86:717-730.
113. Mohler ER, 3rd, Sorensen LC, Ghali JK, Schocken DD, Willis PW, Bowers JA, Cropp AB, Pressler ML. Role of cytokines in the mechanism of action of amlodipine: the PRAISE Heart Failure Trial. Prospective Randomized Amlodipine Survival Evaluation. *J Am Coll Cardiol.* 1997;30:35-41.
114. MacGowan GA, Mann DL, Kormos RL, Feldman AM, Murali S. Circulating interleukin-6 in severe heart failure. *Am J Cardiol.* 1997;79:1128-1131.
115. Raymond RJ, Dehmer GJ, Theoharides TC, Deliangyris EN. Elevated interleukin-6 levels in patients with asymptomatic left ventricular systolic dysfunction. *Am Heart J.* 2001;141:435-438.
116. Roig E, Orus J, Pare C, Azqueta M, Filella X, Perez-Villa F, Heras M, Sanz G. Serum interleukin-6 in congestive heart failure secondary to idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol.* 1998;82:688-690, A688.

117. Pan JP, Liu TY, Chiang SC, Lin YK, Chou CY, Chan WL, Lai ST. The value of plasma levels of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 in predicting the severity and prognosis in patients with congestive heart failure. *J Chin Med Assoc.* 2004;67:222-228.
118. Chin BS, Blann AD, Gibbs CR, Chung NA, Conway DG, Lip GY. Prognostic value of interleukin-6, plasma viscosity, fibrinogen, von Willebrand factor, tissue factor and vascular endothelial growth factor levels in congestive heart failure. *Eur J Clin Invest.* 2003;33:941-948.
119. Harris TB, Ferrucci L, Tracy RP, Corti MC, Wacholder S, Ettinger WH, Jr., Heimovitz H, Cohen HJ, Wallace R. Associations of elevated interleukin-6 and C-reactive protein levels with mortality in the elderly. *Am J Med.* 1999;106:506-512.
120. Orus J, Roig E, Perez-Villa F, Pare C, Azqueta M, Filella X, Heras M, Sanz G. Prognostic value of serum cytokines in patients with congestive heart failure. *J Heart Lung Transplant.* 2000;19:419-425.
121. Rauchhaus M, Doehner W, Francis DP, Davos C, Kemp M, Liebenthal C, Niebauer J, Hooper J, Volk HD, Coats AJ, Anker SD. Plasma cytokine parameters and mortality in patients with chronic heart failure. *Circulation.* 2000;102:3060-3067.
122. Maeda K, Tsutamoto T, Wada A, Mabuchi N, Hayashi M, Tsutsui T, Ohnishi M, Sawaki M, Fujii M, Matsumoto T, Kinoshita M. High levels of plasma brain natriuretic peptide and interleukin-6 after optimized treatment for heart failure are independent risk factors for morbidity and mortality in patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 2000;36:1587-1593.
123. Liu M, Chen J, Huang D, Ke J, Wu W. A meta-analysis of proinflammatory cytokines in chronic heart failure. *Heart Asia.* 2014;6:130-136.
124. Haugen E, Gan LM, Isic A, Skommevik T, Fu M. Increased interleukin-6 but not tumour necrosis factor-alpha predicts mortality in the population of elderly heart failure patients. *Exp Clin Cardiol.* 2008;13:19-24.
125. Meléndez GC, McLarty JL, Levick SP, Du Y, Janicki JS, Brower GL. Interleukin 6 mediates myocardial fibrosis, concentric hypertrophy, and diastolic dysfunction in rats. *Hypertension.* 2010;56:225-231.
126. Patten M, Krämer E, Bünemann J, Wenck C, Thoenes M, Wieland T, Long C. Endotoxin and cytokines alter contractile protein expression in cardiac myocytes in vivo. *Pflugers Arch.* 2001;442:920-927.
127. Villegas S, Villarreal FJ, Dillmann WH. Leukemia Inhibitory Factor and Interleukin-6 downregulate sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase (SERCA2) in cardiac myocytes. *Basic research in cardiology.* 2000;95:47-54.

128. Finkel MS, Oddis CV, Jacob TD, Watkins SC, Hattler BG, Simmons RL. Negative inotropic effects of cytokines on the heart mediated by nitric oxide. *Science*. 1992;257:387-389.
129. Janssen SP, Gayan-Ramirez G, Van den Bergh A, Herijgers P, Maes K, Verbeken E, Decramer M. Interleukin-6 causes myocardial failure and skeletal muscle atrophy in rats. *Circulation*. 2005;111:996-1005.
130. Coles B, Fielding CA, Rose-John S, Scheller J, Jones SA, O'Donnell VB. Classic interleukin-6 receptor signaling and interleukin-6 trans-signaling differentially control angiotensin II-dependent hypertension, cardiac signal transducer and activator of transcription-3 activation, and vascular hypertrophy in vivo. *Am J Pathol*. 2007;171:315-325.
131. Yamauchi-Takahara K, Kishimoto T. Cytokines and their receptors in cardiovascular diseases--role of gp130 signalling pathway in cardiac myocyte growth and maintenance. *Int J Exp Pathol*. 2000;81:1-16.
132. Dawn B, Xuan YT, Guo Y, Rezazadeh A, Stein AB, Hunt G, Wu WJ, Tan W, Bolli R. IL-6 plays an obligatory role in late preconditioning via JAK-STAT signaling and upregulation of iNOS and COX-2. *Cardiovasc Res*. 2004;64:61-71.
133. Smart N, Mojet MH, Latchman DS, Marber MS, Duchon MR, Heads RJ. IL-6 induces PI 3-kinase and nitric oxide-dependent protection and preserves mitochondrial function in cardiomyocytes. *Cardiovasc Res*. 2006;69:164-177.
134. Lecour S. Activation of the protective Survivor Activating Factor Enhancement (SAFE) pathway against reperfusion injury: Does it go beyond the RISK pathway? *J Mol Cell Cardiol*. 2009;47:32-40.
135. Gwechenberger M, Mendoza LH, Youker KA, Frangogiannis NG, Smith CW, Michael LH, Entman ML. Cardiac myocytes produce interleukin-6 in culture and in viable border zone of reperfused infarctions. *Circulation*. 1999;99:546-551.
136. Xuan YT, Guo Y, Han H, Zhu Y, Bolli R. An essential role of the JAK-STAT pathway in ischemic preconditioning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98:9050-9055.
137. Kishimoto T, Akira S, Taniuchi T. Interleukin-6 and its receptor: a paradigm for cytokines. *Science*. 1992;258:593-597.
138. Rose-John S. Coordination of interleukin-6 biology by membrane bound and soluble receptors. *Adv Exp Med Biol*. 2001;495:145-151.
139. Novick D, Engelmann H, Wallach D, Rubinstein M. Soluble cytokine receptors are present in normal human urine. *J Exp Med*. 1989;170:1409-1414.

