

Medizinische Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

Campus Benjamin Franklin

aus der Medizinischen Klinik II, Kardiologie und Pulmologie

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. H.-P. Schultheiss

CHARAKTERISIERUNG DER KARDIALEN INFLAMMATION UND DES UMBAUS
DER EXTRAZELLULÄREN MATRIX IN EINEM COXSACKIEVIRUS-B3-
INFIZIERTEN, MURINEN MYOKARDITISMODELL MIT UROKINASE-TYP
PLASMINOGENAKTIVATOR-GENDELETION

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der
medizinischen Doktorwürde
der Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

vorgelegt von
Raimund Torpai
aus Bistritz

Referent: Prof. Dr. med. Matthias Pauschinger

Korreferent: Prof. Dr. med. Peter Lothar Schwimmbeck

Gedruckt mit Genehmigung der Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

Promoviert am: 11.09.2007

Für Emmerich und Katharina

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungsverzeichnis	1
1. Einleitung	3
1.1 Myokarditis und dilatative Kardiomyopathie	3
1.2 Coxsackieviren	6
1.3 Pathogenese der viralen Myokarditis im Mausmodell	8
1.3.1 Dreiphasiger Verlauf der murinen, viralen Myokarditis	9
1.4 Immunzellen und Zytokine	12
1.5 Die extrazelluläre Matrix	14
1.5.1 Zusammensetzung der extrazellulären Matrix	14
1.5.2 Matrixmetalloproteinasen und myokardiales <i>remodeling</i>	15
1.5.3 Regulation des kardialen <i>remodeling</i>	17
1.6 Das Plasminogen/Plasmin-System	19
1.7 Zielsetzung der Arbeit	21
2. Material und Methoden	22
2.1 Mausmodell	22
2.1.1 Infektion der Mäuse mit CVB3	22
2.1.2 Gruppeneinteilung	23
2.2 Molekularbiologische Methoden	23
2.2.1 RNA-Präparation	24
2.2.1.1 RNA-Extraktion mit der TRIZOL [®] -Methode	24
2.2.1.2 DNA-Verdau	25

2.2.2	Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	25
2.2.2.1	Reverse Transkription	26
2.2.2.2	Semiquantitative Polymerasekettenreaktion mit sequenzspezifischen Primern	27
2.2.2.3	Nachweis enteroviralen Genoms	29
2.2.3	Agarosegelelektrophorese	30
2.2.4	Optimierung der PCR-Bedingungen	31
2.2.5	Auswertung der PCR-Banden	33
2.2.6	Proteinchemische Methoden	34
2.2.6.1	Proteinextraktion und Konzentrationsbestimmung	34
2.2.6.2	Zymographie	35
2.2.6.3	Auswertung der Gelatinase-Banden	36
2.3	Immunhistochemische und histochemische Methoden an Gefrierschnitten	37
2.3.1	Immunhistochemische Färbungen nach der ABC-Methode	38
2.3.2	Digitale Auswertung der immunhistochemischen Präparate	41
2.3.3	Histochemische Färbung von Kollagen	42
2.3.3.1	Färbung mit <i>Sirius red</i>	42
2.3.3.2	Digitale Auswertung der <i>Sirius red</i> -Färbung	43
2.4	Statistische Auswertung der Ergebnisse	44
2.5	Materialien	45
3.	Ergebnisse	50
3.1	Allgemeine Anmerkungen	50
3.2	Nachweis enteroviraler RNA	50
3.3	Expression von uPA und tPA	51
3.4	Expression der Matrixmetalloproteinasen	52
3.5	Expression der Proteaseinhibitoren	57
3.6	Expression proinflammatorischer Zytokine	60
3.7	Expression verschiedener Matrixkomponenten	64
3.8	Aktivitätsbestimmung von MMP-2 und MMP-9	66
3.9	Myokardiale Infiltration durch Entzündungszellen	67

