

Aus der Klinik für Kardiologie und Pulmologie
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Untersuchungen zur Wirksamkeit einer Immunmodulation
mit IL-4 bei CVB3-induzierter akuter Myokarditis
in BALB/c-Mäusen

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité –
Universitätsmedizin Berlin

von

Sebastian Leschka

aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. M. Pauschinger
2. Prof. Dr. H. Zeichhardt

Datum der Promotion: 22.06.2007

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Myokarditis und dilatative Kardiomyopathie	1
1.2 Coxsackieviren.....	2
1.3 Vorstellungen zur Pathogenese der Myokarditis	3
1.3.1 Verlauf der experimentellen viralen Myokarditis im Mausmodell.....	3
1.3.1.1 Akute Phase der viralen Myokarditis (0. – 3. Tag p.i.).....	3
1.3.1.2 Subakute Phase der viralen Myokarditis (4. – 14. Tag p.i.).....	5
1.3.1.3 Chronische Phase der viralen Myokarditis (ab 15. Tag p.i.).....	7
1.3.2 Vorstellungen zur Rolle der Th ₁ - und Th ₂ -Immunantwort bei der akuten CVB3-induzierten Myokarditis	9
1.3.2.1 Th ₁ - / Th ₂ -Zellen	9
1.3.2.2 Rolle einer Th ₁ - und Th ₂ -Immunantwort bei der akuten Myokarditis.....	11
1.4 Die extrazelluläre Matrix.....	12
1.4.1 Bestandteile der extrazellulären Matrix.....	12
1.4.2 Remodeling der extrazellulären Matrix	13
1.4.3 Regulation der Matrixmetalloproteinasen und deren Inhibitoren.....	14
1.4.3.1 Regulation der MMP-Expression	16
1.4.3.2 Aktivierungswege der proMMP	17
1.4.3.3 Inhibition der MMP-Aktivität	17
1.4.3.4 Membranassoziiertes Induktions- / Aktivierungs-System	18
1.5 Problemstellung	20
2. Material und Methoden.....	22
2.1 Verwendetes Versuchstiermodell.....	22
2.1.1 Das Virus	22
2.1.2 Versuchstiere	22
2.1.3 Gruppeneinteilung und Versuchsablauf.....	22
2.2 Hämodynamische Messungen	24
2.2.1 Die Messapparatur	24
2.2.2 Vorbereitung der Versuchstiere und Messablauf	24

2.3	RNA – Präparation.....	25
2.3.1	RNA – Extraktion aus Myokardgewebe	25
2.3.2	Verdau kontaminierender DNA mittels DNase I	26
2.3.3	Reverse Transkription (RT)	26
2.4	Polymerase-Kettenreaktion.....	27
2.4.1	Prinzip der Polymerase Kettenreaktion	27
2.4.2	Verwendete Primer	27
2.4.2.1	Verwendete Primer für den Nachweis von enteroviralem Genom.....	28
2.4.2.2	Verwendete Primer für die semiquantitative Reverse-Transkriptions-PCR	28
2.4.3	Agarosegelelektrophorese	29
2.4.4	Optimierung der PCR-Bedingungen für die einzelnen Primer.....	30
2.4.5	RT-PCR und nested-RT-PCR zum Nachweis enteroviraler RNA	31
2.4.6	Semiquantitative RT-PCR	32
2.4.7	Sequenzierung der PCR-Produkte	33
2.5	DNA – Klonierung der PCR-Produkte	33
2.5.1	Vorbereitungen zur DNA - Klonierung	34
2.5.1.1	Aufreinigung der PCR-Produkte durch Elution aus einem Agarosegel.....	34
2.5.1.2	Herstellung von Nährmedien für die Bakterienkultur	34
2.5.1.3	Herstellung kompetenter Zellen.....	35
2.5.1.4	Herstellung von Agarplatten zur Rekombinantenselektion.....	35
2.5.2	Verwendeter Vektor	35
2.5.3	TA-Ligation.....	36
2.5.4	Transformation in kompetente E. coli	37
2.5.5	Selektion von rekombinanten Klonen	37
2.5.6	Präparative Isolierung von Plasmid-DNA.....	38
2.5.6.1	Mini-Präparation der Plasmid-DNA.....	38
2.5.6.2	Restriktion von DNA	39
2.5.6.3	Maxi-Präparation der Plasmid-DNA.....	40
2.5.7	Sequenzierung der klonierten PCR-Produkte.....	41
2.6	Radioaktive RNA:RNA-in-situ-Hybridisierung	42
2.6.1	Linearisierung der Plasmide	42
2.6.2	Radioaktive Markierung der Sonden durch in-vitro Transkription.....	44
2.6.3	Alkalische Hydrolyse	44
2.6.4	Vorbereitungen zur Hybridisierung	45

