

Aus der Medizinischen Klinik II  
des Universitätsklinikums Benjamin Franklin  
der Freien Universität Berlin  
Abteilung: Kardiologie und Pulmologie  
Direktor: Prof. Dr. med. H.-P. Schultheiss

Analyse der extrazellulären Matrix sowie der Expression von Zytokinen bei enteroviraler  
Myokarditis bei BALB/c Mäusen unter Behandlung mit Interleukin-4

Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung der medizinischen Doktorwürde  
des Fachbereichs Humanmedizin  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
Lars Husmann  
aus Berlin

Referent: PD. Dr. med. M. Pauschinger

Korreferent: Prof Dr. med. H. Zeichhardt

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Humanmedizin der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 17.12.2004

**für  
meine Eltern**

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	1
1.1 Akute 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 .....	4
1.3.2 Rolle der T-Lymphozyten in der Immunpathogenese .....	7
1.4 Die extrazelluläre Matrix .....	10
1.4.1 Remodeling der myokardialen extrazellulären Matrix .....	10
1.4.2 Regulation des myokardialen Remodeling .....	11
1.5 Einfluss von IL-4 auf die Immunpathogenese .....	12
1.6 Hämodynamische Messungen im Mausmodell .....	13
1.7 Problemstellung .....	14
<b>2. Material und Methoden</b> .....	15
2.1 Mausmodell .....	15
2.1.1 Das Virus .....	15
2.1.2 Versuchstiere .....	15
2.1.3 Gruppeneinteilung und Versuchsaufbau .....	15
2.1.4 Versuchsablauf .....	16
2.1.5 Hämodynamische Messungen .....	17
2.1.6 Gewebepräparation .....	17
2.2 Molekularbiologische Methoden .....	18
2.2.1 RNA-Präparation .....	18
2.2.1.1 RNA-Extraktion mittels TRIZOL <sup>®</sup> .....	18
2.2.1.2 DNase-Verdau .....	19
2.2.1.3 Reverse Transkription .....	19
2.2.2 Verwendete Primer für den Nachweis von enteroviralem Genom .....	20
2.2.3 Verwendete Primer für die semiquantitative RT-PCR .....	21
2.2.4 Agarosegelelektrophorese .....	21
2.2.5 Optimierung der PCR-Bedingungen für die einzelnen Primer .....	22

2.2.6	RT-PCR und Nested-RT-PCR.....	24
2.2.7	Semiquantitative RT-PCR .....	25
2.2.8	Sequenzierung der PCR-Produkte .....	26
2.2.9	In-situ-Hybridisierung .....	27
2.2.9.1	DNA-Klonierung der PCR-Produkte.....	27
2.2.9.1.1	Vorbereitungen zur DNA-Klonierung .....	28
2.2.9.1.1.1	Aufreinigung der PCR-Produkte durch Elution aus einem Agarosegel ...	28
2.2.9.1.1.2	Herstellung von Nährmedium für die Bakterienkultur .....	28
2.2.9.1.1.3	Herstellung kompetenter Zellen.....	28
2.2.9.1.1.4	Herstellung von Agarplatten.....	29
2.2.9.1.2	Verwendeter Vektor.....	29
2.2.9.1.3	TA-Ligation .....	30
2.2.9.1.4	Transformation in kompetente E. coli-Zellen.....	30
2.2.9.1.5	Mini-Präparation.....	30
2.2.9.1.6	Maxi-Präparation .....	31
2.2.9.1.7	Sequenzierung der klonierten PCR-Produkte .....	32
2.2.9.2	Linearisierung der Plasmide .....	33
2.2.9.3	Radioaktive Markierung der Sonden .....	35
2.2.9.4	Alkalische Hydrolyse.....	36
2.2.9.5	Vorbereitungen zur Hybridisierung.....	36
2.2.9.5.1	Beschichten von Objektträgern.....	36
2.2.9.5.2	Silikonisieren der Deckgläschen.....	37
2.2.9.5.3	Präparation der Gewebe.....	37
2.2.9.6	Prähybridisierung.....	37
2.2.9.7	Hybridisierung .....	38
2.2.9.8	Waschen nach Hybridisierung.....	38
2.2.9.9	Beschichten der Objektträger mit Fotoemulsion .....	39
2.2.9.10	Entwicklung .....	39
2.2.9.11	Gegenfärbung.....	39
2.3	Proteinchemische Methoden .....	40
2.3.1	Protein-Extraktion mittels TRIZOL <sup>®</sup> .....	40
2.3.2	Konzentrationsbestimmung der Proteine nach Bradford.....	40

2.3.3	WESTERN-Blot .....	41
2.3.3.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese .....	41
2.3.3.2	Immunoblotting .....	42
2.4	Statistische Auswertung und graphische Darstellung der Ergebnisse .....	43
2.5	Eingesetzte Arbeitsmittel .....	44
2.6	Tierversuchsantrag .....	51
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>52</b>
3.1	Krankheitssymptome der Versuchstiere .....	52
3.2	Mortalität .....	52
3.3	Körper- und Herzgewicht der Versuchstiere .....	52
3.4	Ergebnisse der intrakardialen Druckmessung und der Herzfrequenz .....	55
3.4.1	Linksventrikulärer systolischer Druck (LVsP) .....	55
3.4.2	Systolische Funktion (dP/dt max) .....	56
3.4.3	Diastolische Funktion (dP/dt min) .....	57
3.4.4	Herzfrequenz .....	58
3.5	Nachweis enteroviraler RNA .....	59
3.6	Veränderungen der mRNA-Expression .....	60
3.6.1	RT-PCR .....	60
3.6.1.1	Kollagen Typ I .....	61
3.6.1.2	Kollagen Typ III .....	62
3.6.1.3	Ratio Kollagen Typ I / Kollagen Typ III .....	63
3.6.1.4	TNF- $\alpha$ .....	64
3.6.1.5	INF- $\gamma$ .....	65
3.6.2	In-situ-Hybridisierung .....	67
3.7	Veränderungen des Proteingehalts .....	69
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>70</b>
4.1	Nachweis der Kollagene Typ I und III .....	70
4.2	Nachweis der Zytokine und deren Einfluss auf die EZM und auf MMPs .....	72
4.3	Behandlung mit IL-4 .....	73
4.4	Mortalität und Schwere der Erkrankung .....	75

4.5	Maus- und Herzgewicht .....	75
4.6	Hämodynamische Funktionsparameter .....	76
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>82</b>
<b>6.</b>	<b>Publikationsliste</b> .....	<b>83</b>
<b>7.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>84</b>
<b>8.</b>	<b>Lebenslauf</b> .....	<b>87</b>
<b>9.</b>	<b>Selbstständigkeitserklärung</b> .....	<b>88</b>
<b>10.</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>89</b>
<b>11.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>90</b>