140. Akira S, Isshiki H, Sugita T, Tanabe O, Kinoshita S, Nishio Y, Nakajima T, Hirano T, Kishimoto T. A nuclear factor for IL-6 expression (NF-IL6) is a member of a C/EBP family. *The EMBO journal*. 1990;9:1897-1906.
141. Akira S, Nishio Y, Inoue M, Wang XJ, Wei S, Matsusaka T, Yoshida K, Sudo T, Naruto M, Kishimoto T. Molecular cloning of APRF, a novel IFN-stimulated gene factor 3 p91-related transcription factor involved in the gp130-mediated signaling pathway. *Cell*. 1994;77:63-71.
142. Hirota H, Chen J, Betz UA, Rajewsky K, Gu Y, Ross J, Jr., Muller W, Chien KR. Loss of a gp130 cardiac muscle cell survival pathway is a critical event in the onset of heart failure during biomechanical stress. *Cell*. 1999;97:189-198.
143. Hirano T. Signaling Mechanisms Through gp130: A Model of the Cytokine System. *Cytokine Growth Factor Rev*. 1997.
144. Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1813:878-888.
145. Fischer P, Hilfiker-Kleiner D. Role of gp130-mediated signalling pathways in the heart and its impact on potential therapeutic aspects. *Br J Pharmacol*. 2008;153 Suppl 1:S414-427.
146. Yao X, Huang J, Zhong H, Shen N, Faggioni R, Fung M, Yao Y. Targeting interleukin-6 in inflammatory autoimmune diseases and cancers. *Pharmacol Ther*. 2014;141:125-139.
147. Hirota H, Yoshida K, Kishimoto T, Taga T. Continuous activation of gp130, a signal-transducing receptor component for interleukin 6-related cytokines, causes myocardial hypertrophy in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995;92:4862-4866.
148. Rose-John S, Scheller J, Elson G, Jones SA. Interleukin-6 biology is coordinated by membrane-bound and soluble receptors: role in inflammation and cancer. *J Leukoc Biol*. 2006;80:227-236.
149. Rose-John S. IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: importance for the pro-inflammatory activities of IL-6. *Int J Biol Sci*. 2012;8:1237-1247.
150. Fischer P, Hilfiker-Kleiner D. Survival pathways in hypertrophy and heart failure: the gp130-STAT3 axis. *Basic research in cardiology*. 2007;102:279-297.
151. Wolf J, Rose-John S, Garbers C. Interleukin-6 and its receptors: a highly regulated and dynamic system. *Cytokine*. 2014;70:11-20.
152. Kurdi M, Booz GW. JAK redux: a second look at the regulation and role of JAKs in the heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009;297:H1545-1556.

153. Schmitz J, Weissenbach M, Haan S, Heinrich PC, Schaper F. SOCS3 exerts its inhibitory function on interleukin-6 signal transduction through the SHP2 recruitment site of gp130. *J Biol Chem.* 2000;275:12848-12856.
154. Ilangumaran S, Ramanathan S, Rottapel R. Regulation of the immune system by SOCS family adaptor proteins. *Semin Immunol.* 2004;16:351-365.
155. Yoshimura A, Naka T, Kubo M. SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. *Nat Rev Immunol.* 2007;7:454-465.
156. Ernst M, Jenkins BJ. Acquiring signalling specificity from the cytokine receptor gp130. *Trends Genet.* 2004;20:23-32.
157. Johnston JA. Are SOCS suppressors, regulators, and degraders? *J Leukoc Biol.* 2004;75:743-748.
158. Jostock T, Mullberg J, Ozbek S, Atreya R, Blinn G, Voltz N, Fischer M, Neurath MF, Rose-John S. Soluble gp130 is the natural inhibitor of soluble interleukin-6 receptor transsignaling responses. *Eur J Biochem.* 2001;268:160-167.
159. Nishimoto N, Kishimoto T. Humanized antihuman IL-6 receptor antibody, tocilizumab. *Handb Exp Pharmacol.* 2008:151-160.
160. Sato K, Tsuchiya M, Saldanha J, Koishihara Y, Ohsugi Y, Kishimoto T, Bendig MM. Reshaping a human antibody to inhibit the interleukin 6-dependent tumor cell growth. *Cancer Res.* 1993;53:851-856.
161. Mihara M, Kasutani K, Okazaki M, Nakamura A, Kawai S, Sugimoto M, Matsumoto Y, Ohsugi Y. Tocilizumab inhibits signal transduction mediated by both mIL-6R and sIL-6R, but not by the receptors of other members of IL-6 cytokine family. *Int Immunopharmacol.* 2005;5:1731-1740.
162. Ohsugi Y, Kishimoto T. The recombinant humanized anti-IL-6 receptor antibody tocilizumab, an innovative drug for the treatment of rheumatoid arthritis. *Expert Opin Biol Ther.* 2008;8:669-681.
163. Amatya N, Garg AV, Gaffen SL. IL-17 Signaling: The Yin and the Yang. *Trends Immunol.* 2017;38:310-322.
164. Gaffen SL. Structure and signalling in the IL-17 receptor family. *Nat Rev Immunol.* 2009;9:556-567.
165. Yan X, Shichita T, Katsumata Y, Matsushashi T, Ito H, Ito K, Anzai A, Endo J, Tamura Y, Kimura K, Fujita J, Shinmura K, Shen W, Yoshimura A, Fukuda K, Sano M. Deleterious effect of the IL-23/IL-17A axis and $\gamma\delta$ T cells on left ventricular remodeling after myocardial infarction. *Journal of the American Heart Association.* 2012;1:e004408.

166. Wu L, Ong S, Talor MV, Barin JG, Baldeviano GC, Kass DA, Bedja D, Zhang H, Sheikh A, Margolick JB, Iwakura Y, Rose NR, Ciháková D. Cardiac fibroblasts mediate IL-17A-driven inflammatory dilated cardiomyopathy. *J Exp Med*. 2014;211:1449-1464.
167. Laan M, Cui ZH, Hoshino H, Lotvall J, Sjostrand M, Gruenert DC, Skoogh BE, Linden A. Neutrophil recruitment by human IL-17 via C-X-C chemokine release in the airways. *J Immunol*. 1999;162:2347-2352.
168. Qiu Z, Dillen C, Hu J, Verbeke H, Struyf S, Van Damme J, Opdenakker G. Interleukin-17 regulates chemokine and gelatinase B expression in fibroblasts to recruit both neutrophils and monocytes. *Immunobiology*. 2009;214:835-842.
169. Maddur MS, Miossec P, Kaveri SV, Bayry J. Th17 cells: biology, pathogenesis of autoimmune and inflammatory diseases, and therapeutic strategies. *Am J Pathol*. 2012;181:8-18.
170. Miossec P, Kolls JK. Targeting IL-17 and TH17 cells in chronic inflammation. *Nature reviews Drug discovery*. 2012;11:763-776.
171. Fossiez F, Djossou O, Chomarat P, Flores-Romo L, Ait-Yahia S, Maat C, Pin JJ, Garrone P, Garcia E, Saeland S, Blanchard D, Gaillard C, Das Mahapatra B, Rouvier E, Golstein P, Banchereau J, Lebecque S. T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J Exp Med*. 1996;183:2593-2603.
172. Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, Wang Y, Hood L, Zhu Z, Tian Q, Dong C. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol*. 2005;6:1133-1141.
173. Yao Z, Fanslow WC, Seldin MF, Rousseau AM, Painter SL, Comeau MR, Cohen JJ, Spriggs MK. Herpesvirus Saimiri encodes a new cytokine, IL-17, which binds to a novel cytokine receptor. *Immunity*. 1995;3:811-821.
174. Nakano K, Yamaoka K, Hanami K, Saito K, Sasaguri Y, Yanagihara N, Tanaka S, Katsuki I, Matsushita S, Tanaka Y. Dopamine induces IL-6-dependent IL-17 production via D1-like receptor on CD4 naive T cells and D1-like receptor antagonist SCH-23390 inhibits cartilage destruction in a human rheumatoid arthritis/SCID mouse chimera model. *J Immunol*. 2011;186:3745-3752.
175. Durant L, Watford WT, Ramos HL, Laurence A, Vahedi G, Wei L, Takahashi H, Sun HW, Kanno Y, Powrie F, O'Shea JJ. Diverse targets of the transcription factor STAT3 contribute to T cell pathogenicity and homeostasis. *Immunity*. 2010;32:605-615.
176. Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity*. 2006;24:179-189.