2.6.4.1	Beschichten von Objektträgern mit 2% Aminopropyltriethoxysilan (APES)	45
2.6.4.2	Silikonisieren der Deckgläschen	46
2.6.4.3	Präparation der Gewebe	46
2.6.5	Prähybridisierung	46
2.6.6	Hybridisierung	47
2.6.7	Waschen nach der Hybridisierung	47
2.6.8	Autoradiographie	48
2.6.8.1	Beschichten der Objektträger mit Fotoemulsion	48
2.6.8.2	Entwicklung	49
2.6.9	Gegenfärbung	49
2.6.10	Auswertung der in-situ Hybridisierung	49
2.7	Histologie und Immunhistochemie	49
2.7.1	Fixierung der Gewebeproben	49
2.7.2	Anfertigung von Paraffin- und Gefrierschnitten für die histologische und immunhistologische Untersuchung	50
2.7.3	Histologischer Nachweis von myokardialen Läsionen	50
2.7.4	Immunhistochemische Färbung	51
2.7.4.1	Vorbehandlung der Schnitte zur Demaskierung der Antigene	51
2.7.4.2	Ablauf der immunhistochemischen Färbung	52
2.7.4.3	Kontrollfärbungen	52
2.7.5	Auswertung der Färberesultate	53
2.8	Nachweis gelatinolytischer Aktivität mittels Zymographie	53
2.8.1	Proteinextraktion	54
2.8.2	Konzentrationsbestimmung der Proteine	54
2.8.3	Gelatin-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (Gelatin-SDS-PAGE)	54
2.8.4	Durchführung der Zymographie	55
2.8.5	Auswertung der Zymographie	55
2.9	Statistische Auswertung	56
2.10	Tierversuchsantrag	57
2.11	Eingesetzte Chemikalien und Laborgeräte	57
2.11.1	Laborgeräte	57
2.11.2	Restriktionsenzyme	58
2.11.3	Verbrauchsmaterialien	59

2.11.4 Puffer und Chemikalien	60
2.11.5 Verwendete Software	64
3. Ergebnisse	65
3.1 Krankheitssymptome der Versuchstiere über die Versuchsdauer	65
3.2 Mortalität	65
3.3 Körper- und Herzgewicht der Versuchstiere	65
3.4 Ergebnisse der hämodynamischen Untersuchung	67
3.5 Ergebnisse der semiquantitativen RT-PCR	69
3.5.1 Nachweis enteroviraler RNA	69
3.5.2 Analyse der mRNA-Expression	70
3.5.2.1 mRNA-Expressionsanalyse pro- und antiinflammatorischer Zytokine	71
3.5.2.2 mRNA-Expressionsanalyse von MMP	73
3.5.2.3 mRNA-Expressionsanalyse von TIMP	74
3.5.2.4 mRNA-Expressionsanalyse von MT1-MMP und EMMPRIN	76
3.6 In-situ Hybridisierung	77
3.7 Ergebnisse der histomorphologischen und immunhistochemischen Analyse	80
3.7.1 Verteilungsanalyse myokardialer Läsionen	80
3.7.2 Analyse des zellulären Infiltrates	80
3.8 Aktivitätsbestimmung von MMP-2 und MMP-9	83
4. Diskussion	85
4.1 Mortalität und Schwere der Erkrankung	85
4.2 Körpergewicht und Herzgewicht der Versuchstiere	86
4.3 Veränderung der Entzündungsreaktion sowie des Anteils myokardialer Läsionen bei akuter viraler Myokarditis und unter IL-4-Behandlung	86
4.4 Veränderung der mRNA-Expression und der gelatinolytischen Aktivität von matrixaktiven Enzymen bei akuter viraler Myokarditis und unter IL-4-Behandlung .	90
4.5 Hämodynamische Funktionsparameter bei akuter viraler Myokarditis und unter IL-4-Behandlung	92

