

### 3. Ergebnisse

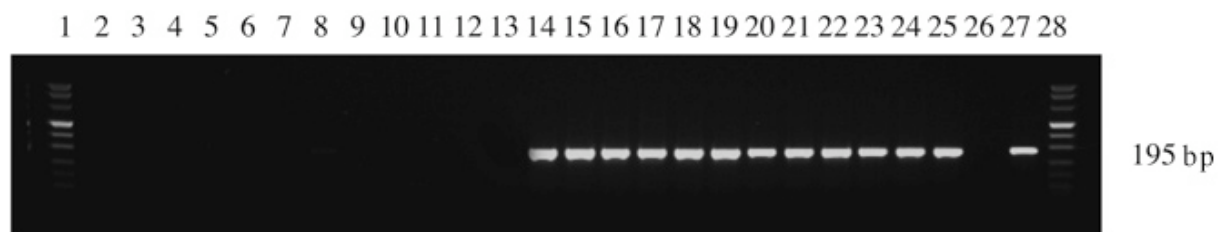
#### 3.1 Allgemeine Anmerkungen

Die Ergebnisse sind graphisch als Boxplots dargestellt. Die Box wird vom 25. und 75. Perzentil begrenzt. Die innere horizontale Linie stellt den Median dar. Werte, die um mehr als drei Kastenlängen außerhalb liegen, sind mit einem Stern markiert. Werte, die um mehr als eineinhalb Kastenlängen außerhalb liegen, sind mit einem Kreis markiert. Für jede Gruppe ist neben den Abbildungen der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Die Standardabweichung berechnet sich als Wurzel des Quotienten der Summe der Fehlerquadrate, dividiert durch die Anzahl der Beobachtungen. Signifikanzen im Einzelvergleich wurden über den Boxplots bei  $p < 0,05$  mit einem Balken und einem Sternchen (—\*) gekennzeichnet. Für den Vergleich mit den Gruppen bei denen kein Signal detektiert werden konnte, wurden keine Balken markiert.

Die Darstellung der Ergebnisse der RT-PCR erfolgte in den Boxplots als Verhältnis des Zielgens zum Verhältnis des Referenzgens 18S-RNA (Ratio Zielgen / 18S-RNA).

#### 3.2 Nachweis enteroviraler RNA

Der Nachweis enteroviraler RNA erfolgte mittels RT-PCR und anschließender *nested*-PCR mit den Reaktionsprodukten (Pauschinger et al., 1999). Bei allen zwölf Tieren der infizierten Gruppen (I, I uPA<sup>-/-</sup>) ließ sich enterovirale RNA nachweisen. Bei den zwölf Tieren der nicht infizierten Gruppen (K, K uPA<sup>+/+</sup>) wurde keine virale RNA nachgewiesen (Abb. 3.1).



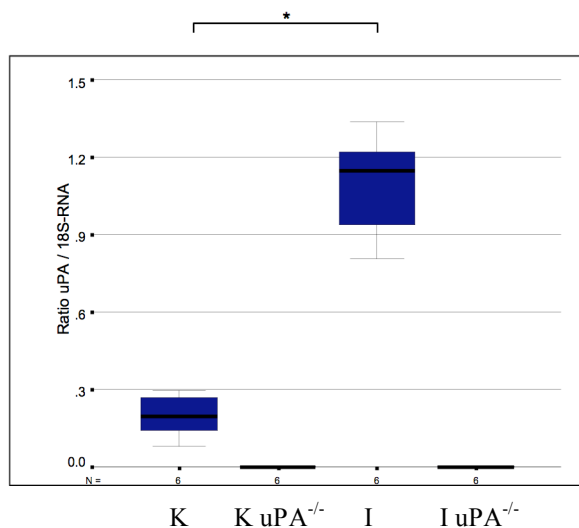
**Abb. 3.1** Nachweis enteroviraler RNA mittels *nested*-RT-PCR,  
1: Längenstandard, 2-7: K, 8-13: k uPA<sup>+/+</sup>, 14-19: I, 20-25: I uPA<sup>-/-</sup>,  
26: Negativkontrolle, 27: Positivkontrolle, 28: Längenstandard

### 3.3 Expression von uPA und tPA

Der Effekt einer uPA-Deletion bei einer akuten viralen Myokarditis wurde durch CVB3-Infektion von Wildtypmäusen und uPA<sup>-/-</sup>-Mäusen untersucht. Der Arbeitshypothese zufolge führt eine uPA-Inaktivierung zu verringerter kardialer Inflammation mit verringertem *remodeling* und wirkt dadurch protektiv auf das Myokard. Die Deletion des uPA-Gens wurde mittels RT-PCR nachgewiesen. Es konnte bei keiner der uPA<sup>-/-</sup>-Mäuse (K uPA<sup>-/-</sup>, I uPA<sup>-/-</sup>) ein Signal für das uPA-Transkript detektiert werden (Abb. 3.3).

Gleichzeitig wurde untersucht, wie sich die akute CVB3-induzierte Myokarditis beim Wildtyp auf die Expression von uPA auswirkt (Abb. 3.2).

Im Myokard der CVB3-infizierten Wildtypgruppe konnte eine signifikant erhöhte Expression von uPA nachgewiesen werden {p\*(K, I) = 0,004}.



**Abb. 3.2** mRNA-Expression von uPA

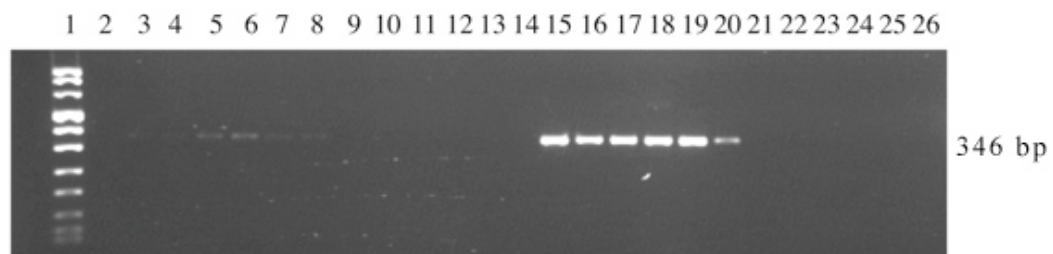
p\*(K,I) = 0,004,

K uPA<sup>-/-</sup> und I uPA<sup>-/-</sup>

nicht detektierbar,

K: 0,19 ± 0,08

I: 1,1 ± 0,19

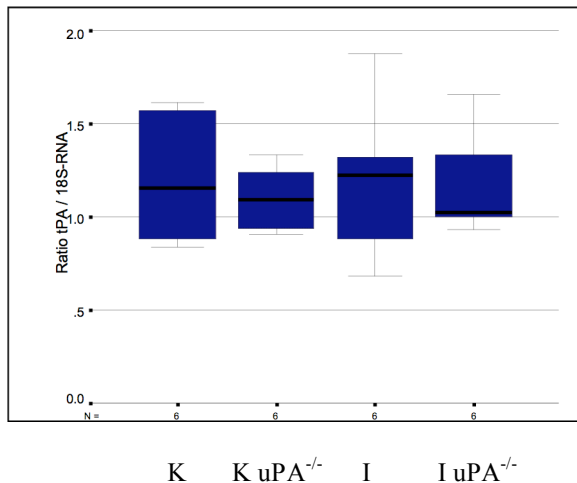


**Abb. 3.3** Nachweis der uPA-Deletion und Expressionssteigerung bei CVB3-Infektion,

Spur 1: Längenstandard, Spur 2: Negativkontrolle, Spur 3-8: K, Spur 9-14:

K uPA<sup>-/-</sup>, Spur 15-20: I, Spur 21-26: I uPA<sup>-/-</sup>

Die Expression von tPA wurde weder durch Infektion, noch durch uPA-Deletion reguliert (Abb. 3.4). Der H-Test nach Kruskal-Wallis ergab  $p = 0,99$ . Somit konnten keine Einzelvergleiche durchgeführt werden.



**Abb. 3.4** tPA-Expression

K:  $1,2 \pm 0,33$

K uPA<sup>-/-</sup>:  $1,1 \pm 0,17$

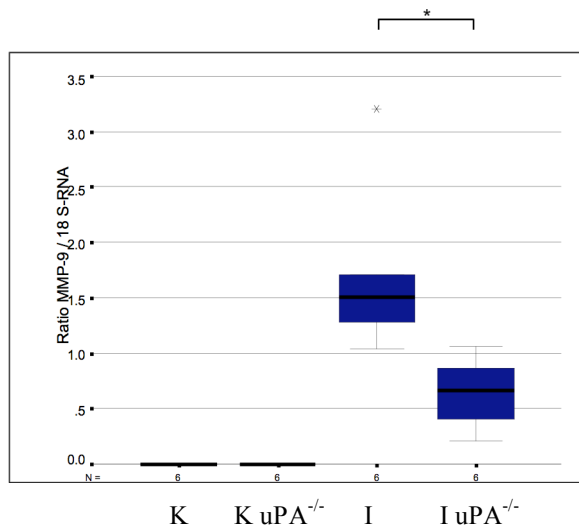
I:  $1,16 \pm 0,28$

I uPA<sup>-/-</sup>:  $1,13 \pm 0,28$

### 3.4 Expression der Matrixmetalloproteinasen

Es wurde untersucht, ob die Expression verschiedener MMPs bei akuter viraler Myokarditis induziert ist. Eine entscheidende Frage war, inwiefern sich die uPA-Deletion bei den infizierten Mäusen auf die MMP-Expression auswirken würde. Es wurden die Transkripte der Gelatinasen MMP-2 und MMP-9, der Kollagenasen MMP-8 und MMP-13, des Stromelysins MMP-3, der Metalloelastase MMP-12 sowie der membranassoziierten MMPs, EMMPRIN und MT-1-MMP untersucht.

Für die MMP-9-Kontrollgruppen (K, K uPA<sup>-/-</sup>) war in der semiquantitativen PCR kein Signal detektierbar (Abb. 3.5). Bei den infizierten WT-Mäusen war für MMP-9 eine deutliche Expressionssteigerung erkennbar. Diese war bei der infizierten uPA<sup>-/-</sup>-Gruppe deutlich reduziert ( $p^*(I, I uPA) = 0,006$ ).