177. Zhou L, Ivanov, II, Spolski R, Min R, Shenderov K, Egawa T, Levy DE, Leonard WJ, Littman DR. IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat Immunol.* 2007;8:967-974.
178. Baldeviano GC, Barin JG, Talor MV, Srinivasan S, Bedja D, Zheng D, Gabrielson K, Iwakura Y, Rose NR, Cihakova D. Interleukin-17A is dispensable for myocarditis but essential for the progression to dilated cardiomyopathy. *Circ Res.* 2010;106:1646-1655.
179. Haines CJ, Chen Y, Blumenschein WM, Jain R, Chang C, Joyce-Shaikh B, Porth K, Boniface K, Mattson J, Basham B, Anderton SM, McClanahan TK, Sadekova S, Cua DJ, McGeachy MJ. Autoimmune memory T helper 17 cell function and expansion are dependent on interleukin-23. *Cell reports.* 2013;3:1378-1388.
180. McGeachy MJ, Chen Y, Tato CM, Laurence A, Joyce-Shaikh B, Blumenschein WM, McClanahan TK, O'Shea JJ, Cua DJ. The interleukin 23 receptor is essential for the terminal differentiation of interleukin 17-producing effector T helper cells in vivo. *Nat Immunol.* 2009;10:314-324.
181. Gaffen SL. The role of interleukin-17 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Curr Rheumatol Rep.* 2009;11:365-370.
182. Kuwabara T, Ishikawa F, Kondo M, Kakiuchi T. The Role of IL-17 and Related Cytokines in Inflammatory Autoimmune Diseases. *Mediators Inflamm.* 2017;2017:3908061.
183. Liao YH, Xia N, Zhou SF, Tang TT, Yan XX, Lv BJ, Nie SF, Wang J, Iwakura Y, Xiao H, Yuan J, Jevallee H, Wei F, Shi GP, Cheng X. Interleukin-17A contributes to myocardial ischemia/reperfusion injury by regulating cardiomyocyte apoptosis and neutrophil infiltration. *J Am Coll Cardiol.* 2012;59:420-429.
184. Madhur MS, Lob HE, McCann LA, Iwakura Y, Blinder Y, Guzik TJ, Harrison DG. Interleukin 17 promotes angiotensin II-induced hypertension and vascular dysfunction. *Hypertension.* 2010;55:500-507.
185. Li XF, Pan D, Zhang WL, Zhou J, Liang JJ. Association of NT-proBNP and interleukin-17 levels with heart failure in elderly patients. *Genet Mol Res.* 2016;15.
186. Rahmati Z, Amirzargar AA, Saadati S, Rahmani F, Mahmoudi MJ, Rahnemoon Z, Eskandari V, Gorzin F, Hedayat M, Rezaei N. Association of levels of interleukin 17 and T-helper 17 count with symptom severity and etiology of chronic heart failure: a case-control study. *Croat Med J.* 2018;59:139-148.
187. Zhou SF, Yuan J, Liao MY, Xia N, Tang TT, Li JJ, Jiao J, Dong WY, Nie SF, Zhu ZF, Zhang WC, Lv BJ, Xiao H, Wang Q, Tu X, Liao YH, Shi GP, Cheng X. IL-17A promotes ventricular remodeling after myocardial infarction. *J Mol Med (Berl).* 2014;92:1105-1116.

188. Feng W, Li W, Liu W, Wang F, Li Y, Yan W. IL-17 induces myocardial fibrosis and enhances RANKL/OPG and MMP/TIMP signaling in isoproterenol-induced heart failure. *Exp Mol Pathol.* 2009;87:212-218.
189. Gaffen SL, Jain R, Garg AV, Cua DJ. The IL-23-IL-17 immune axis: from mechanisms to therapeutic testing. *Nat Rev Immunol.* 2014;14:585-600.
190. Sano M, Wang SC, Shirai M, Scaglia F, Xie M, Sakai S, Tanaka T, Kulkarni PA, Barger PM, Youker KA, Taffet GE, Hamamori Y, Michael LH, Craigen WJ, Schneider MD. Activation of cardiac Cdk9 represses PGC-1 and confers a predisposition to heart failure. *The EMBO journal.* 2004;23:3559-3569.
191. D'Angelo DD, Sakata Y, Lorenz JN, Boivin GP, Walsh RA, Liggett SB, Dorn GW, 2nd. Transgenic Galphaq overexpression induces cardiac contractile failure in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1997;94:8121-8126.
192. Fiedler LR, Maifoshie E, Schneider MD. Mouse models of heart failure: cell signaling and cell survival. *Curr Top Dev Biol.* 2014;109:171-247.
193. Savvatis K, Muller I, Frohlich M, Pappritz K, Zietsch C, Hamdani N, Grote K, Schieffer B, Klingel K, Van Linthout S, Linke WA, Schultheiss HP, Tschope C. Interleukin-6 receptor inhibition modulates the immune reaction and restores titin phosphorylation in experimental myocarditis. *Basic research in cardiology.* 2014;109:449.
194. Cheng X, Taleb S, Wang J, Tang TT, Chen J, Gao XL, Yao R, Xie JJ, Yu X, Xia N, Yan XX, Nie SF, Liao MY, Cheng Y, Mallat Z, Liao YH. Inhibition of IL-17A in atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2011;215:471-474.
195. Iwanami K, Matsumoto I, Tanaka-Watanabe Y, Inoue A, Mihara M, Ohsugi Y, Mamura M, Goto D, Ito S, Tsutsumi A, Kishimoto T, Sumida T. Crucial role of the interleukin-6/interleukin-17 cytokine axis in the induction of arthritis by glucose-6-phosphate isomerase. *Arthritis Rheum.* 2008;58:754-763.
196. Poesch A. Auswirkungen der pharmakologischen MAO-B-Inhibition auf die murine Herzfunktion bei Doxorubicin-induzierter Krdiomyopathie. 2014.
197. Sartori LV. In vivo Studie zum Einfluss von konditioniertem Medium kardialer Stammzellen auf die Herzfunktion von transgenen herzinsuffizienten Mäusen. 2019.
198. Gilson WD, Kraitchman DL. Cardiac magnetic resonance imaging in small rodents using clinical 1.5 T and 3.0 T scanners. *Methods.* 2007;43:35-45.
199. Schneider JE, Wiesmann F, Lygate CA, Neubauer S. How to perform an accurate assessment of cardiac function in mice using high-resolution magnetic resonance imaging. *J Cardiovasc Magn Reson.* 2006;8:693-701.