5. Zusammenfassung	98
---------------------------------	-----------

6. Literaturverzeichnis	100
--------------------------------------	------------

Anhang

A. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
APES	Aminopropyltriethoxysilan
bidest	zweifach destilliert
bp	Basenpaare
Bq	Becquerel (1 Bq = 1 Zerfall / s)
cDNA	<i>complementary desoxyribonucleinic acid</i>
CVB3	Coxsackievirus Typ B 3
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleinic acid</i>
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECM	extrazelluläre Matrix
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMCV	Enzephalomyokarditisvirus
EMMPRIN	extracellular matrix metalloproteinase inducer
g	Gramm
g	Gravitationsbeschleunigung ($g = 9,81 \text{ m/s}^2$)
h	Stunde
Hf	Herzfrequenz (min^{-1})
i.p.	intraperitoneal
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
lacZ	β -Galaktosidase-Gen
LVsP	linksventrikulärer systolischer Druck
M	molar
min	Minute
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule (1 mmHg = Pa)

ANHANG

MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	messenger RNA
MT-MMP	membrane-type matrix metalloproteinase
NaOH	Natriumhydroxid
OD	optische Dichte
PAI	Plasminogenaktivator-Inhibitor
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase Kettenreaktion)
PFU	<i>plaqueforming units</i>
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Ionenkonzentration
p.i.	post infectionem
proMMP	Proenzymform der MMP
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
rpm	„rounds per minute“
RT	Reverse Transkription
s	Sekunde
SD	Standardabweichung
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borate-EDTA
TGF	Transforming growth factor
TIMP	tissue inhibitor of metalloproteinases
t-PA	tissue-type plasminogen activator
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
u	unit
u-PA	urokinase-type plasminogen activator
UV	ultraviolett
vgl.	vergleiche
v/v	Volumenmischungsverhältnis
WHO	World Health Organisation
w/v	Mischungsverhältnis von Gewicht zu Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indoyl- β -D-galactosid

B. Danksagungen

Ich danke Herrn Professor Dr. med. H.-P. Schultheiss für die freundliche Überlassung des Dissertationsthemas und sein Interesse an dieser Arbeit.

Bedanken möchte ich mich ganz besonders bei Herrn PD Dr. med. M. Pauschinger für die zahlreichen konstruktiven Anregungen. Seine ständige Ansprechbarkeit bei auftretenden Fragen und seine unermüdliche Motivation in schwierigen Phasen der Arbeit trugen wesentlich zum Gelingen des Projektes bei.

Herrn Dr. Jun-Li danke ich für seine freundliche und geduldige Unterstützung in allen theoretischen und praktischen Belangen, seine Hilfe bei der Auswertung der Messungen und bei der Darstellung der Ergebnisse.

Weiterhin möchte ich Herrn Dr. med. Carsten Tschöpe für die Durchführung der hämodynamischen Untersuchung in seiner Arbeitsgruppe danken. Herrn Dr. Thomas Walther und Frau Christine Altmann danke ich für die großzügige Hilfe beim Erlernen der DNA-Klonierung und ihre ständige Bereitschaft zur Problemdiskussion.

Für das freundliche Arbeitsklima, die anregenden Diskussionen und ihre Hilfsbereitschaft bedanke ich mich recht herzlich bei Frau Nöring, Herrn Zingler, Sabine Knüppel, Ulla Kobalz und Kerstin Puhl. Frau Erika Berg danke ich für ihre freundlichen Hilfestellungen bei der in-situ Hybridisierung.

Meinen Doktorandenkollegen Lars Husmann, Susanne Rutschow, Katharina Hoppe und Florian Reichenbach danke ich für den großen Spaß, den wir auch in Zeiten methodischer Schwierigkeiten hatten.

Von ganzem Herzen danke ich meinen Eltern für ihre moralische Unterstützung, indem sie mir so manches Mal den Rücken freihielten und mir den nötigen Antrieb verschafften.

Der grösste Dank gilt meiner Frau Nadine für ihre Geduld und Ausdauer in den letzten Jahren. Ihre Unterstützung in Zeiten großer Ideen und kleiner Ergebnisse hat erheblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Ohne sie hätte nicht nur die Dissertation lediglich halb so viel Freude bereitet.