**Abb. 3.5** MMP-9-Expression

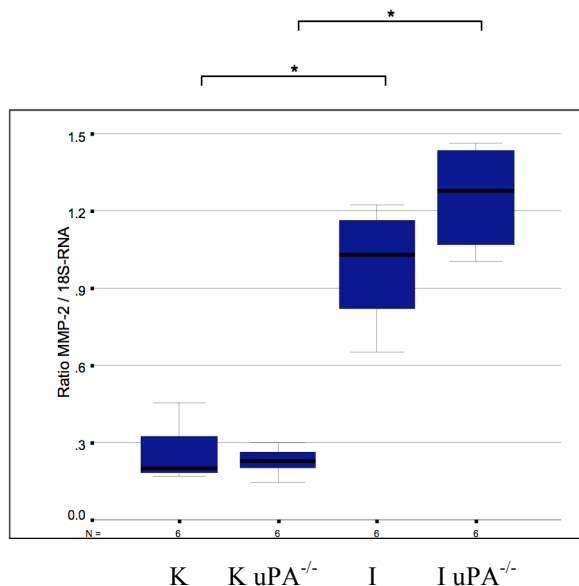
$$p^*(I, I uPA^{-/-}) = 0,006,$$

K, K uPA<sup>-/-</sup>: nicht detektierbar,

$$I: 1,71 \pm 0,77$$

$$I uPA^{-/-}: 0,65 \pm 0,33$$

Die MMP-2-Expression war bei Infektion (I, I uPA<sup>-/-</sup>) induziert (Abb. 3.6). In der PCR stellte sich der Unterschied zwischen Kontrollgruppe und infizierter Gruppe (K, I) signifikant dar {p\*(K, I) = 0,004}. Der Vergleich der uPA-deletierten Gruppen (K uPA<sup>-/-</sup>, I uPA<sup>-/-</sup>) zeigte ebenfalls einen signifikanten Anstieg bei den infizierten Tieren {p\*(K uPA<sup>-/-</sup>, I uPA<sup>-/-</sup>) = 0,004}. In der infizierten uPA<sup>-/-</sup>-Gruppe war die stärkste Expressionssteigerung erkennbar.



**Abb. 3.6** MMP-2-Expression

$$p^*(K,I) = 0,004,$$

$$p^*(K uPA^{-/-}, I uPA^{-/-}) = 0,004,$$

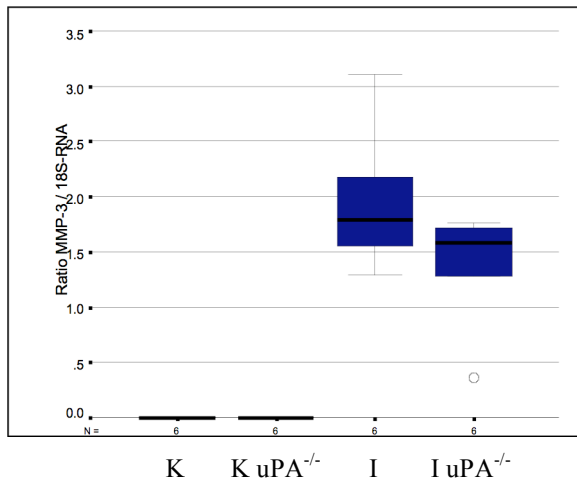
$$K: 0,25 \pm 0,11$$

$$K uPA^{-/-}: 0,23 \pm 0,05$$

$$I: 0,99 \pm 0,22$$

$$I uPA^{-/-}: 1,25 \pm 0,19$$

Die MMP-3-Expression war bei den nicht infizierten Kontrollgruppen (K, K uPA<sup>-/-</sup>) nicht detektierbar (Abb. 3.7). Bei den infizierten Tieren (I, I uPA<sup>-/-</sup>) wurde MMP-3 deutlich exprimiert. Die höchste Expression zeigte sich bei den infizierten WT-Tieren. Bei den uPA-deletierten Tieren war die Expression geringfügig niedriger (nicht signifikant).



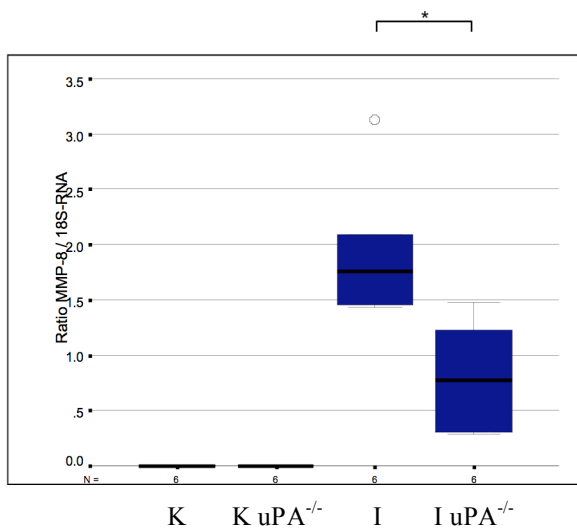
**Abb. 3.7** MMP-3-Expression

K, K uPA<sup>-/-</sup>: nicht detektierbar

I: 1,96 ± 0,65

I uPA<sup>-/-</sup>: 1,38 ± 0,53

Die Expression von MMP-8 war bei den infizierten Gruppen deutlich induziert (Abb. 3.8). Für die nicht infizierten Gruppen (K, K uPA<sup>-/-</sup>) konnte kein Signal detektiert werden. Der Vergleich der infizierten Gruppen (I, I uPA<sup>-/-</sup>) zeigte eine signifikante *downregulation* bei der uPA-deletierten Gruppe {p\*(I, I uPA<sup>-/-</sup>) = 0,01}.



**Abb. 3.8** MMP-8-Expression

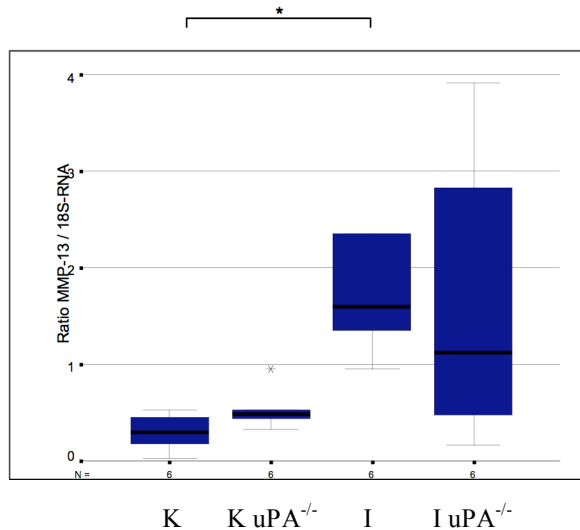
p\*(I, I uPA<sup>-/-</sup>) = 0,01,

K, K uPA<sup>-/-</sup>: nicht detektierbar

I: 1,94 ± 0,65

I uPA<sup>-/-</sup>: 0,81 ± 0,54

Für die Kollagenase MMP-13 ließ sich bei den infizierten Gruppen eine signifikante Expressionssteigerung erkennen (Abb. 3.9). Vergleich man die nicht infizierten WT-Mäuse mit den infizierten WT-Mäusen, so ergab sich bei den infizierten Tieren eine signifikante Expressionssteigerung  $\{p^*(K, I) = 0,004\}$ . Innerhalb der infizierten Gruppen (I, I uPA<sup>-/-</sup>) war bei uPA<sup>-/-</sup>-Deletion eine nicht signifikante Expressionsabnahme erkennbar ( $p = 0,7$ ).



**Abb. 3.9** MMP-13-Expression

$$p^*(K, I) = 0,004,$$

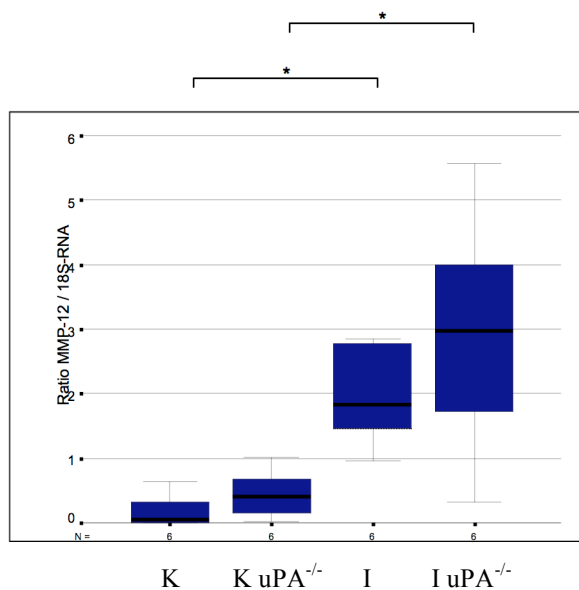
$$K: 0,3 \pm 0,18$$

$$K \text{ uPA}^{-/-}: 0,53 \pm 0,22$$

$$I: 1,7 \pm 0,56$$

$$I \text{ uPA}^{-/-}: 1,6 \pm 1,5$$

Für die Metalloelastase MMP-12 wurde bei Infektion eine signifikante Expressionssteigerung gefunden  $\{p^*(K, I) = 0,004; p^*(K \text{ uPA}^{-/-}, I \text{ uPA}^{-/-}) = 0,016\}$ . Bei der uPA-deletierten Gruppe war das Transkript am stärksten exprimiert  $\{p(I, I \text{ uPA}^{-/-}) \text{ nicht signifikant}\}$ , (Abb. 3.10).



**Abb. 3.10** MMP-12-Expression

$$p^*(K, I) = 0,004,$$

$$p^*(K \text{ uPA}^{-/-}, I \text{ uPA}^{-/-}) = 0,016,$$

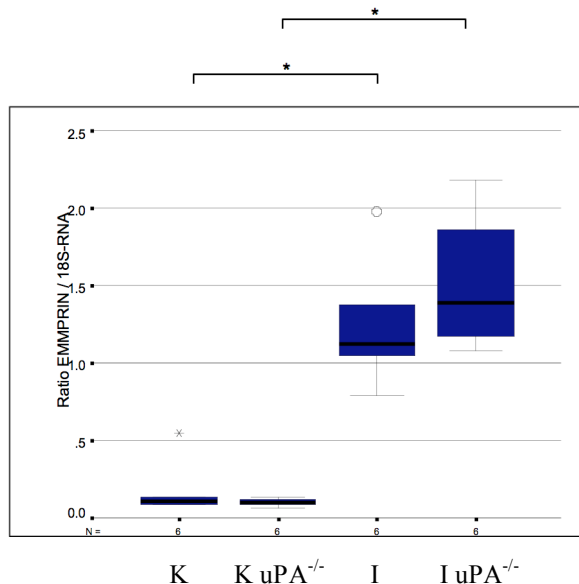
$$K: 0,18 \pm 0,25$$

$$K \text{ uPA}^{-/-}: 0,45 \pm 0,38$$

$$I: 1,95 \pm 0,74$$

$$I \text{ uPA}^{-/-}: 2,93 \pm 1,9$$

Die Expression der membranassoziierten Protease EMMPRIN (*extracellular matrix metalloproteinase inducer*) war bei den infizierten Gruppen deutlich induziert  $\{p^*(K, I) = 0,004$ ;  $p^*(K uPA^{-/-}, I uPA^{-/-}) = 0,004\}$ . Bei Infektion war kein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp und  $uPA^{-/-}$  nachweisbar (Abb. 3.11).