200. Collins JD. Global and regional functional assessment of ischemic heart disease with cardiac MR imaging. *Radiol Clin North Am.* 2015;53:369-395.
201. Manning WJ, Wei JY, Katz SE, Litwin SE, Douglas PS. In vivo assessment of LV mass in mice using high-frequency cardiac ultrasound: necropsy validation. *Am J Physiol.* 1994;266:H1672-1675.
202. Waage A, Brandtzaeg P, Halstensen A, Kierulf P, Espevik T. The complex pattern of cytokines in serum from patients with meningococcal septic shock. Association between interleukin 6, interleukin 1, and fatal outcome. *J Exp Med.* 1989;169:333-338.
203. Schuett H, Oestreich R, Waetzig GH, Annema W, Luchtefeld M, Hillmer A, Bavendiek U, von Felden J, Divchev D, Kempf T, Wollert KC, Seegert D, Rose-John S, Tietge UJ, Schieffer B, Grote K. Transsignaling of interleukin-6 crucially contributes to atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32:281-290.
204. Meijers WC, van der Velde AR, Pascual-Figal DA, de Boer RA. Galectin-3 and post-myocardial infarction cardiac remodeling. *Eur J Pharmacol.* 2015;763:115-121.
205. Bujak M, Frangogiannis NG. The role of TGF-beta signaling in myocardial infarction and cardiac remodeling. *Cardiovasc Res.* 2007;74:184-195.
206. Liu P, Sun M, Sader S. Matrix metalloproteinases in cardiovascular disease. *Can J Cardiol.* 2006;22 Suppl B:25b-30b.
207. Kobara M, Noda K, Kitamura M, Okamoto A, Shiraishi T, Toba H, Matsubara H, Nakata T. Antibody against interleukin-6 receptor attenuates left ventricular remodeling after myocardial infarction in mice. *Cardiovasc Res.* 2010;87:424-430.
208. Okazaki M, Yamada Y, Nishimoto N, Yoshizaki K, Mihara M. Characterization of anti-mouse interleukin-6 receptor antibody. *Immunol Lett.* 2002;84:231-240.
209. Nishimoto N, Terao K, Mima T, Nakahara H, Takagi N, Kakehi T. Mechanisms and pathologic significances in increase in serum interleukin-6 (IL-6) and soluble IL-6 receptor after administration of an anti-IL-6 receptor antibody, tocilizumab, in patients with rheumatoid arthritis and Castleman disease. *Blood.* 2008;112:3959-3964.
210. Salvarani C, Magnani L, Catanoso MG, Pipitone N, Versari A, Dardani L, Pulsatelli L, Meliconi R, Boiardi L. Rescue treatment with tocilizumab for Takayasu arteritis resistant to TNF- α blockers. *Clin Exp Rheumatol.* 2012;30:S90-93.
211. Mihara Mea. Influences of anti-mouse interleukin-6 receptor antibody on immune responses in mice. 2002.
212. Hartman MH, Vreeswijk-Baudoin I, Groot HE, van de Kolk KW, de Boer RA, Mateo Leach I, Vliegenthart R, Sillje HH, van der Harst P. Inhibition of Interleukin-6 Receptor in a Murine Model of Myocardial Ischemia-Reperfusion. *PLoS One.* 2016;11:e0167195.

213. Kleveland O, Kunszt G, Bratlie M, Ueland T, Broch K, Holte E, Michelsen AE, Bendz B, Amundsen BH, Espevik T, Aakhus S, Damås JK, Aukrust P, Wiseth R, Gullestad L. Effect of a single dose of the interleukin-6 receptor antagonist tocilizumab on inflammation and troponin T release in patients with non-ST-elevation myocardial infarction: a double-blind, randomized, placebo-controlled phase 2 trial. *Eur Heart J*. 2016;37:2406-2413.
214. Sigaux J, Hamze M, Daien C, Morel J, Krzysiek R, Pallardy M, Maillere B, Mariette X, Miceli-Richard C. Immunogenicity of tocilizumab in patients with rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine*. 2017;84:39-45.
215. Mindur JE, Swirski FK. Growth Factors as Immunotherapeutic Targets in Cardiovascular Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2019;39:1275-1287.
216. Sonderegger I, Iezzi G, Maier R, Schmitz N, Kurrer M, Kopf M. GM-CSF mediates autoimmunity by enhancing IL-6-dependent Th17 cell development and survival. *J Exp Med*. 2008;205:2281-2294.
217. Kovacic JC, Muller DW, Graham RM. Actions and therapeutic potential of G-CSF and GM-CSF in cardiovascular disease. *J Mol Cell Cardiol*. 2007;42:19-33.
218. Hosenpud JD, Campbell SM, Mendelson DJ. Interleukin-1-induced myocardial depression in an isolated beating heart preparation. *J Heart Transplant*. 1989;8:460-464.
219. Abbate A, Van Tassell BW, Biondi-Zoccai G, Kontos MC, Grizzard JD, Spillman DW, Oddi C, Roberts CS, Melchior RD, Mueller GH, Abouzaki NA, Rengel LR, Varma A, Gambill ML, Falcao RA, Voelkel NF, Dinarello CA, Vetrovec GW. Effects of interleukin-1 blockade with anakinra on adverse cardiac remodeling and heart failure after acute myocardial infarction [from the Virginia Commonwealth University-Anakinra Remodeling Trial (2) (VCU-ART2) pilot study]. *Am J Cardiol*. 2013;111:1394-1400.
220. Pomerantz BJ, Reznikov LL, Harken AH, Dinarello CA. Inhibition of caspase 1 reduces human myocardial ischemic dysfunction via inhibition of IL-18 and IL-1beta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98:2871-2876.
221. Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol*. 1991;147:3815-3822.
222. de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med*. 1991;174:1209-1220.
223. Ohtsuka T, Hamada M, Hiasa G, Sasaki O, Suzuki M, Hara Y, Shigematsu Y, Hiwada K. Effect of beta-blockers on circulating levels of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in patients with dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2001;37:412-417.

224. Kapadia S, Torre-Amione G, Yokoyama T, Mann DL. Soluble TNF binding proteins modulate the negative inotropic properties of TNF-alpha in vitro. *Am J Physiol.* 1995;268:H517-525.
225. Deswal A, Bozkurt B, Seta Y, Pariliti-Eiswirth S, Hayes FA, Blosch C, Mann DL. Safety and efficacy of a soluble P75 tumor necrosis factor receptor (Enbrel, etanercept) in patients with advanced heart failure. *Circulation.* 1999;99:3224-3226.
226. Bozkurt B, Torre-Amione G, Warren MS, Whitmore J, Soran OZ, Feldman AM, Mann DL. Results of targeted anti-tumor necrosis factor therapy with etanercept (ENBREL) in patients with advanced heart failure. *Circulation.* 2001;103:1044-1047.
227. Mann DL, Swedberg K, Packer M, Fleming T, Djian J, Warren MS, McMurray JJ. Effects of cytokine antagonism with etanercept on morbidity and mortality in patients with chronic heart failure: results of the RENAISSANCE, RECOVERY and RENEWAL trials. Annual meeting of the Heart Failure Society of America; 25. September 2002; Boca Raton 2002.
228. Chung ES, Packer M, Lo KH, Fasanmade AA, Willerson JT. Randomized, double-blind, placebo-controlled, pilot trial of infliximab, a chimeric monoclonal antibody to tumor necrosis factor-alpha, in patients with moderate-to-severe heart failure: results of the anti-TNF Therapy Against Congestive Heart Failure (ATTACH) trial. *Circulation.* 2003;107:3133-3140.
229. Klein B, Brailly H. Cytokine-binding proteins: stimulating antagonists. *Immunol Today.* 1995;16:216-220.
230. Evans TJ, Moyes D, Carpenter A, Martin R, Loetscher H, Lesslauer W, Cohen J. Protective effect of 55- but not 75-kD soluble tumor necrosis factor receptor-immunoglobulin G fusion proteins in an animal model of gram-negative sepsis. *J Exp Med.* 1994;180:2173-2179.
231. Nishimoto N, Kishimoto T. Humanized Antihuman IL-6 Receptor Antibody, Tocilizumab. In: Chernajovsky Y, Nissim A, editors. *Therapeutic Antibodies.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2008. p. 151-160.
232. LeBlanc RA, Pesnicak L, Cabral ES, Godleski M, Straus SE. Lack of interleukin-6 (IL-6) enhances susceptibility to infection but does not alter latency or reactivation of herpes simplex virus type 1 in IL-6 knockout mice. *J Virol.* 1999;73:8145-8151.
233. Estrada-Villaseñor E, Morales-Montor J, Rodríguez-Dorantes M, Ramos-Martínez E, Néquiz-Avendaño M, Ostoa-Saloma P. IL-6 KO mice develop experimental amoebic liver infection with eosinophilia. *J Parasitol.* 2007;93:1424-1428.
234. Schulz R, Heusch G. Tumor necrosis factor-alpha and its receptors 1 and 2: Yin and Yang in myocardial infarction? *Circulation.* 2009;119:1355-1357.