C. Lebenslauf

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

D. Publikationsliste

Originalarbeiten:

1. Leschka S, Alkadhi H, Plass A, Desbiolles L, Grunenfelder J, Marincek B, Wildermuth S. Accuracy of MSCT coronary angiography with 64-slice technology: first experience. Eur Heart J. 2005 Aug;26(15):1482-1487.
2. Leschka S, Alkadhi H, Boehm T, Marincek B, Wildermuth S: Coronal ultra-thick CT reconstructions (MPR) of the pelvis in the multiple trauma patient: an alternative for the initial conventional radiograph. Fortschr Geb Rontgenstr 2005; 177:1405-1411
3. Alkadhi H, Wildermuth S, Bettex DA, Plass A, Baumert B, Leschka S, Desbiolles LM, Marincek B, Boehm T. Mitral regurgitation: quantification with 16-detector row CT-initial experience. Radiology. 2006;238(2):454-463.
4. Husmann L, Alkadhi H, Boehm T, Leschka S, Schepis T, Koepfli P, Desbiolles L, Marincek B, Kaufmann PA, Wildermuth S. Influence of cardiac hemodynamic parameters on coronary artery opacification with 64-slice computed tomography. Eur Radiol. 2006;16(5):1111-1116.
5. Li J, Tschöpe C, Leschka S, Husmann L, Rutschow S, Reichenbach F, Noutsias M, Kobalz U, Poller W, Spillman F, Zeichhardt H, Schwimmbeck PL, Schultheiss HP, Pauschinger M. Collagen degradation in a murine myocarditis model: relevance of matrix metalloproteinase in association with inflammatory induction. Cardiovasc Res 2002;56:235-247.

Übersichtsarbeiten / Falldarstellungen:

1. Alkadhi H, Leschka S, Hurlimann D, Jenni R, Genoni M, Wildermuth S. Fibroelastoma of the aortic valve. Evaluation with echocardiography and 64-slice computed tomography. Herz 2005;30:438
2. Alkadhi H, Leschka S, Pretre R, Perren A, Marincek B, Wildermuth S: Caseous calcification of the mitral annulus. J Thorac Cardiovasc Surg 2005;129:1438-1440
3. Leschka S, Alkadhi H, Wildermuth S: Collateral circulation in aortic coarctation shown by 64 channel multislice computed tomography angiography. Heart 2005;91:1422

4. Wildermuth S, Leschka S, Duru F, Alkadhi H: 3-D CT for cardiovascular treatment planning. Eur Radiol Suppl 2005; [Suppl 4]:D110-D115
5. Leschka S, Alkadhi H, Wildermuth S, Marincek B: Multi-detector computed tomography of acute abdomen. Eur Radiol 2005; 15:2435-2447
6. Wildermuth S, Leschka S, Alkadhi H, Marincek B: Multislice CT in the pre-and postinterventional evaluation of mesenteric perfusion. Eur Radiol 2005; 15:1203-1210

Buchbeiträge:

1. Leschka S, Alkadhi H, Husmann L, Wildermuth S. „Imaging of abdominal and pelvic injuries“. In: Marincek B, Dondelinger R. “Textbook of Emergency Radiology - Imaging and Intervention“. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York. 2006: *In Druck*
2. Leschka S, Alkadhi H, Wildermuth S, Marincek B. „Acute abdominal pain: Diagnostic strategies“. In: Marincek B, Dondelinger R. “Textbook of Emergency Radiology - Imaging and Intervention“. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York. 2006: *In Druck*
3. Husmann L, Leschka S, Alkadhi H, Wildermuth S. „Role of 3D imaging in the emergency room“. In: Marincek B, Dondelinger R. “Textbook of Emergency Radiology - Imaging and Intervention“. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York. 2006: *In Druck*
4. Alkadhi H, Leschka S, Wildermuth S. „Vascular injuries of the thorax: Multi-detector row CT and 3D imaging“. In: Marincek B, Dondelinger R. “Textbook of Emergency Radiology - Imaging and Intervention“. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York. 2006: *In Druck*
5. Wildermuth S, Husmann L, Leschka S, Alkadhi H, Marincek B. “Diagnostische Radiologie“. In: Meyer VE (ed). “Spitzenmedizin – Die Spitze des Eisberges“. Kranich-Verlag, Zürich. 2006: pp37-51.