**Abb. 3.11** EMMPRIN-Expression

$$p^*(K, I) = 0,004,$$

$$p^*(K uPA^{-/-}, I uPA^{-/-}) = 0,004,$$

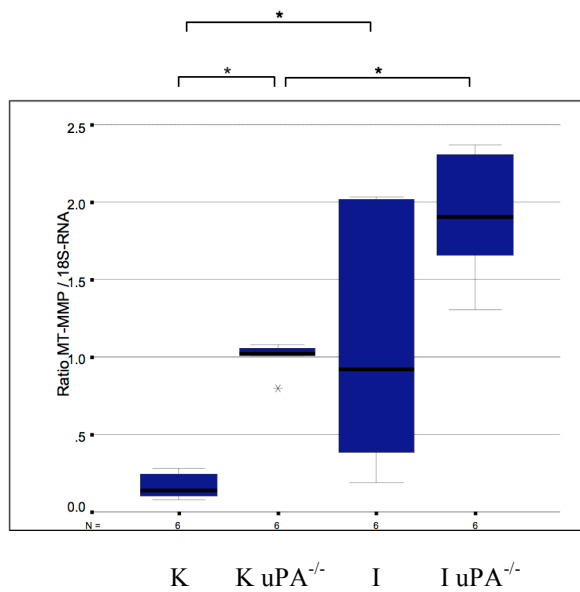
$$K: 0,18 \pm 0,18$$

$$K uPA^{-/-}: 0,1 \pm 0,03$$

$$I: 1,24 \pm 0,41$$

$$I uPA^{-/-}: 1,51 \pm 0,43$$

Die Expression von MT-1-MMP (Abb. 3.12) war bei den infizierten WT-Mäusen signifikant gesteigert  $\{p^*(K, I) = 0,01\}$ . Beim Vergleich der nicht infizierten Gruppen sah man eine signifikante Expressionssteigerung in der  $uPA^{-/-}$ -Gruppe  $\{p^*(K, K uPA^{-/-}) = 0,004\}$ . Des Weiteren ergab der Vergleich der  $uPA$ -deletierten Gruppen einen signifikanten Expressionsanstieg bei Infektion  $\{p^*(K uPA^{-/-}, I uPA^{-/-}) = 0,004\}$ . Beim Vergleich der infizierten Gruppen zeigte sich bei  $uPA$ -Deletion eine nicht signifikante Expressionssteigerung.



**Abb. 3.12** MT-1-MMP-Expression

$$p^*(K, K uPA^{-/-}) = 0,004,$$

$$p^*(K, I) = 0,01,$$

$$p^*(K uPA^{-/-}, I uPA^{-/-}) = 0,004,$$

$$K: 0,16 \pm 0,08$$

$$K uPA^{-/-}: 1,0 \pm 0,1$$

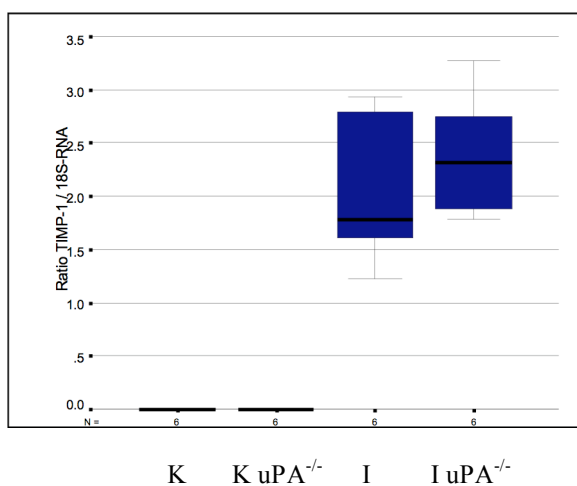
$$I: 1,1 \pm 0,83$$

$$I uPA^{-/-}: 1,91 \pm 0,4$$

### 3.5 Expression der Proteaseinhibitoren

Es wurden die Transkripte der MMP-Inhibitoren TIMP-1 bis -4, und Plasminogenaktivator Inhibitor (PAI-1) untersucht.

Für das TIMP-1-Transkript konnten die nicht infizierten Kontrollgruppen mittels semiquantitativer PCR nicht detektiert werden (Abb. 3.13). Der Vergleich der infizierten Gruppen zeigte eine geringfügig höhere TIMP-1 Expression bei uPA-Deletion {p (I, I uPA<sup>-/-</sup>) nicht signifikant}.



**Abb. 3.13** TIMP-1-Expression

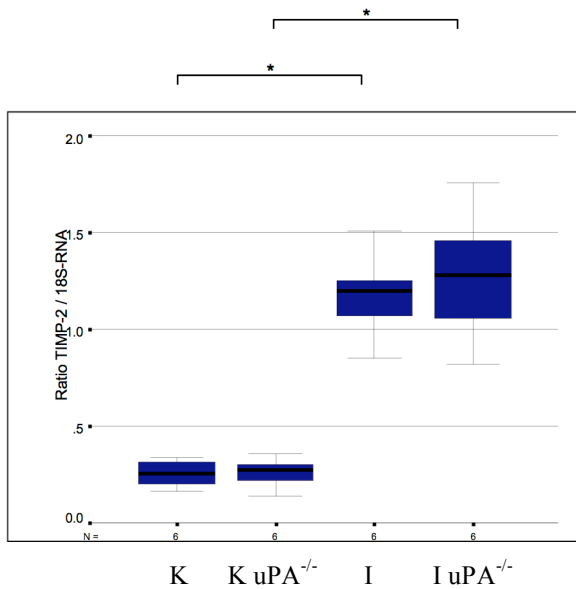
K, K uPA<sup>-/-</sup> nicht detektierbar,

$$I: 2,02 \pm 0,69$$

$$I uPA^{-/-}: 2,39 \pm 0,59$$



Das TIMP-2-Transkript war bei den infizierten Gruppen signifikant induziert  $\{p^*(K, I) = 0,004; p^*(K uPA^{-/-}, I uPA^{-/-}) = 0,004\}$ . Die infizierten Gruppen (I, I uPA<sup>-/-</sup>) unterschieden sich untereinander nur unwesentlich (Abb. 3.14).



**Abb. 3.14** TIMP-2-Expression

$$p^*(K, I) = 0,004,$$

$$p^*(K uPA^{-/-}, I uPA^{-/-}) = 0,004,$$

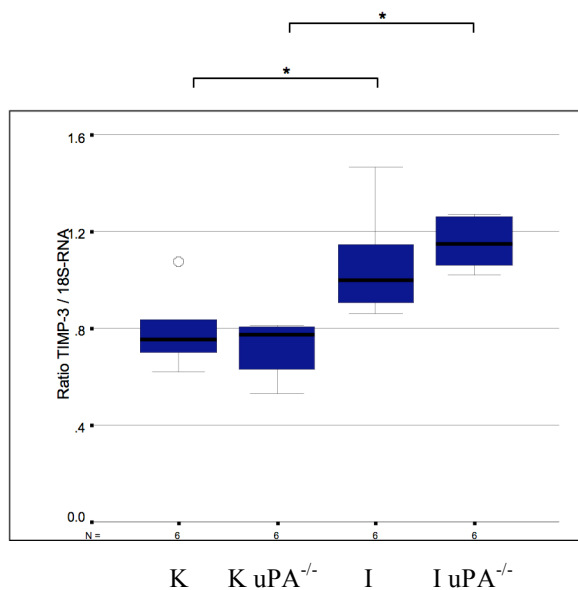
$$K: 0,26 \pm 0,07$$

$$K uPA^{-/-}: 0,26 \pm 0,07$$

$$I: 1,18 \pm 0,22$$

$$I uPA^{-/-}: 1,27 \pm 0,32$$

Das TIMP-3-Transkript war in den infizierten Gruppen signifikant induziert  $\{p^*(K, I) = 0,025; p^*(K uPA^{-/-}, I uPA^{-/-}) = 0,004\}$ . Die infizierte uPA<sup>-/-</sup>-Gruppe zeigte im Vergleich zum infizierten Wildtyp eine unwesentlich höhere TIMP-3-Expression (Abb. 3.15).



**Abb. 3.15** TIMP-3-Expression

$$p^*(K, I) = 0,025,$$

$$p^*(K uPA^{-/-}, I uPA^{-/-}) = 0,004,$$

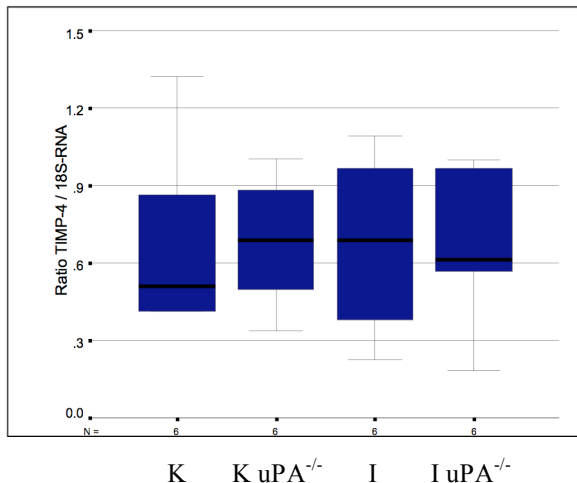
$$K: 0,79 \pm 0,16$$

$$K uPA^{-/-}: 0,72 \pm 0,11$$

$$I: 1,1 \pm 0,22$$

$$I uPA^{-/-}: 1,16 \pm 0,11$$

Das TIMP-4-Transkript wurde weder durch Infektion, noch durch uPA-Deletion reguliert (Abb. 3.16). Der H-Test nach Kruskal-Wallis ergab  $p = 0,97$ , so dass keine Einzelvergleiche durchgeführt werden konnten.



**Abb. 3.16** TIMP-4-Expression

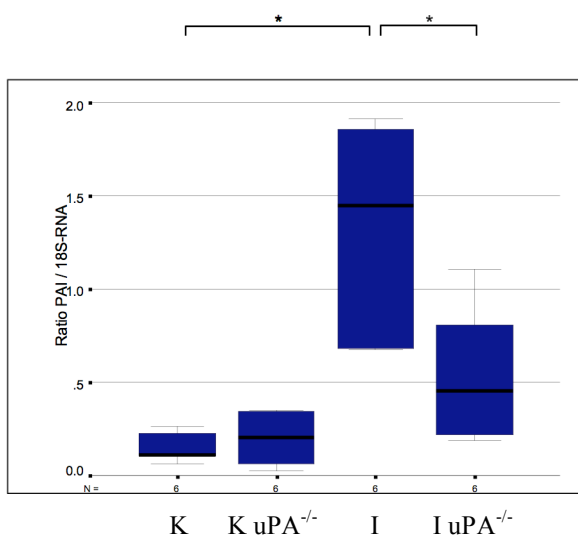
K:  $0,67 \pm 0,36$

K uPA<sup>-/-</sup>:  $0,68 \pm 0,25$

I:  $0,67 \pm 0,36$

I uPA<sup>-/-</sup>:  $0,66 \pm 0,3$

Für PAI-1 wurden bei den infizierten WT-Mäusen im Vergleich zu den nicht infizierten WT-Mäusen signifikant erhöhte Transkriptions-*level* nachgewiesen (Abb. 3.17),  $\{p^*(K, I) = 0,004\}$ . Innerhalb der infizierten Gruppen zeigten die uPA<sup>-/-</sup>-Mäuse im Vergleich zum Wildtyp eine signifikant niedrigere PAI-1-Expression  $\{p^*(I, I uPA^{-/-}) = 0,025\}$ .