235. Lacerda L, Somers S, Opie LH, Lecour S. Ischaemic postconditioning protects against reperfusion injury via the SAFE pathway. *Cardiovasc Res.* 2009;84:201-208.
236. Entman ML, Youker K, Shoji T, Kukielka G, Shappell SB, Taylor AA, Smith CW. Neutrophil induced oxidative injury of cardiac myocytes. A compartmented system requiring CD11b/CD18-ICAM-1 adherence. *J Clin Invest.* 1992;90:1335-1345.
237. Jones SA, Scheller J, Rose-John S. Therapeutic strategies for the clinical blockade of IL-6/gp130 signaling. *J Clin Invest.* 2011;121:3375-3383.
238. Dittrich E, Rose-John S, Gerhartz C, Müllberg J, Stoyan T, Yasukawa K, Heinrich PC, Graeve L. Identification of a region within the cytoplasmic domain of the interleukin-6 (IL-6) signal transducer gp130 important for ligand-induced endocytosis of the IL-6 receptor. *J Biol Chem.* 1994;269:19014-19020.
239. Peters M, Blinn G, Solem F, Fischer M, Meyer zum Büschenfelde KH, Rose-John S. In vivo and in vitro activities of the gp130-stimulating designer cytokine Hyper-IL-6. *J Immunol.* 1998;161:3575-3581.
240. Garbers C, Heink S, Korn T, Rose-John S. Interleukin-6: designing specific therapeutics for a complex cytokine. *Nature reviews Drug discovery.* 2018;17:395-412.
241. Narazaki M, Yasukawa K, Saito T, Ohsugi Y, Fukui H, Koishihara Y, Yancopoulos GD, Taga T, Kishimoto T. Soluble forms of the interleukin-6 signal-transducing receptor component gp130 in human serum possessing a potential to inhibit signals through membrane-anchored gp130. *Blood.* 1993;82:1120-1126.
242. Askevold ET, Gullestad L, Dahl CP, Yndestad A, Ueland T, Aukrust P. Interleukin-6 signaling, soluble glycoprotein 130, and inflammation in heart failure. *Curr Heart Fail Rep.* 2014;11:146-155.
243. Barkhausen T, Tschernig T, Rosenstiel P, van Griensven M, Vonberg RP, Dorsch M, Mueller-Heine A, Chalaris A, Scheller J, Rose-John S, Seegert D, Krettek C, Waetzig GH. Selective blockade of interleukin-6 trans-signaling improves survival in a murine polymicrobial sepsis model. *Crit Care Med.* 2011;39:1407-1413.
244. George MJ, Jasmin NH, Cummings VT, Richard-Loendt A, Launchbury F, Woollard K, Turner-Stokes T, Garcia Diaz AI, Lythgoe M, Stuckey DJ, Hingorani AD, Gilroy DW. Selective Interleukin-6 Trans-Signaling Blockade Is More Effective Than Panantagonism in Reperfused Myocardial Infarction. *JACC Basic to translational science.* 2021;6:431-443.
245. Kotake S, Sato K, Kim KJ, Takahashi N, Udagawa N, Nakamura I, Yamaguchi A, Kishimoto T, Suda T, Kashiwazaki S. Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptors in the synovial fluids from rheumatoid arthritis patients are responsible for osteoclast-like cell formation. *J Bone Miner Res.* 1996;11:88-95.

246. Keul R, Heinrich PC, Müller-newen G, Muller K, Woo P. A possible role for soluble IL-6 receptor in the pathogenesis of systemic onset juvenile chronic arthritis. *Cytokine*. 1998;10:729-734.
247. Tsutamoto T, Hisanaga T, Wada A, Maeda K, Ohnishi M, Fukai D, Mabuchi N, Sawaki M, Kinoshita M. Interleukin-6 spillover in the peripheral circulation increases with the severity of heart failure, and the high plasma level of interleukin-6 is an important prognostic predictor in patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 1998;31:391-398.
248. Buzás K, Megyeri K, Hőgye M, Csanády M, Bogáts G, Mándi Y. Comparative study of the roles of cytokines and apoptosis in dilated and hypertrophic cardiomyopathies. *Eur Cytokine Netw*. 2004;15:53-59.
249. Plenz G, Song ZF, Tjan TD, Koenig C, Baba HA, Erren M, Flesch M, Wichter T, Scheld HH, Deng MC. Activation of the cardiac interleukin-6 system in advanced heart failure. *Eur J Heart Fail*. 2001;3:415-421.
250. Testa M, Yeh M, Lee P, Fanelli R, Loperfido F, Berman JW, LeJemtel TH. Circulating levels of cytokines and their endogenous modulators in patients with mild to severe congestive heart failure due to coronary artery disease or hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 1996;28:964-971.
251. Annunziato F, Cosmi L, Santarlasci V, Maggi L, Liotta F, Mazzinghi B, Parente E, Fili L, Ferri S, Frosali F, Giudici F, Romagnani P, Parronchi P, Tonelli F, Maggi E, Romagnani S. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med*. 2007;204:1849-1861.
252. Bun SS, Kober F, Jacquier A, Espinosa L, Kalifa J, Bonzi MF, Kopp F, Lalevee N, Zaffran S, Deharo JC, Cozzone PJ, Bernard M. Value of in vivo T2 measurement for myocardial fibrosis assessment in diabetic mice at 11.75 T. *Invest Radiol*. 2012;47:319-323.
253. Behrmann I, Hermanns HM, Haan C, Kortylewski M, Radtke S, Greiser J, Heinrich PC. Signalling of interleukin-6 type cytokines via gp130, leukemia inhibitory factor (LIF) receptor and oncostatin M receptor. *Eur Cytokine Netw*. 2000;11:491-492.
254. Kishimoto T. Interleukin-6: from basic science to medicine--40 years in immunology. *Annu Rev Immunol*. 2005;23:1-21.
255. Wang F, Trial J, Diwan A, Gao F, Birdsall H, Entman M, Hornsby P, Sivasubramaniam N, Mann D. Regulation of cardiac fibroblast cellular function by leukemia inhibitory factor. *J Mol Cell Cardiol*. 2002;34:1309-1316.
256. Heinrich PC, Behrmann I, Muller-Newen G, Schaper F, Graeve L. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J*. 1998;334 (Pt 2):297-314.