Kongressbeiträge:

1. Alkadhi H, Leschka S, Baumert B, Plass A, Bettex DA, Marincek B, Boehm T, Wildermuth S. Dynamische Beurteilung der Mitralklappenmorphologie mittels 16-Zeilen-CT. Fortschr Geb Rontgenstr 2005; 177:S271/PO23
2. Leschka S, Alkadhi H, Boehm T, Marincek B, Wildermuth S. Coronal ultra-thick CT reconstructions of the pelvis in the multiple trauma patient: an alternative for the initial conventional radiograph. Eur Radiol 2005; 15 Suppl1:C-0754
3. Leschka S, Alkadhi H, Boehm T, Marincek B, Wildermuth S. Coronal ultra-thick CT reconstructions of the pelvis in the multiple trauma patient: is it an alternative for the initial conventional radiograph? Schweiz Med Forum 2005; 5:(Suppl 24),S5/3.11
4. Leschka S, Alkadhi H, Desbiolles L, Marincek B, Wildermuth S. Klinische Erfahrungen in der Beurteilbarkeit von kongenitalen Herzpathologien mittels 64-Zeilen-MDCT. Schweiz Med Forum 2005; 5:(Suppl 24),S25/P80
5. Leschka S, Alkadhi H, Desbiolles L, Schepis T, Koepfli P, Eberli F, Kaufmann P, Marincek B, Wildermuth S. Non-invasive coronary angiography with 64-slice CT: effect of the average and variability of heart rate on image quality. ESCR, Zürich. Eur Radiol 2005;15:E23
6. Leschka S, Alkadhi H, Desbiolles L, Schepis T, Koepfli P, Eberli F, Kaufmann PA, Marincek B, Wildermuth S. Assessment of coronary stent geometry using 64-slice computed tomography in comparison with quantitative coronary angiography. Eur Radiol 2005; 15:E18/60
7. Leschka S, Alkadhi H, Husmann L, Plass A, Desbiolles L, Grunenfelder J, Marincek B, Wildermuth S. Non-invasive coronary angiography: diagnostic accuracy of 64-slice multi-detector row CT in 106 patients. ESCR, Zürich. Eur Radiol 2005;15:E15
8. Leschka S, Alkadhi H, Husmann L, Plass A, Marincek B, Wildermuth S. Effect of the average and the variability of heart rate on image quality in 64-slice CT angiography. Dtsch Med Wochenschr 2005;130(Suppl 4):S141-S187
9. Leschka S, Alkadhi H, Husmann L, Plass A, Marincek B, Wildermuth S. Non-invasive coronary angiography: diagnostic accuracy of 64-slice multi-detector row CT in 106 patients. Dtsch Med Wochenschr 2005;130(Suppl 4):S141-S187

10. Leschka S, Alkadhi H, Marincek B, Wildermuth S. Pre- and postinterventional evaluation of abdominal vascular diseases using 16/64 row MSCT angiography. Eur Radiol 2005; 15 Suppl1:C-1053
11. Leschka S, Alkadhi H, Plass A, Desbiolles LM, Grunenfelder J, Marincek B, Wildermuth S. Accuracy of MSCT coronary angiography with 64-slice technology. Schweiz Med Forum 2005; 5(Suppl24):S10
12. Leschka S, Alkadhi H, Plass A, Desbiolles L, Marincek B, Wildermuth S. Frühbeurteilung der Bypassmorphologie und Anastomosen bei normaler und erhöhter Herzfrequenz mit 64-Zeilen-MDCT: Erste klinische Erfahrungen. Fortschr Geb Rontgenstr 2005;177:S274/PO36
13. Leschka S, Alkadhi H, Plass A, Desbiolles L, Marincek B, Wildermuth S. Nichtinvasive Koronardiagnostik mittels 64-Zeilen-CT: Erste Ergebnisse. Röfo 2005;177:S116/VO2005
14. Leschka S, Alkadhi H, Pretre R, Perren A, Marincek B, Wildermuth S. Verkäsende Kalzifizierung des Annulus mitralis. Röfo 2005;177:S274/PO35
15. Alkadhi H, Leschka S, Bettex D, Marincek B, Boehm T, Wildermuth S. Evaluation of aortic stenosis with 16-channel multi-detector row CT: comparison with echocardiography. RSNA 2005; SSC05-02
16. Desbiolles L, Leschka S, Alkadhi H, Plass A, Marincek B, Wildermuth S. First clinical experience in evaluating coronary artery bypass graft morphology and anastomosis at different heart rates using 64-slice CT. Schweiz Med Forum 2005; 5:(Suppl 24),S11/5.09
17. Husmann L, Leschka S, Desbiolles L, Marincek B, Alkadhi H, Wildermuth S. Influence of cardiac hemodynamic parameters on coronary artery opacification with 64-slice CT. Dtsch Med Wochenschr 2005;130(Suppl 4):S141-S187
18. Alkadhi H, Leschka S, Baumert B, Plass A, Bettex D, Marincek B, Boehm T, Wildermuth S. Dynamic cine-mode imaging of the mitral valve with 16-channel MDCT: a feasibility study. Eur Radiol 2005; 15(Suppl 1):B-821
19. Rutschow S, Leschka S, Westermann D, Weitz A, Poller W, Noutsias M, Pauschinger M. Die Bedeutung des oxidativen Stress, unter Einflußnahme von