**Abb. 3.17** PAI-1-Expression

$p^*(K, I) = 0,004$ ,

$p^*(I, I uPA^{-/-}) = 0,025$ ,

K:  $0,15 \pm 0,08$

K uPA<sup>-/-</sup>:  $0,2 \pm 0,15$

I:  $1,34 \pm 0,58$

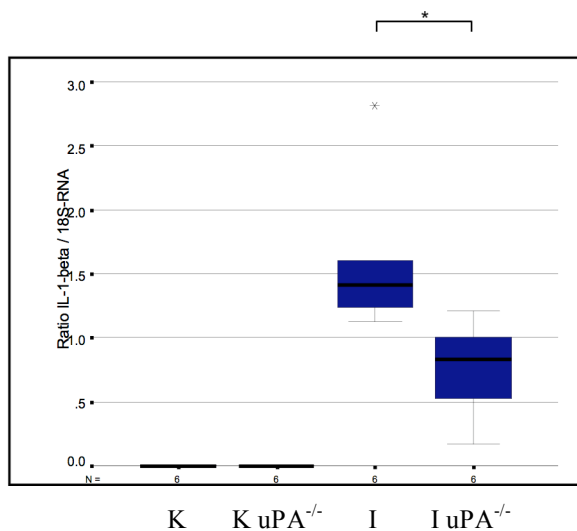
I uPA<sup>-/-</sup>:  $0,54 \pm 0,36$

### 3.6 Expression proinflammatorischer Zytokine

Die Charakterisierung der kardialen Inflammation erfolgte unter anderem durch die Erfassung der Transkriptions-*level* proinflammatorischer Zytokine.

Es wurden die Transkriptions-*level* von IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-15, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  und INF- $\gamma$  gemessen.

Für IL-1 $\beta$  wurden bei den infizierten Gruppen signifikant erhöhte Transkriptions-*level* nachgewiesen (Abb. 3.18). Bei den nicht infizierten Gruppen (K, K uPA<sup>-/-</sup>) konnte kein Signal detektiert werden. Bei den infizierten Tieren war die Expression in der uPA<sup>-/-</sup>-Gruppe gegenüber der WT-Gruppe signifikant verringert {p\*(I, I uPA<sup>-/-</sup>) = 0,006}.



**Abb. 3.18** IL-1 $\beta$ -Expression

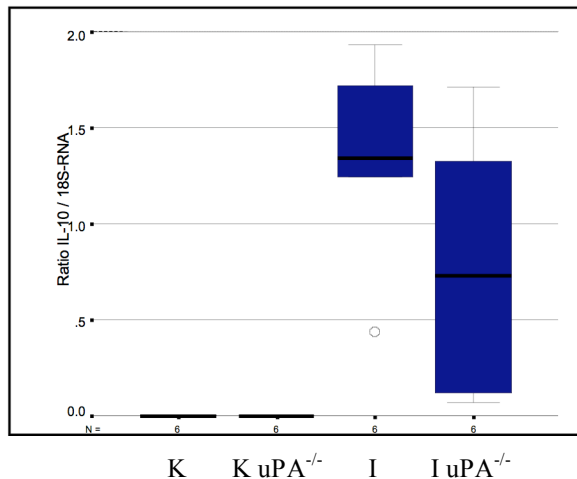
$$p^*(I, I \text{ uPA}^{-/-}) = 0,006,$$

K, K uPA<sup>-/-</sup> nicht detektierbar,

$$I: 1,6 \pm 0,62$$

$$I \text{ uPA}^{-/-}: 0,76 \pm 0,38$$

Das IL-10-Transkript war bei den nicht infizierten Tieren (K, K uPA<sup>-/-</sup>) mittels PCR nicht detektierbar (Abb. 3.19). Bei Infektion war IL-10 deutlich exprimiert. Der Vergleich der infizierten Gruppen zeigte für die uPA<sup>-/-</sup>-Gruppe tendenziell eine *downregulation* (p = 0,1, nicht signifikant).



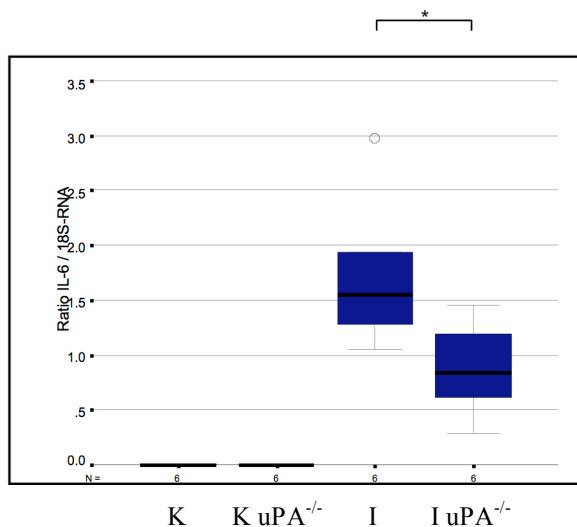
**Abb. 3.19** IL-10-Expression

K, K uPA<sup>-/-</sup> nicht detektierbar,

I:  $1,34 \pm 0,51$

I uPA<sup>-/-</sup>:  $0,78 \pm 0,71$

Für IL-6 konnten die nicht infizierten Gruppen (K, K uPA<sup>-/-</sup>) mittels PCR nicht detektiert werden (Abb. 3.20). Bei Infektion war eine deutlich gesteigerte Expression messbar. Beim Vergleich der infizierten Gruppen wurde für die uPA<sup>-/-</sup>-Gruppe eine signifikant geringere IL-6-Expression nachgewiesen  $\{p^*(I, I uPA^{-/-}) = 0,006\}$ .



**Abb. 3.20** IL-6-Expression

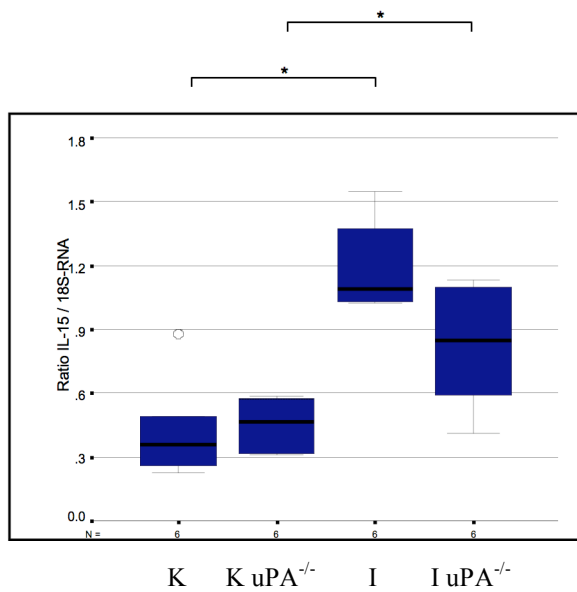
$p^*(I, I uPA^{-/-}) = 0,006$ ,

K, K uPA<sup>-/-</sup> nicht detektierbar,

I:  $1,72 \pm 0,69$

I uPA<sup>-/-</sup>:  $0,87 \pm 0,42$

Das IL-15-Transkript war bei den viral infizierten Tieren signifikant induziert (Abb. 3.21),  $\{p^*(K, I) = 0,004$ ;  $p^*(K uPA^{-/-}, I uPA^{-/-}) = 0,016\}$ . Innerhalb der infizierten Gruppen war IL-15 bei den uPA<sup>-/-</sup>-Mäusen tendenziell geringer exprimiert  $\{p(I, I uPA^{-/-}) = 0,2$ , nicht signifikant}.

**Abb. 3.21** IL-15-Expression

$$p^*(K, I) = 0,004,$$

$$p^*(K \text{ uPA}^{-/-}, I \text{ uPA}^{-/-}) = 0,016,$$

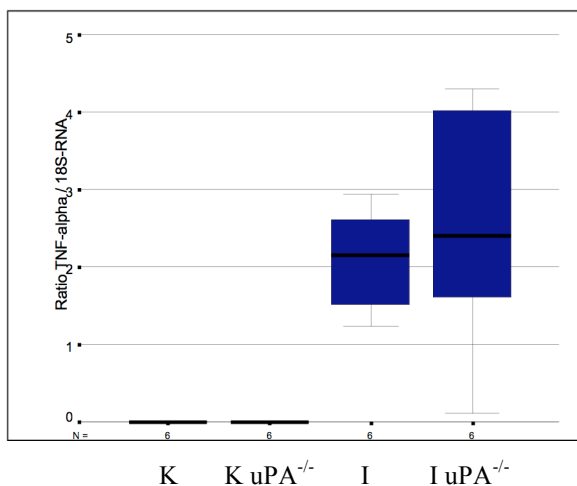
$$K: 0,43 \pm 0,24$$

$$K \text{ uPA}^{-/-}: 0,45 \pm 0,13$$

$$I: 1,19 \pm 0,22$$

$$I \text{ uPA}^{-/-}: 0,82 \pm 0,31$$

TNF- $\alpha$  war in den infizierten Gruppen deutlich induziert (Abb. 3.22). In den nicht infizierten Kontrollgruppen (K, K uPA<sup>-/-</sup>) war kein Signal detektierbar. Innerhalb der infizierten Gruppen stellte sich zwischen WT-Mäusen und uPA<sup>-/-</sup>-Mäusen keine signifikante Expressionsänderung dar.