257. Modrell B, Liu J, Miller H, Shoyab M. LIF and OM directly interact with a soluble form of gp130, the IL-6 receptor signal transducing subunit. *Growth Factors*. 1994;11:81-91.
258. Scheller J, Schuster B, Hölscher C, Yoshimoto T, Rose-John S. No inhibition of IL-27 signaling by soluble gp130. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;326:724-728.
259. Jostock T, Müllberg J, Ozbek S, Atreya R, Blinn G, Voltz N, Fischer M, Neurath MF, Rose-John S. Soluble gp130 is the natural inhibitor of soluble interleukin-6 receptor transsignaling responses. *Eur J Biochem*. 2001;268:160-167.
260. Hausenloy DJ, Yellon DM. New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway. *Cardiovasc Res*. 2004;61:448-460.
261. Lecour S, Suleman N, Deuchar GA, Somers S, Lacerda L, Huisamen B, Opie LH. Pharmacological preconditioning with tumor necrosis factor-alpha activates signal transducer and activator of transcription-3 at reperfusion without involving classic prosurvival kinases (Akt and extracellular signal-regulated kinase). *Circulation*. 2005;112:3911-3918.
262. Negoro S, Kunisada K, Tone E, Funamoto M, Oh H, Kishimoto T, Yamauchi-Takahara K. Activation of JAK/STAT pathway transduces cytoprotective signal in rat acute myocardial infarction. *Cardiovasc Res*. 2000;47:797-805.
263. Hilfiker-Kleiner D, Hilfiker A, Fuchs M, Kaminski K, Schaefer A, Schieffer B, Hillmer A, Schmiedl A, Ding Z, Podewski E, Podewski E, Poli V, Schneider MD, Schulz R, Park JK, Wollert KC, Drexler H. Signal transducer and activator of transcription 3 is required for myocardial capillary growth, control of interstitial matrix deposition, and heart protection from ischemic injury. *Circ Res*. 2004;95:187-195.
264. Funamoto M, Fujio Y, Kunisada K, Negoro S, Tone E, Osugi T, Hirota H, Izumi M, Yoshizaki K, Walsh K, Kishimoto T, Yamauchi-Takahara K. Signal transducer and activator of transcription 3 is required for glycoprotein 130-mediated induction of vascular endothelial growth factor in cardiac myocytes. *J Biol Chem*. 2000;275:10561-10566.
265. Hattori R, Maulik N, Otani H, Zhu L, Cordis G, Engelman RM, Siddiqui MA, Das DK. Role of STAT3 in ischemic preconditioning. *J Mol Cell Cardiol*. 2001;33:1929-1936.
266. Obana M, Maeda M, Takeda K, Hayama A, Mohri T, Yamashita T, Nakaoka Y, Komuro I, Takeda K, Matsumiya G, Azuma J, Fujio Y. Therapeutic activation of signal transducer and activator of transcription 3 by interleukin-11 ameliorates cardiac fibrosis after myocardial infarction. *Circulation*. 2010;121:684-691.
267. Gu FM, Li QL, Gao Q, Jiang JH, Zhu K, Huang XY, Pan JF, Yan J, Hu JH, Wang Z, Dai Z, Fan J, Zhou J. IL-17 induces AKT-dependent IL-6/JAK2/STAT3 activation and tumor progression in hepatocellular carcinoma. *Mol Cancer*. 2011;10:150.

268. Song Y, Li Y, Xiao Y, Hu W, Wang X, Wang P, Zhang X, Yang J, Huang Y, He W, Huang C. Neutralization of interleukin-17A alleviates burn-induced intestinal barrier disruption via reducing pro-inflammatory cytokines in a mouse model. *Burns & trauma*. 2019;7:37.
269. Hou W, Kang HS, Kim BS. Th17 cells enhance viral persistence and inhibit T cell cytotoxicity in a model of chronic virus infection. *J Exp Med*. 2009;206:313-328.
270. Chabaud M, Fossiez F, Taupin JL, Miossec P. Enhancing effect of IL-17 on IL-1-induced IL-6 and leukemia inhibitory factor production by rheumatoid arthritis synoviocytes and its regulation by Th2 cytokines. *J Immunol*. 1998;161:409-414.
271. Yuan S, Zhang S, Zhuang Y, Zhang H, Bai J, Hou Q. Interleukin-17 Stimulates STAT3-Mediated Endothelial Cell Activation for Neutrophil Recruitment. *Cell Physiol Biochem*. 2015;36:2340-2356.
272. Saleh A, Shan L, Halayko AJ, Kung S, Gounni AS. Critical role for STAT3 in IL-17A-mediated CCL11 expression in human airway smooth muscle cells. *J Immunol*. 2009;182:3357-3365.
273. Su SA, Yang D, Zhu W, Cai Z, Zhang N, Zhao L, Wang JA, Xiang M. Interleukin-17A mediates cardiomyocyte apoptosis through Stat3-iNOS pathway. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1863:2784-2794.
274. Reich K, Papp KA, Matheson RT, Tu JH, Bissonnette R, Bourcier M, Gratton D, Kunyetz RA, Poulin Y, Rosoph LA, Stingl G, Bauer WM, Salter JM, Falk TM, Blödorn-Schlicht NA, Hueber W, Sommer U, Schumacher MM, Peters T, Kriehuber E, Lee DM, Wiczorek GA, Kolbinger F, Bleul CC. Evidence that a neutrophil-keratinocyte crosstalk is an early target of IL-17A inhibition in psoriasis. *Exp Dermatol*. 2015;24:529-535.
275. Ghetie V, Ward ES, Vitetta ES. Pharmacokinetics of Antibodies and Immunotoxins in Mice and Humans. In: Figg WD, McLeod HL, editors. *Handbook of Anticancer Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*. Totowa, NJ: Humana Press; 2004. p. 475-498.
276. Ruf P, Jäger M, Volovat C, Burges A, Heiss MM, Wimberger P, Brandt B, Lindhofer H. Pharmacokinetics and in vivo stability of intraperitoneally administered therapeutic antibody catumaxomab. *J Clin Oncol*. 2008;26:14006-14006.
277. Ovacik M, Lin K. Tutorial on Monoclonal Antibody Pharmacokinetics and Its Considerations in Early Development. *Clin Transl Sci*. 2018;11:540-552.
278. Gurantz D, Yndestad A, Halvorsen B, Lunde OV, Omens JH, Ueland T, Aukrust P, Moore CD, Kjekshus J, Greenberg BH. Etanercept or intravenous immunoglobulin attenuates expression of genes involved in post-myocardial infarction remodeling. *Cardiovasc Res*. 2005;67:106-115.

279. Krown KA, Page MT, Nguyen C, Zechner D, Gutierrez V, Comstock KL, Glembotski CC, Quintana PJ, Sabbadini RA. Tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis in cardiac myocytes. Involvement of the sphingolipid signaling cascade in cardiac cell death. *J Clin Invest.* 1996;98:2854-2865.
280. Lyman M, Lieu V, Richardson R, Timmer A, Stewart C, Granger S, Woods R, Silacci M, Grabulovski D, Newman R. A bispecific antibody that targets IL-6 receptor and IL-17A for the potential therapy of patients with autoimmune and inflammatory diseases. *J Biol Chem.* 2018;293:9326-9334.
281. Jolles S, Sewell WA, Misbah SA. Clinical uses of intravenous immunoglobulin. *Clin Exp Immunol.* 2005;142:1-11.
282. Kazatchkine MD, Kaveri SV. Immunomodulation of autoimmune and inflammatory diseases with intravenous immune globulin. *N Engl J Med.* 2001;345:747-755.
283. Wolf HM, Eibl MM. Immunomodulatory effect of immunoglobulins. *Clin Exp Rheumatol.* 1996;14 Suppl 15:S17-25.
284. Ballou M. Mechanisms of action of intravenous immune serum globulin in autoimmune and inflammatory diseases. *J Allergy Clin Immunol.* 1997;100:151-157.
285. Aukrust P, Yndestad A, Ueland T, Damas JK, Froland SS, Gullestad L. The role of intravenous immunoglobulin in the treatment of chronic heart failure. *Int J Cardiol.* 2006;112:40-45.