- proinflammatorischen Zytokinen, auf den Verlauf der chronischen Myokarditis im Übergang zur dilatativen Kardiomyopathie. Z Kardiol 2004;93(Suppl:3):P1392
20. Rutschow S, Westermann D, Leschka S, Puhl K, Poller W, Klingel K, Kandolf R, Schultheiss HP, Pauschinger M. Direkte Korrelation zwischen dem proinflammatorischen Zytokin IL-1 β in Bezug auf die linksventrikuläre Dysfunktion und die Expression von MMP-8 im CVB-3 induzierten Myokarditis-Maus-Modell. Z Kardiol 2004;93(Suppl:3):V1535
21. Pauschinger M, Rutschow S, Leschka S, Weitz A, Puhl K, Ladyschewskij L, Noutsias M, Klingel K, Kandolf R, Tschöpe C. Mißverhältnis im MMP/TIMP-System führt zur myokardialen Fibrose mit linksventrikulärer Dysfunktion im chronischen Myokarditis-Modell an CVB-3 infizierten SWR/J-Mäusen. Z Kardiol 2004;93(Suppl:3):V1536
22. Leschka S, Rutschow S, Puhl K, Schwimmbeck P, Tschöpe C, Pauschinger M. Veränderung der Expression von MMP-3, TIMP-1, IL-1 β und TGF- β ₁ unter IL-4 Behandlung in CVB3-induzierter muriner Myokarditis in BALB/c-Mäusen. Dtsch Med Wochenschr 2003;128(Suppl 3):P91
23. Rutschow S, Leschka S, Westermann D, Weitz A, Puhl K, Pauschinger M. Prevention of left ventricular dysfunction by non-selective beta-blocker Carvedilol in CVB3-induced myocarditis. Dtsch Med Wochenschr 2003;128(Suppl 3):P69
24. Pauschinger M, Kumaran C, Rutschow S, Weitz A, Leschka S, Noutsias M, Westermann D, Schwimmbeck P. Hemmung der TGF- β 1-Expression und Verbesserung der linksventrikulären Funktion durch β -Adrenorezeptor-Blockade mit Carvedilol in CVB-3-induzierter akuter Myokarditis. Z Kardiol 2003;92(Suppl I):I-10
25. Rutschow S, Tschöpe C, Weitz A, Noutsias M, Poller W, Rauch U, Leschka S, Westermann D, Schwimmbeck P, Pauschinger M. Carvedilol führt zur Modulation der MMP- und IL-1 β -Expression sowie zu einer Verbesserung der linksventrikulären Funktion bei muriner Myokarditis. Z Kardiol 2003;92(Suppl. I):I-331
26. Leschka S, Li J, Schwimmbeck PL, Noutsias M, Spillmann F, Hoppe K, Schultheiss HP, Pauschinger M. Beneficial effects of interleukin-4 on the regulation of cardiac function, MMP-3 and TIMP-1 expression in murine myocarditis by the induction of TGF- β 1. Eur. Heart J. 2002;23(Abstract Suppl.):1821