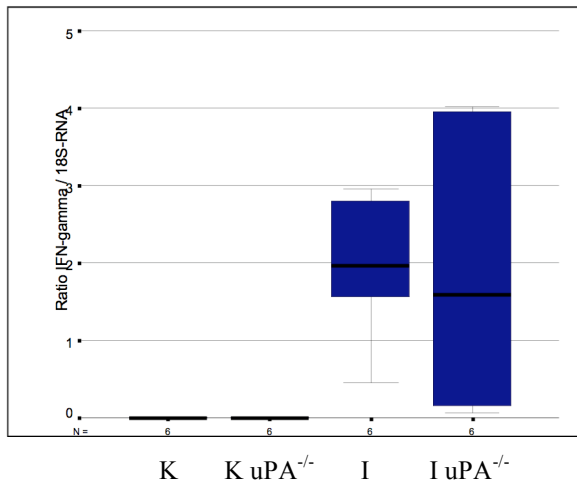
**Abb. 3.22** TNF- $\alpha$ -Expression

K, K uPA<sup>-/-</sup> nicht detektierbar,

$$I: 2,1 \pm 0,69$$

$$I \text{ uPA}^{-/-}: 2,47 \pm 1,63$$

Das INF- $\gamma$ -Transkript war bei den nicht infizierten Gruppen (K, K uPA<sup>-/-</sup>) nicht detektierbar (Abb. 3.23). Der Vergleich zwischen den infizierten Gruppen zeigte keine signifikante Veränderung in der Expression. Innerhalb der infizierten uPA<sup>-/-</sup>-Gruppe waren die Expressionsunterschiede zwischen den einzelnen Tieren relativ groß.



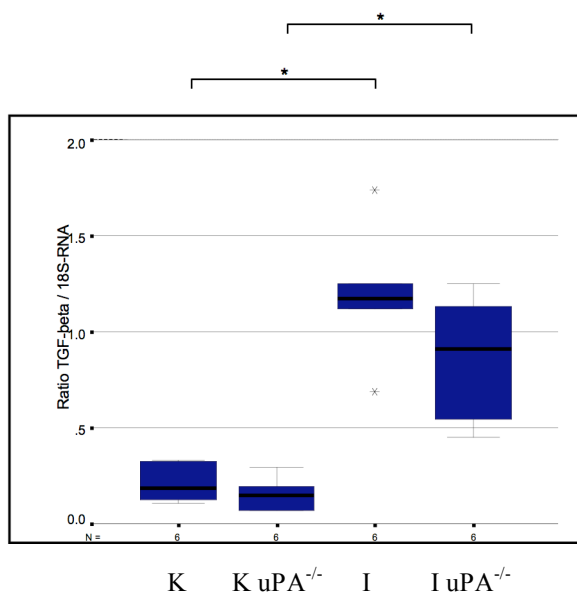
**Abb.3.23** INF- $\gamma$ -Expression

K, K uPA<sup>-/-</sup> nicht detektierbar,

I: 1,95  $\pm$  0,91

I uPA<sup>-/-</sup>: 1,89  $\pm$  1,88

Das TGF- $\beta$ -Transkript war bei der infizierten Gruppen deutlich induziert (Abb. 3.24), {p\*(K, I) = 0,004; p\*(K uPA<sup>-/-</sup>, I uPA<sup>-/-</sup>) = 0,004}. Im Vergleich zur infizierten WT-Gruppe war TGF- $\beta$  bei der infizierten uPA<sup>-/-</sup>-Gruppe leicht nach unten reguliert {p (I, I uPA<sup>-/-</sup>) = 0,1, nicht signifikant}.



**Abb. 3.24** TGF- $\beta$ -Expression

p\*(K, I) = 0,004,

p\*(K uPA<sup>-/-</sup>, I uPA<sup>-/-</sup>) = 0,004,

K: 0,21  $\pm$  0,09

K uPA<sup>-/-</sup>: 0,16  $\pm$  0,08

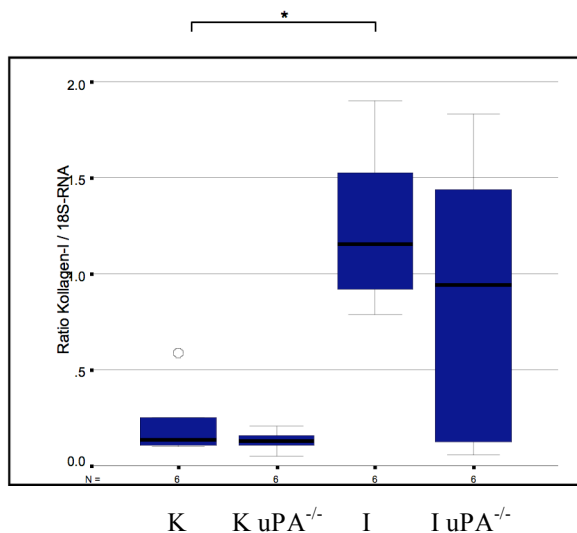
I: 1,19  $\pm$  0,33

I uPA<sup>-/-</sup>: 0,87  $\pm$  0,32

### 3.7 Expression verschiedener Matrixkomponenten

Die Expression zahlreicher Matrixkomponenten ist bei akuter viraler Myokarditis verändert (Li et al., 2002). Mittels RT-PCR wurden die Transkriptions-*level* der Kollagene I- und III und der Glycoproteine Laminin und Fibronectin untersucht.

Sowohl für Kollagen I (Abb. 3.25) als auch für Kollagen III (Abb. 3.26) wurde bei Infektion eine signifikante Expressionssteigerung gefunden  $\{p^*(K, I) = 0,004\}$ . Der Vergleich der infizierten Gruppen (I, I uPA<sup>-/-</sup>) zeigte für beide Kollagene eine geringfügige Mehrexpression bei den WT-Mäusen im Vergleich zur uPA-deletierten Gruppe (p nicht signifikant).



**Abb. 3.25** Kollagen I-Expression

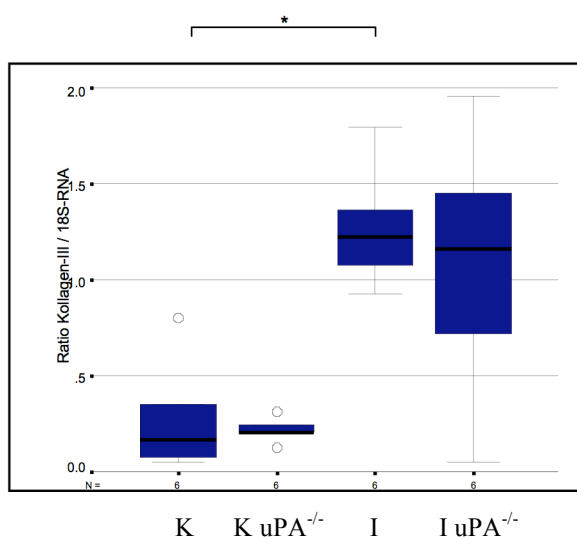
$$p^*(K, I) = 0,004,$$

$$K: 0,22 \pm 0,19$$

$$K \text{ uPA}^{-/-}: 0,13 \pm 0,05$$

$$I: 1,24 \pm 0,42$$

$$I \text{ uPA}^{-/-}: 0,89 \pm 0,77$$



**Abb. 3.26** Kollagen III-Expression

$$p^*(K, I) = 0,004,$$

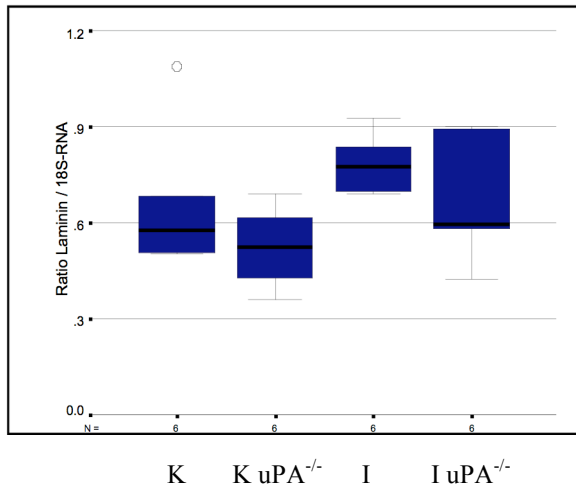
$$K: 0,27 \pm 0,28$$

$$K \text{ uPA}^{-/-}: 0,22 \pm 0,06$$

$$I: 1,27 \pm 0,31$$

$$I \text{ uPA}^{-/-}: 1,1 \pm 0,68$$

Die Expression von Laminin wurde durch Infektion und uPA-Deletion nur unwesentlich beeinflusst (Abb. 3.27). Tendenziell wurde bei Infektion ein leichter Anstieg und bei uPA-Deletion eine geringe *downregulation* gefunden (p nicht signifikant).



**Abb. 3.27** Laminin-Expression

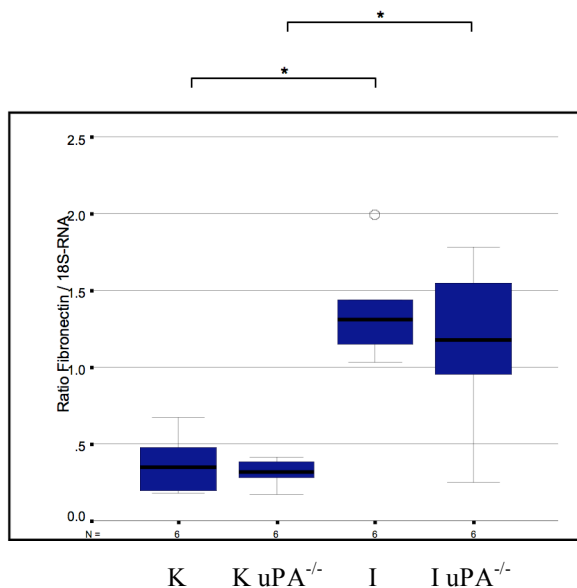
K:  $0,66 \pm 0,22$

K uPA<sup>-/-</sup>:  $0,52 \pm 0,12$

I:  $0,78 \pm 0,09$

I uPA<sup>-/-</sup>:  $0,66 \pm 0,19$

Die Fibronectin-Expression hingegen war bei Infektion signifikant gesteigert (Abb. 3.28),  $\{p^*(K, I) = 0,004; p^*(K \text{ uPA}^{-/-}, I \text{ uPA}^{-/-}) = 0,037\}$ . Bei Infektion war Fibronectin in der uPA<sup>-/-</sup>-Gruppe im Vergleich zur WT-Gruppe geringfügig schwächer exprimiert (p nicht signifikant).