7. Anhang

7.1 Einfluss einer Inhibition von IL-6 auf Hypertrophieprozesse in herzinsuffizienten Mäusen

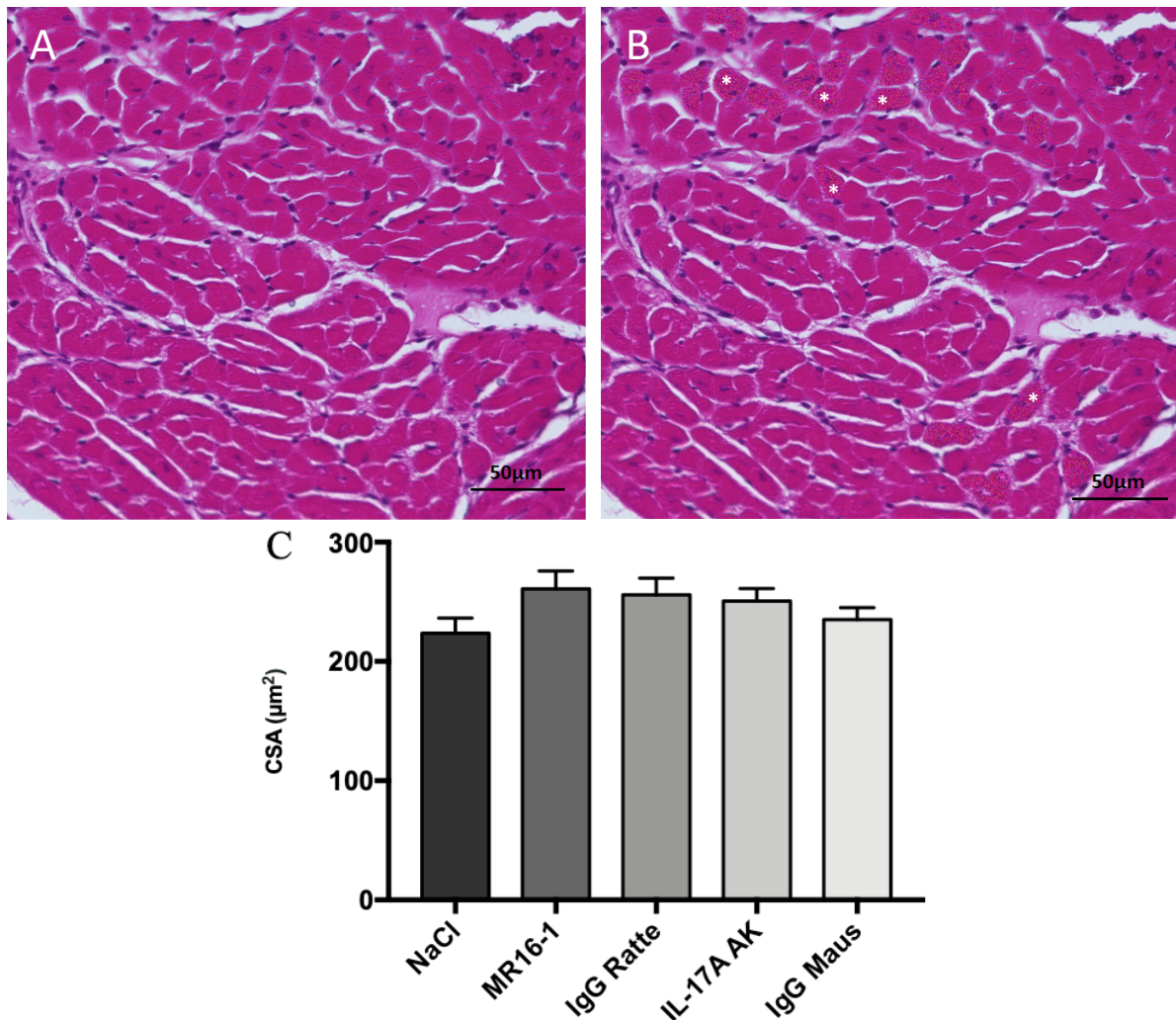


Abb. 35: Einfluss der direkten und indirekten IL-6 Inhibition auf Hypertrophieprozesse in herzinsuffizienten Mäusen.

Repräsentativer Hämatoxylin-gefärbter Herzgewebequerschnitt (A). Abbildung (B) zeigt, wie die Kardiomyozyten zur Bestimmung der kardiomyozytären Querschnittsfläche (CSA) markiert wurden. "*" kennzeichnen beispielhaft einzelne vermessene Kardiomyozyten. Darstellung der CSA in den Versuchsgruppen (C). Behandlung der Tiere mit MR16-1 (IL-6 Rezeptorblocker), neutralisierenden anti-IL-17A Antikörpern, IgG Ratte und IgG Maus (Ig-Isotypkontrollen) und NaCl (Kontrollgruppe). Vergrößerung: 20 x. (Mittelwert±SEM; n=5-6).