27. Pauschinger M, Husmann L, Li J, Leschka S, Skurk C, Spillmann F, Schwimmbeck PL. Veränderte Expression von Kollagen Typ III (Col III) durch IL-4 Behandlung bei akuter Virusmyokarditis durch Suppression der TNF-alpha Induktion. Z. Kardiol. 2002;91 (Suppl. 1):I/104
28. Pauschinger M, Li J, Leschka S, Husmann L, Rutschow S, Hoppe K, Reichenbach F, Kobalz U, Poller W, Spillmann F, Schwimmbeck P-L, Schultheiss H-P. Bedeutung von Matrixmetalloproteinasen (MMP) für die Umgestaltung des myokardialen Kollagennetzwerkes bei muriner Myokarditis. Z. Kardiol. 2002;91 (Suppl. 1):I/104
29. Pauschinger M, Leschka S, Spillmann F, Li J, Poller W, Noutsias M, Husmann L, Schwimmbeck PL, Tschoepe C. IL-4 induziert bei mit Cocksackievirus B3 infizierten BALB/c Mäusen die infekbedingten Auswirkungen auf Herzfunktion, MMP-3 und TIMP-1 Expression durch Induktion von TGF- β 1. Z. Kardiol 2002;91 (Suppl. 1):I/101

E. Selbständigkeitserklärung

„Ich, Sebastian Leschka, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Untersuchungen zur Wirksamkeit einer Immunmodulation mit IL-4 bei CVB3-induzierter akuter Myokarditis in BALB/c-Mäusen“ 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.“

Zürich, 15.04.2006

Abstract

The myocardial extracellular matrix is a complex network of structure proteins and ensures sufficient hemodynamical function by structural integrity and coordinated myocyte contraction. Pathological remodelling destroys this network and facilitates the transition from acute myocarditis to dilatative cardiomyopathy. The purpose of this study is to investigate the matrix-controlling MMP / TIMP system, to characterize the inflammatory response in experimental acute CVB3 induced myocarditis, and to study the impact of IL4 therapy on these parameters.

Eight week old male BALB/c mice were intraperitoneally infected with 150,000 PFU coxsackie virus B3 (Nancy strain) to cause acute viral myocarditis. Eight sham-infected non-treated and 8 infected non-treated served as baseline for studying viral myocarditis. To activate a Th2 immune response, an additional 16 mice were treated with 200 ng/d rmIL4 intraperitoneally (sham-infected and treated for 10 days, n=4; infected and treated for 10 days, n=4; infected and treated from days 0-5, n=4; infected and treated from days 6-10). End of study was the 10th day post-infection for all mice. The success of viral infection was tested by semi-nested PCR for the presence of viral genome in myocardial tissue. Hemodynamical alterations and response to IL4 treatment was tested by cardiac catheterisation. Immunohistochemical staining for CD3+, CD4+, CD8+ T lymphocytes and macrophages (MAC-3) was used to characterize the inflammatory response, and mRNA expression of different cytokines (IL1beta, IL2, IL4, IL6, and TGF-beta1, respectively) was analysed by semi-quantitative RT-PCR. Myocardial damage was assessed by a modified Luxol Fast Blue staining. Alterations in the MMP/TIMP system were measured by mRNA expression analysis of MMP2, MMP3, MMP9, MMP13, MT1MMP, EMMPRIN, and TIMP 1 to 4, respectively. Gelatinase activity was tested by gelatine zymography. RNA:RNA in situ hybridization was performed for IL6, TGF-beta1, MMP3, and TIMP1 in myocardial tissue samples.

In non-treated viral myocarditis the mRNA expression of Th1-related cytokines and MMP was significantly increased, while mRNA expression of the TIMP was suppressed. These alterations induced matrix degradation and left ventricular dysfunction. In IL4 treated mice, the increase of mRNA expression of Th₁-related cytokines and MMP and the suppression of TIMP was less pronounced as compared to non-treated infected mice. Although the cellular infiltrate was switched to CD4+ T lymphocytes, IL4 treatment resulted in more distinctive myocardial damage. All these changes were particularly found in IL4 treatment at an early stage of disease, while alterations in other application schemes were less pronounced.

Treatment by IL4 at an early stage of acute viral myocarditis could induce a Th2 immune response and may prevent cardiac dysfunction by stabilisation of the MMP/TIMP system and a decrease in pathological remodeling.