**Abb. 3.28** Fibronectin-Expression

$p^*(K, I) = 0,004,$

$p^*(K \text{ uPA}^{-/-}, I \text{ uPA}^{-/-}) = 0,037,$

K:  $0,37 \pm 0,19$

K uPA<sup>-/-</sup>:  $0,32 \pm 0,09$

I:  $1,37 \pm 0,34$

I uPA<sup>-/-</sup>:  $1,15 \pm 0,54$

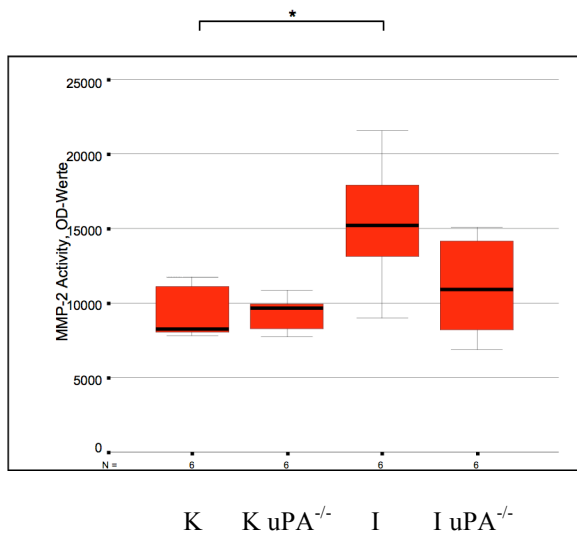


### 3.8 Aktivitätsbestimmung von MMP-2 und MMP-9

Die Gelatinasen A und B (MMP-2 und MMP-9) sind wichtige Determinanten der Matrixdegradation. Bei einer Reihe äthiologisch unterschiedlicher Herzerkrankungen lässt sich eine erhöhte Aktivität beobachten (Altieri et al., 2003; Moshal et al., 2005; Mori et al., 2006). Zur Exploration der Aktivität im uPA<sup>-/-</sup>-Modell erfolgte eine kombinierte Aktivitätsbestimmung von MMP-2 und MMP-9 mittels Gelatinezymographie. Der Einsatz von 10 µg Protein erwies sich als optimal.

Für die relative Aktivitätsangabe wurde die Aktivität der Gelatinasen bei den nicht infizierten WT-Mäusen (K) gleich 1 gesetzt (Mittelwert [K] = 1). Die Enzymaktivitäten in den anderen Gruppen wurden daran relativiert (n-fache Aktivität an K relativiert).

Für MMP-2 konnte bei den infizierten WT-Tieren gegenüber der Kontrollgruppe (K) eine 1,67fach erhöhte Aktivität gemessen werden {p\*(K, I) = 0,01}. Der Vergleich der infizierten Gruppen (I, I uPA<sup>-/-</sup>) zeigte bei uPA-Deletion eine mäßige Aktivitätseinschränkung auf das 0,72fache (p nicht signifikant). Zwischen den nicht infizierten Gruppen (K, K uPA<sup>-/-</sup>) war kein signifikanter Unterschied erkennbar (Abb. 3.29).



**Abb. 3.29** MMP-2-Aktivität

$$p^*(K, I) = 0,01,$$

$$K: 9194 \pm 1719$$

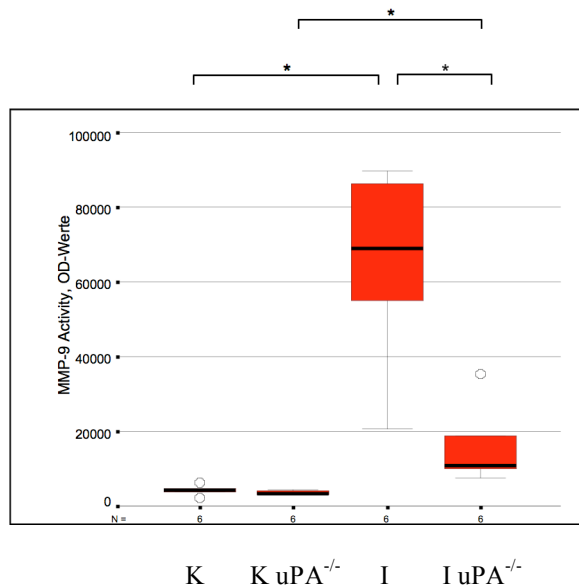
$$K \text{ uPA}^{-/-}: 9353 \pm 1158$$

$$I: 15358 \pm 4319$$

$$I \text{ uPA}^{-/-}: 11015 \pm 3228$$

Für MMP-9 wurde bei der infizierten WT-Gruppe gegenüber der nicht infizierten WT-Gruppe eine ca. 15fache Aktivitätserhöhung detektiert {p\*(K, I) = 0,004}. In der infizierten uPA<sup>-/-</sup>-Gruppe war die Aktivität lediglich 4,2fach erhöht {p\*(K uPA<sup>-/-</sup>, I uPA<sup>-/-</sup>) = 0,004}.

Der Vergleich der infizierten Gruppen ergab bei uPA-Deletion einer signifikante Reduktion der MMP-9-Aktivität  $\{p^*(I, I \text{ uPA}^{-/-}) = 0,006\}$ . Der Vergleich zwischen den nicht infizierten Gruppen (K, K uPA<sup>-/-</sup>) zeigte keinen signifikanten Unterschied (Abb. 3.30).



**Abb. 3.30** MMP-9-Aktivität

$$p^*(K, I) = 0,004,$$

$$p^*(K \text{ uPA}^{-/-}, I \text{ uPA}^{-/-}) = 0,004,$$

$$p^*(I, I \text{ uPA}^{-/-}) = 0,006,$$

$$K: 4261 \pm 1299$$

$$K \text{ uPA}^{-/-}: 3699 \pm 496$$

$$I: 64995 \pm 25737$$

$$I \text{ uPA}^{-/-}: 15595 \pm 3228$$

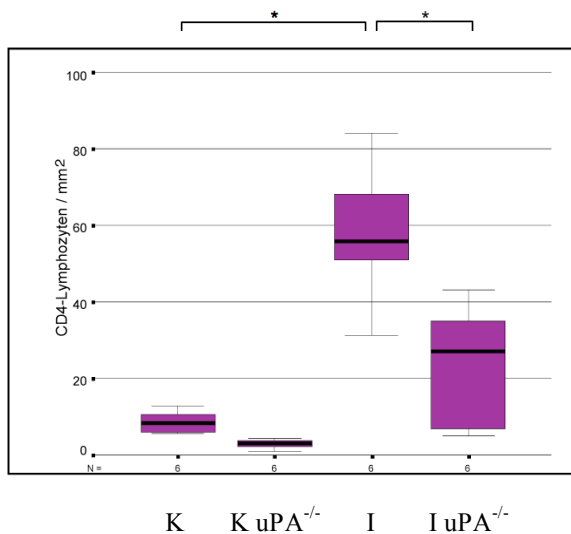
### 3.9 Myokardiale Infiltration durch Entzündungszellen

Ein wichtiger Parameter der myokardialen Inflammation bei einer viralen Myokarditis ist die Infiltration durch Immunzellen. Die Charakterisierung der Infiltration erfolgte durch immun-histochemischen Nachweis unterschiedlicher Gruppen von Entzündungszellen.

Es wurden Färbungen gegen CD-4<sup>+</sup>, CD-8<sup>+</sup>, CD-11b<sup>+</sup>-Zellen und neutrophile Granulozyten durchgeführt. Die Darstellung erfolgte in den Boxplots als Anzahl nachgewiesener Zellen pro Gewebefläche (Zellen / mm<sup>2</sup>).

Exemplarisch sind Schnitte von jeder Färbung auf den Seiten 72 - 74 abgebildet.

Die Färbung mit anti-CD-4<sup>+</sup>-Antikörpern zeigte eine deutliche Infiltration bei der infizierten WT-Gruppe (Abb. 3.31). Es wurden durchschnittlich 57 CD-4-positive Zellen pro mm<sup>2</sup> gezählt  $\{p^*(K, I) = 0,004\}$ . Bei Infektion und uPA-Deletion war die Zahl infiltrierender Zellen mit durchschnittlich 24 pro mm<sup>2</sup> signifikant reduziert  $\{p^*(I, I \text{ uPA}^{-/-}) = 0,016\}$ .



**Abb. 3.31** Infiltration durch CD-4<sup>+</sup>-Zellen

$$p^*(K, I) = 0,004,$$

$$p^*(I, I uPA^{-/-}) = 0,016,$$

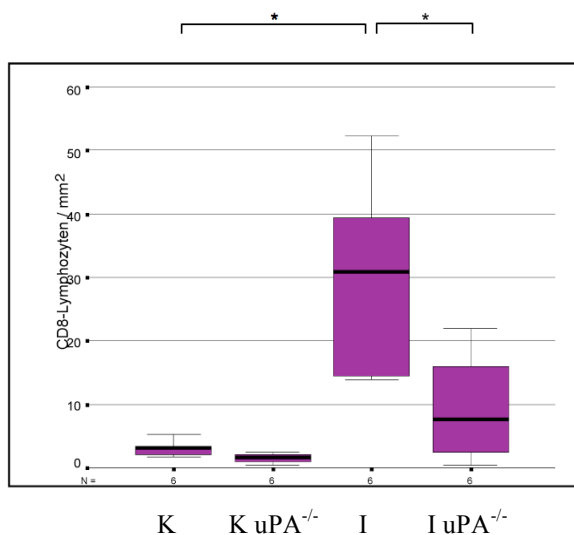
$$K: 8,7 \pm 2,7$$

$$K uPA^{-/-}: 2,9 \pm 1,2$$

$$I: 57,8 \pm 17,8$$

$$I uPA^{-/-}: 24 \pm 15,6$$

Zytotoxische T-Lymphozyten (CTLs) wurden mit anti-CD-8<sup>+</sup>-Antikörpern angefärbt (Abb. 3.32). Die WT-Gruppe zeigte bei Infektion eine Infiltration mit durchschnittlich 30 Zellen pro mm<sup>2</sup> {p\*(K, I) = 0,004}. Bei Infektion und uPA-Deletion war die Infiltration mit durchschnittlich 9 Zellen pro mm<sup>2</sup> im Vergleich zu den infizierten WT-Mäusen signifikant reduziert {p\*(I, I uPA<sup>-/-</sup>) = 0,025}.



**Abb. 3.32** Infiltration durch CD-8<sup>+</sup>-Zellen

$$p^*(K, I) = 0,004,$$

$$p^*(I, I uPA^{-/-}) = 0,025,$$

$$K: 3,1 \pm 1,3$$

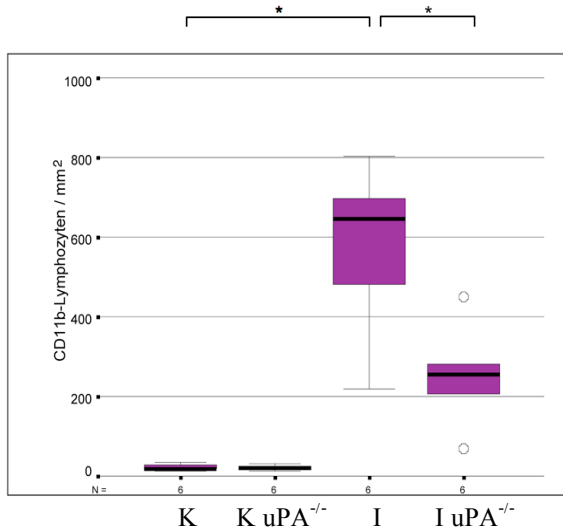
$$K uPA^{-/-}: 1,5 \pm 0,8$$

$$I: 30 \pm 15,5$$

$$I uPA^{-/-}: 9,3 \pm 8,5$$

Zur Detektion der myeloiden Zellreihe wurden neutrophile Granulozyten mit einem monoklonalen Antikörper gefärbt. Makrophagen und Natürliche Killerzellen wurden mit anti-CD-11b<sup>+</sup>-Antikörpern gefärbt.