7.2 Einfluss einer Inhibition von IL-6 auf den myokardialen Fibrosegrad herzinsuffizienter Mäuse

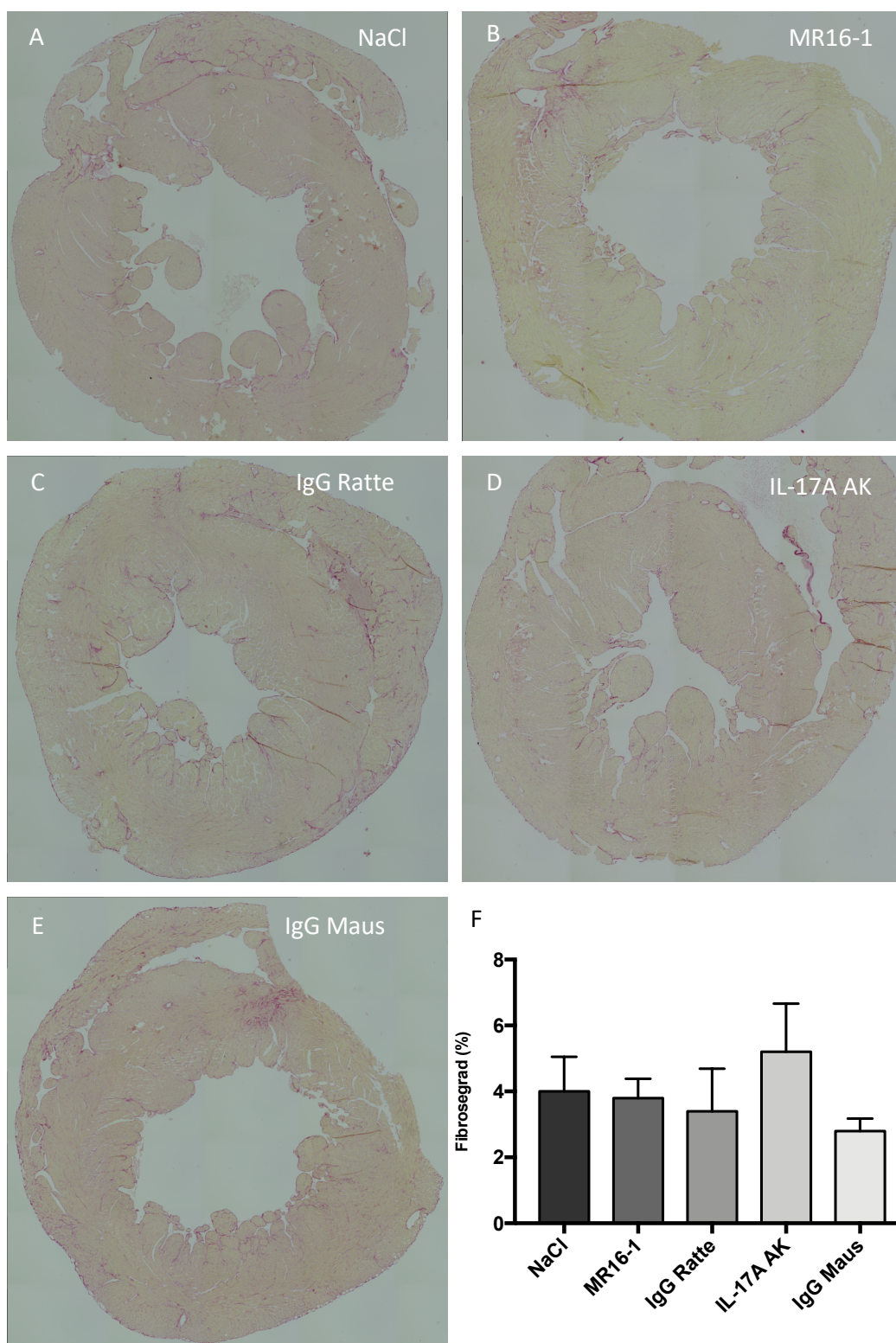


Abb. 36: Einfluss der direkten und indirekten IL-6 Inhibition auf den myokardialen Fibrosegrad herzinsuffizienter Mäuse.

Repräsentative, zum Nachweis kollagener Fasern mit Siriusrot-gefärbte, Transversalschnitte des midventrikulären Myokards (A-E). Abbildung (F) zeigt eine Darstellung der prozentualen interstitiellen Fibrosefläche (F). Behandlung der Tiere mit MR16-1 (IL-6 Rezeptorblocker), neutralisierenden anti-IL-17A Antikörpern, IgG Ratte und IgG Maus (Ig-Isotypkontrollen) und NaCl (Kontrollgruppe). Vergrößerung: 10 x. (Mittelwert \pm SEM; n=5-6).

7.3 Übersicht ausgewählter kardialer Funktionsparameter zur *Baseline*- und zur Abschlussmessung

Tab. 5: Übersicht ausgewählter kardialer Parameter zur *Baseline*- und Abschlussmessung.

Die Tabelle zeigt die mittels MRT erhobenen kardialen Parameter zur *Baseline*- und Abschlussmessung. (AK=Antikörper; IgG=Immunglobulin G; LVEF=linksventrikuläre Ejektionsfraktion; LVSV=linksventrikuläres Schlagvolumen; LVM=linksventrikuläre Masse; LVEDV=linksventrikuläres enddiastolisches Volumen; LVESV=linksventrikuläres endsystolisches Volumen; LVFS=linksventrikuläres *Fractional Shortening*; Mittelwert±SEM; n=10-11 bzw. n=6 (NaCl-Gruppe).

	MRT-Messung	NaCl	MR16-1	IgG Ratte	Anti-IL-17A AK	IgG Maus
LVEF (%)	<i>Baseline</i>	68,7 ± 3,1	62,8 ± 2,7	62,6 ± 3,0	60,6 ± 2,6	60,2 ± 1,8
	Abschluss	58,0 ± 3,0	60,7 ± 2,8	61,3 ± 2,3	55,6 ± 2,4	57,9 ± 3,1
LVSV (µl)	<i>Baseline</i>	41,7 ± 1,6	46,6 ± 1,7	42,0 ± 2,3	41,0 ± 2,9	40,6 ± 2,7
	Abschluss	37,8 ± 3,4	47,2 ± 2,3	43,3 ± 1,7	39,4 ± 2,1	42,2 ± 3,1
LVM (mg)	<i>Baseline</i>	71,8 ± 3,8	95,9 ± 3,7	83,2 ± 2,5	75,8 ± 3,5	75,3 ± 2,1
	Abschluss	82,2 ± 4,6	98,4 ± 2,4	84,5 ± 2,9	79,1 ± 3,6	85,0 ± 2,7
LVEDV (µl)	<i>Baseline</i>	61,2 ± 3,6	75,4 ± 4,0	67,6 ± 3,1	66,9 ± 2,9	67,2 ± 3,5
	Abschluss	65,2 ± 6,4	78,5 ± 3,5	71,5 ± 2,4	70,7 ± 2,1	73,2 ± 3,9
LVESV (µl)	<i>Baseline</i>	19,8 ± 2,8	28,8 ± 3,4	25,6 ± 2,7	26,1 ± 1,6	26,6 ± 1,8
	Abschluss	27,7 ± 3,7	31,5 ± 3,1	28,2 ± 2,3	31,6 ± 1,9	30,8 ± 3,0
LVFS (%)	<i>Baseline</i>	47,0 ± 2,9	37,0 ± 2,3	43,2 ± 2,7	43,0 ± 2,5	40,0 ± 1,4
	Abschluss	38,0 ± 3,5	36,3 ± 2,8	41,4 ± 2,9	36,1 ± 2,7	37,4 ± 2,8

Eidesstattliche Erklärung

Lebenslauf

Danksagung

Für die Überlassung des interessanten Promotionsthemas sowie die langjährige verlässliche Unterstützung, den Perfektionismus und die gute Betreuung dieser Arbeit danke ich Frau Dr. habil. Stephanie Könemann, Klinik für Innere Medizin B der Universitätsmedizin Greifswald. Herrn Prof. Dr. Felix, Direktor der Klinik für Innere Medizin B der Universitätsmedizin Greifswald, gilt mein Dank für die Möglichkeit die Arbeit in seiner Abteilung durchführen zu können. Weiterhin bedanke ich mich bei Frau Dr. Kristin Wenzel. Ihre konstruktiven Ratschläge und positive Einstellung haben mir auf meinem Weg zur Fertigstellung dieser Dissertation sehr geholfen.

Vielen Dank an Prof. Dr. Hosten und das Institut für Radiologie der Universitätsmedizin Greifswald für die Bereitstellung des Kleintier-MRT. Ganz besonders möchte ich mich an dieser Stelle bei Herrn Stefan Hadlich für seine Unterstützung bedanken. Sein Engagement und fundiertes technisches Wissen haben dazu beigetragen, hochwertige Datensätze zu erstellen. Die gemeinsame Zeit "im Keller" und an der frischen Luft werde ich in guter Erinnerung behalten.

Mein herzlicher Dank gilt Frau Dr. Susan Mouchantat, Institut für Radiologie der Universitätsmedizin Greifswald. Aus einer professionellen Zusammenarbeit, an die ich mich sehr gerne erinnere, ist eine wertvolle Freundschaft entstanden.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Dr. Luiz Sartori, der aufgrund seiner Erfahrungen, Freundlichkeit und Offenheit vom ersten Tag an ein wichtiger Ansprechpartner war. Danke für die tolle Einarbeitung und großzügige Hilfe!

Mein Dank gilt darüber hinaus allen Mitarbeitern des Kardiologischen Forschungslabors für das angenehme Arbeitsklima. Ich erhielt stets freundliche und kompetente Auskunft. Frau Caterina Redwanz danke ich besonders für die konstruktiven Anmerkungen.

Mein Jan, ich bedanke mich liebevoll für die Geborgenheit, die Du mir gibst und Deine Zuneigung. Du bist immer für mich da. Du bist mein Zuhause.

Aus tiefem Herzen bedanke ich mich bei meinen Eltern, Elisabeth und Peter, und meiner lieben Familie in Wien. Ohne Euch wäre ich nicht dort, wo ich stehe und nicht die, die ich bin. Danke, dass Ihr mir all dies ermöglicht.

Widmung

In tief empfundener Dankbarkeit meinen Eltern, Elisabeth und Peter, gewidmet.