3.10 Kollagennachweis mit <i>Sirius red</i>	70
3.11 Kollagenfärbung mit <i>Sirius red</i>	71
3.12 Immunhistochemische Färbungen	72
4. Diskussion	75
4.1 Erhöhte Expression von uPA bei akuter viraler Myokarditis	75
4.2 Erhöhte Expression und Aktivität des MMP/TIMP-Systems bei akuter viraler Myokarditis	76
4.3 Verringerte kardiale Inflammation bei uPA-Deletion	78
4.4 Expression extrazellulärer Matrixbestandteile und Kollagennachweis	79
4.5 Regulationsmechanismen der kardialen Inflammation durch uPA und MMPs	81
4.6 Schlussfolgerung und Ausblick	83
5. Zusammenfassung	84
6. Literaturverzeichnis	86
7. Lebenslauf	101
8. Veröffentlichungen	103
9. Danksagung	104
10. Selbstständigkeitserklärung	105

Abkürzungsverzeichnis

A	<i>antisense</i> (gegenläufiger Strang)
ABC	Avidin-Biotin-Komplex
AEC	Amino-Ethyl-Carbazol
<i>aqua dest.</i>	destilliertes Wasser
bp	<i>basepair</i> (Basenpaar[e])
BSA	Bovines Serumantigen
CAR	Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor
CCID ₅₀	50%-Zellkultur Infektionsdosis
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary desoxiribonucleid acid</i> (komplementäre Desoxyribonukleinsäure)
CVB3	Coxsackievirus-B3
CTLs	Zytotoxische T-Lymphozyten
DAF	<i>decay accelerating factor</i>
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
DEPC-H ₂ O	RNase-freies Wasser
dNTPs	Desoxyribonukleotide
ECM	<i>extracellular matrix</i> (extrazelluläre Matrix)
EF	Ejektionsfraktion
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbant assay</i>
EMCV	Encephalomyokarditis-Virus
EMMPRIN	<i>extracellular matrix metalloproteinase inducer</i>
ICAM	<i>intercellular adhesion molecule</i> (interzelluläres Adhäsionsmolekül)
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
infCM	Inflammatorische Kardiomyopathie
INF- γ	Interferon-gamma
I	Infektion bei Wildtyp-Maus
I uPA ^{-/-}	Infektion bei Urokinase-Typ Plasminogenaktivator-deletierter Maus
ISFC	<i>International Society and Federation of Cardiology</i>
K	Kontrolle, scheininfizierte Wildtyp-Maus

K uPA ^{-/-}	Kontrolle, scheininfizierte Maus mit uPA-Deletion
kDa	Kilo-Dalton
LPS	Lipopolysaccharid
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> (Haupthistokompatibilitätskomplex)
MMP	Matrixmetalloproteinase
mRNA	<i>messenger ribonucleid acid</i> (Boten-Ribonukleinsäure)
MT-MMP	Membran-Typ-Matrixmetalloproteinase
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NK	Natürliche Killerzellen
NO[S]	Stickstoffmonoxyd-[Synthetase]
OD	Optische Dichte
PAI	Plasminogenaktivator Inhibitor
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PDGF	<i>plattlet derived growth faktor</i>
<i>p.i.</i>	<i>post infectionem</i>
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion
RES	Retikuloendotheliales System
S	<i>sense</i> (Strang)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyakrylamid-Gelelektrophorese
TGF-β	<i>transforming growth factor-beta</i>
Th-Zelle	T-Helferzelle
TIGR	<i>The Institute for Genomic Research</i>
TNF-α	Tumornekrosefaktor-alpha
TIMP	<i>tissue inhibitor of matrixmetalloproteinase</i>
tPA	<i>tissue-type plasminogen activator</i> (Gewebe-Typ Plasminogenaktivator)
uPA	<i>urokinase-type plasminogen activator</i> (Urokinase-Typ Plasminogenaktivator)
uPA ^{-/-}	uPA-Gendeletion
uPAR	uPA-Rezeptor
U	<i>unit</i> (enzymatische Einheit)
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
WHO	<i>World Health Organisation</i>
WT	Wildtyp

7. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

8. Veröffentlichungen

Originalarbeit:

Heymans S, Pauschinger M, De Palma A, Kallwellis-Opara A, Rutschow S, Swinnen M, Vanhoutte D, Gao F, Torpai R, Baker AH, Padalko E, Neyts J, Schultheiss HP, Van de Werf F, Carmeliet P, Pinto YM. Inhibition of urokinase-type plasminogen activator or matrix metalloproteinases prevents cardiac injury and dysfunction during viral myocarditis. *Circulation*. 2006;114:565-73.

Kongressbeiträge:

Pauschinger M, Rutschow S, Kallwellis-Opara A, Torpai R, (Berlin) Gao F, (Leuven/Belgium), P Carmeliet (Leuven/Belgium), Y Pinto (Maastricht/Netherlands), S Heymans (Maastricht/Netherlands). Loss of urokinase-type plasminogen activator reduces MMP-activity, cytokine expression and inflammation, thereby protecting against cardiac dysfunction during viral myocarditis. European Society of Cardiology. *Eur Heart J*. 2005

Pauschinger M, Rutschow S, Kallwellis A, Torpai R, Schultheiss H.-P.; Dept of Cardiology, Charite Univ. Hosp, Berlin, Germany; Peter Carmeliet, Cntr of Transgene Technology and Gene Therapy, VIB, Leuven, Belgium; Yigal Pinto, Stephane Heymans; Dept of Cardiology, Experimental and Molecular Cardiology CARIM, Maastricht, The Netherlands. Loss of urokinase-type plasminogen activator reduces MMP-activity, cytokine expression and inflammation, thereby protecting against cardiac dysfunction during viral myocarditis. American Heart Association. *Circulation*. 2005, Vol. 112, No 17 (Suppl. II-99)

9. Danksagung

Meinen besonderen Dank möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Matthias Pauschinger aussprechen, der mich mit vielen wertvollen Anregungen und konstruktiver Kritik sehr förderte.

Dem Direktor der Medizinischen Klinik II des Campus Benjamin Franklin, Herrn Prof. Dr. H.-P. Schultheiss danke ich für die hervorragenden Forschungsbedingungen an seinem Institut, die diese Arbeit ermöglichten.

Bei Frau Dr. Angela Kallwellis-Opara und Frau Dr. Susanne Rutschow möchte ich mich für die sehr gute Betreuung bedanken. Frau Melanie Peuler danke ich für die hervorragende Einarbeitung in die Labormethodik.

Frau Kerstin Puhl und Herrn Zingler danke ich für eine sehr angenehme Arbeitsatmosphäre und viele unentbehrliche praktische Tipps bei der Durchführung der Experimente.

Frau Franziska Bleis danke ich herzlich für die Anfertigung der Gefrierschnitte.

Für technische Hilfestellung und wertvolle Kommentare danke ich meinen Freunden Anna Stuhldreher, Alina Neumeyer, Dr. Pirus Ghadjar, Jan Wehmeyer, Jan Griepenburg, Dr. Uwe Strohhäcker und Johannes Nowak.

Besonders danke ich meiner Liebsten Anna Sun Barthold für ihre Geduld und die moralische Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Arbeit.

An letzter Stelle gilt mein herzlicher Dank meinen Eltern, die mir durch ihre unermüdliche, liebevolle Unterstützung und ihre Warmherzigkeit viel Rückhalt geben.

10. Selbstständigkeitserklärung

Ich, Raimund Torpai erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema „Charakterisierung der kardialen Inflammation und des Umbaus der extrazellulären Matrix in einem Coxsackievirus-B3-infizierten, murinen Myokarditismodell mit Urokinase-Typ Plasminogenaktivator-Gendeletion“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Berlin, den 13.05.2007

Raimund Torpai