Die CD-11b<sup>+</sup>-Färbung (Abb. 3.33) zeigte eine beträchtliche Infiltration bei den infizierten WT-Mäusen mit durchschnittlich 582 Zellen pro mm<sup>2</sup> {p\*(K, I) = 0,004}. Im Vergleich zu den infizierten WT-Mäusen war die Infiltration bei Infektion der uPA-deletierten Gruppe mit 253 Zellen pro mm<sup>2</sup> erheblich reduziert {p\*(I, I uPA<sup>-/-</sup>) = 0,025}.



**Abb. 3.33** Infiltration durch CD-11b<sup>+</sup>-Zellen

$$p^*(K, I) = 0,004,$$

$$p^*(I, I uPA^{-/-}) = 0,025,$$

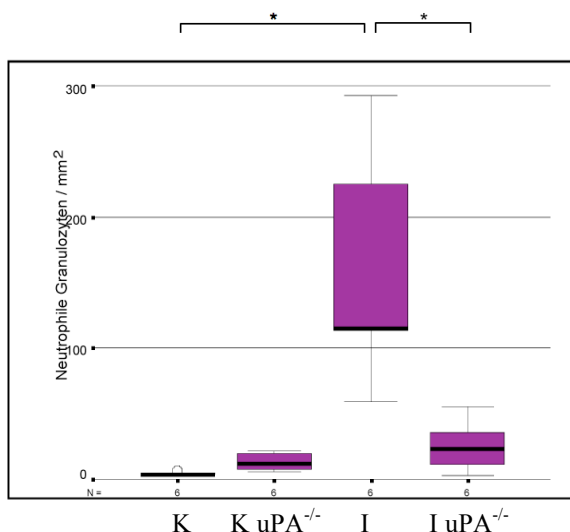
$$K: 22 \pm 7,5$$

$$K uPA^{-/-}: 21 \pm 6,7$$

$$I: 582 \pm 207$$

$$I uPA^{-/-}: 253 \pm 122$$

Die Färbung von neutrophilen Granulozyten mit dem monoklonalen Antikörper NIMP-R 14 (Abb. 3.34) zeigte bei den infizierten WT-Mäusen eine myokardiale Infiltration mit durchschnittlich 153 Zellen pro mm<sup>2</sup> Gewebefläche {p\*(K, I) = 0,004}. Bei Infektion verringerte die uPA-Deletion die Infiltration signifikant. Es wurden durchschnittlich 25 Zellen pro mm<sup>2</sup> gezählt {p\*(I, I uPA<sup>-/-</sup>) = 0,004}.



**Abb. 3.34** Infiltration durch neutrophile Granulozyten

$$p^*(K, I) = 0,004,$$

$$p^*(I, I uPA^{-/-}) = 0,004,$$

$$K: 4,3 \pm 1,5$$

$$K uPA^{-/-}: 13 \pm 6,9$$

$$I: 153 \pm 87$$

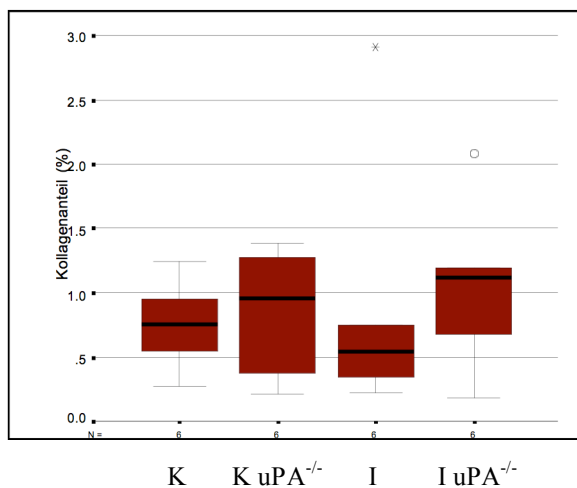
$$I uPA^{-/-}: 25 \pm 19,2$$

### 3.10 Kollagennachweis mit *Sirius red*

Die Bestimmung des myokardialen Kollagenanteils erfolgte mittels *Sirius red*-Färbung. Es stellte sich die Frage, ob am 7. Tag *p.i.* ein veränderter Kollagenanteil im myokardialen Gewebe nachweisbar wäre und inwiefern eine eventuelle Veränderung des Fibrosegrads durch uPA-Deletion beeinflusst würde.

Der gemessene Kollagengehalt wurde als prozentualer Anteil am gesamten untersuchten Herzgewebe dargestellt.

Es zeigte sich keine Änderung des myokardialen Kollagengehaltes zwischen den Gruppen (Abb. 3.35). Der H-Test nach Kruskal-Wallis ergab  $p = 0,75$ , so dass keine Einzelvergleiche durchgeführt werden konnten.



**Abb. 3.35** Kollagennachweis mit

*Sirius red*

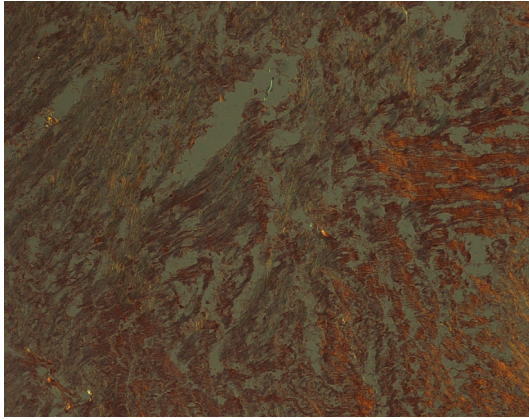
K:  $0,75 \pm 0,33$

K uPA<sup>-/-</sup>:  $0,86 \pm 0,51$

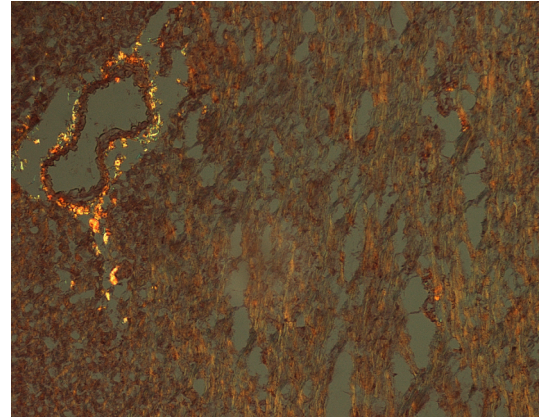
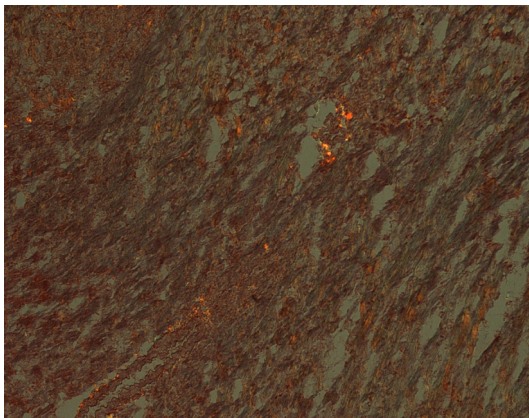
I:  $0,89 \pm 1,0$

I: uPA<sup>-/-</sup>:  $1,06 \pm 0,63$

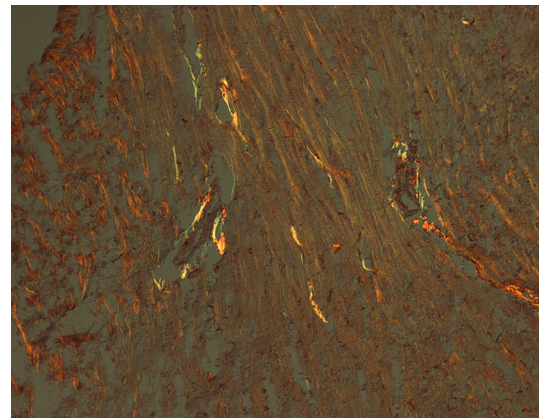
### 3.11 Kollagenfärbung mit *Sirius red*



K

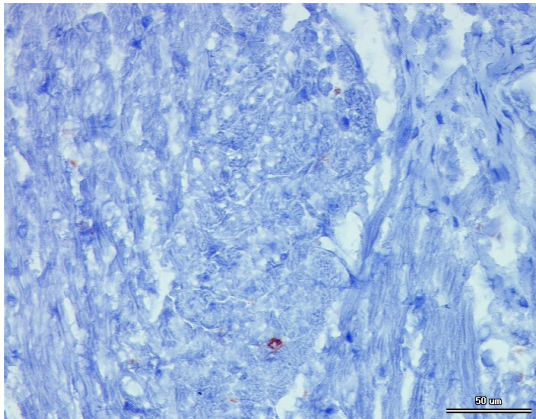
K uPA<sup>-/-</sup>

I

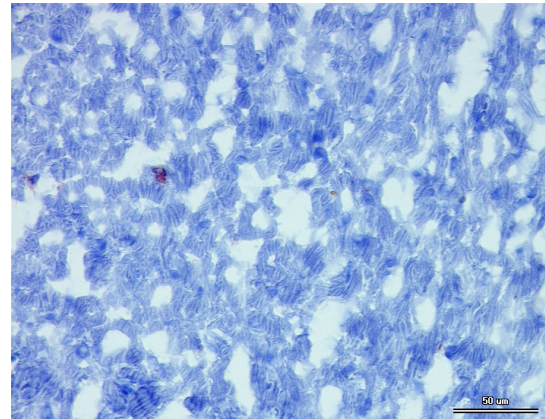
I uPA<sup>-/-</sup>

**Abb. 3.36** Kollagennachweis mit *Sirius red* im Polarisationsmikroskop

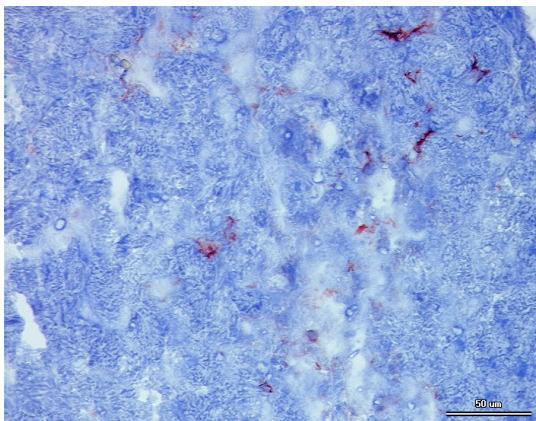
3.12 Immunhistochemische Färbungen



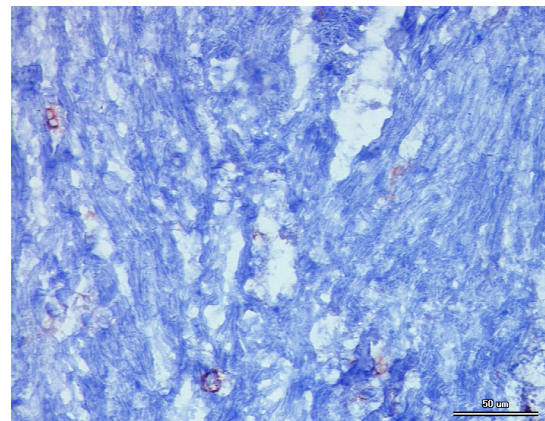
K



K uPA<sup>-/-</sup>

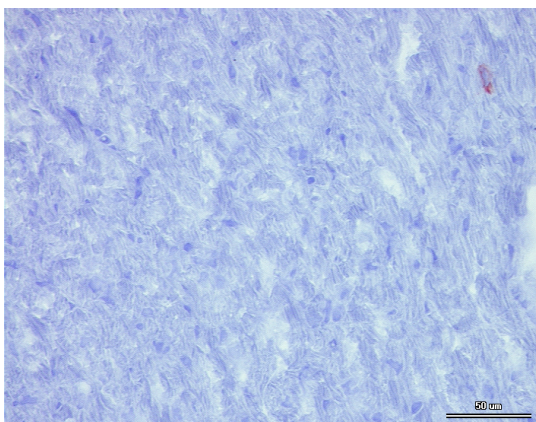


I

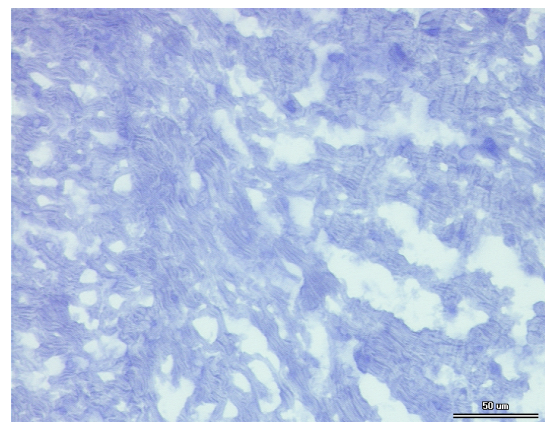


I uPA<sup>-/-</sup>

Abb. 3.37 CD-4<sup>+</sup>-Färbung

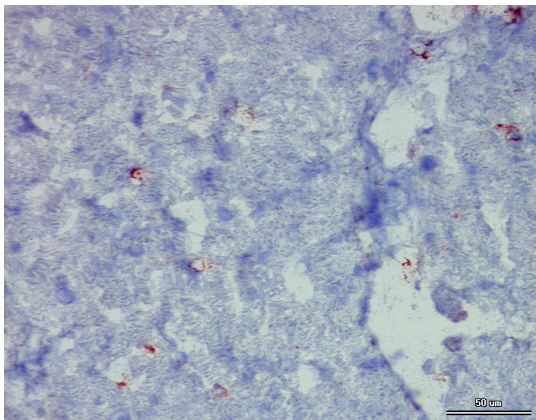


K

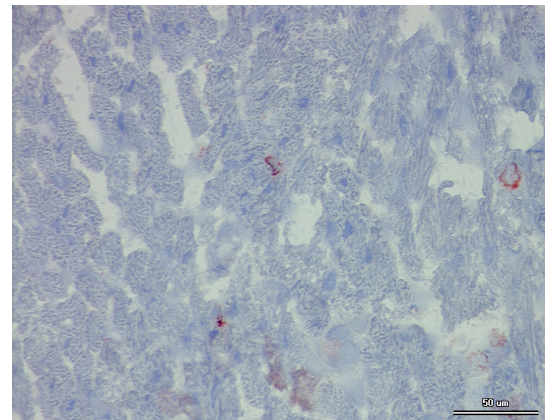
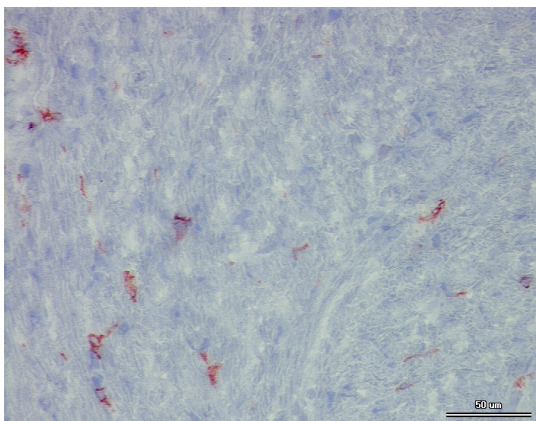


K uPA<sup>-/-</sup>

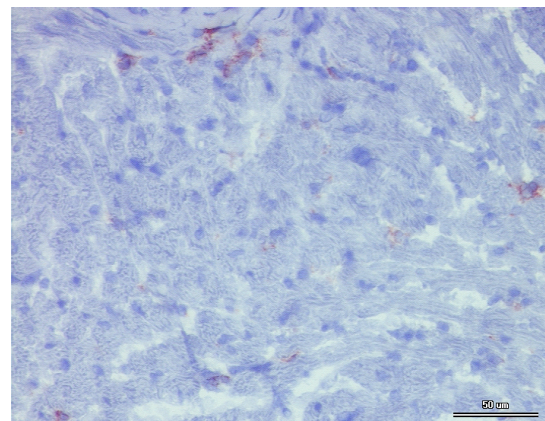
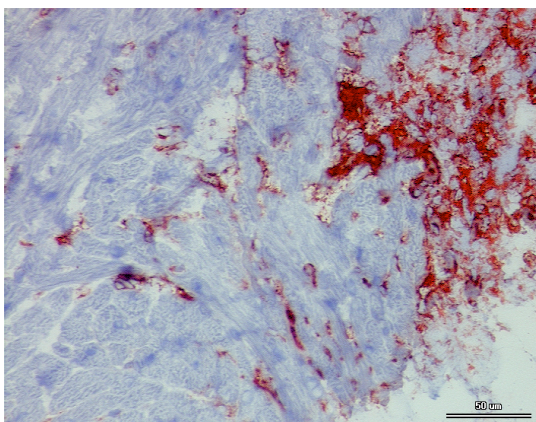
Abb. 3.38 CD-8<sup>+</sup>-Färbung



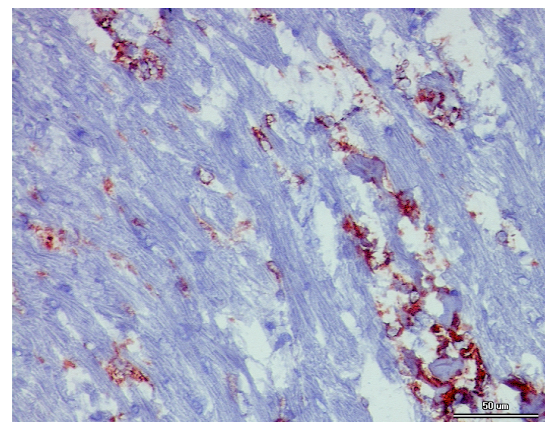
I

I uPA<sup>-/-</sup>**Abb. 3.38** CD-8<sup>+</sup>-Färbung

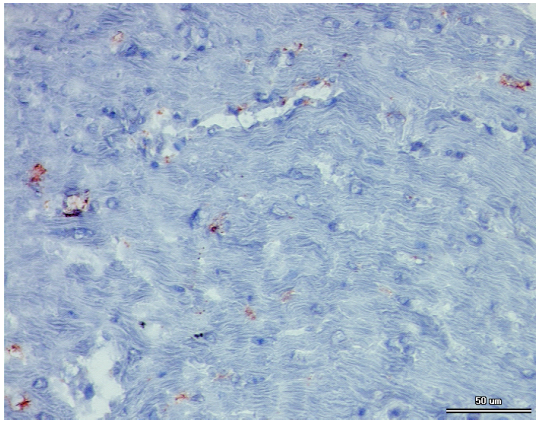
K

K uPA<sup>-/-</sup>

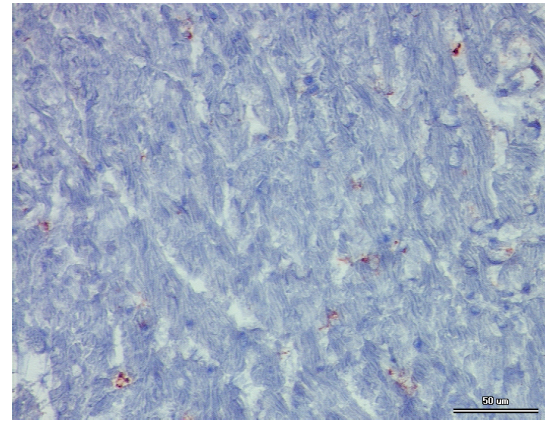
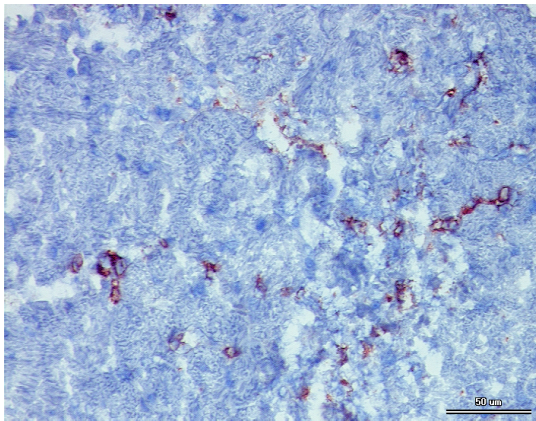
I

I uPA<sup>-/-</sup>**Abb. 3.39** CD-11b<sup>+</sup>-Färbung

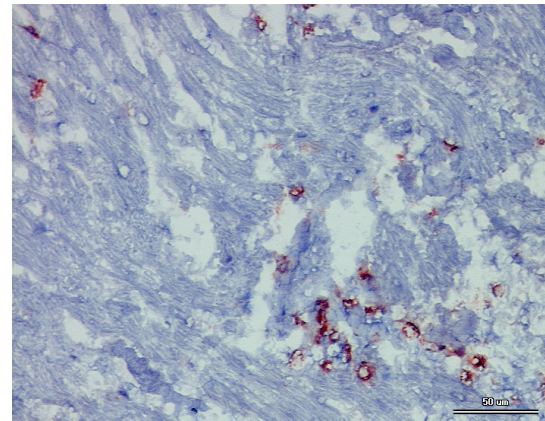




K

K uPA<sup>-/-</sup>

I

I uPA<sup>-/-</sup>

**Abb. 3.40** Färbung für neutrophile Granulozyten