

Aus dem Institut für Pathologie der Eberhardt-Karls-Universität Tübingen
Abteilung für Molekulare Pathologie
Ärztlicher Direktor Prof. Dr. med. Reinhard Kandolf

Eingereicht über das Institut für Virologie
des Fachbereiches Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin
Leiter Prof. Dr. med. vet. Hanns Ludwig

**DIE BEDEUTUNG DER ZYTOTOXISCHEN CD8⁺ T –
LYMPHOZYTEN IM VERLAUF DER COXSACKIEVIRUS B3 –
INDUZIERTEN MYOKARDITIS IM MAUSMODELL**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Martina Sauter
Tierärztin aus Stuttgart

Berlin 2003
Journal-Nr. 2703

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Leo Brunnberg
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Hanns Ludwig
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Reinhard Kandolf
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Volker Bergmann

Deskriptoren (CAB): Coxsackieviruses, myocarditis, CD8+ lymphocytes, mice

Tag der Promotion: 03. Juni 2003

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGEN	5
1. EINLEITUNG	7
1.1. TAXONOMIE	8
1.1.1. Morphologie der Picornaviren	9
1.1.2. Genomstruktur und Replikationszyklus	9
1.2. HUMANPATHOGENE ENTEROVIREN	12
1.2.1. Wirtsspektrum der Coxsackieviren	12
1.2.2. Zellkulturspektrum der Coxsackie B Viren	13
1.2.3. Differenzierung der Serotypen	14
1.2.4. Pathogenese der Coxsackievirus - Infektion	14
1.3. Aspekte der zellulären Zytotoxizität	15
1.3.1. Effektorzellen der zellulären Zytotoxizität	15
1.3.2. Mechanismen der T-Zell-vermittelten Zytotoxizität	17
1.4. CVB3 - MYOKARDITIS IM MAUSMODELL	19
1.4.1. Abhängigkeit des Verlaufs der CVB3-Myokarditis von der Genetik des Mausstammes	19
1.4.2. Pathogenese der CVB3-induzierten Myokarditis im Mausmodell	20
1.4.3. Die Rolle von T- und B-Lymphozyten bei der CVB3-Myokarditis	21
2. ZIELSETZUNG	24
3. MATERIAL UND METHODEN	25
3.1. MATERIAL	25
3.1.1. Chemikalien	25
3.1.2. Zellkulturmedien und Zusätze	26
3.1.2. Enzyme	26
3.1.3. Nukleotide und Nukleinsäuren	27
3.1.4. Plasmide	27
3.1.5. Bakterienstämme	27
3.1.6. Antikörper	27
3.1.7. Sonstiges	28
3.1.8. Viren	28
3.1.9. Versuchstiere - ingezüchtete Mausstämme	28
3.2. METHODEN	29
3.2.1. Zellkultur	29
3.2.1.1. Medien und Puffer für die Zellkultur	29
3.2.1.2. Kultivierung von Verozellen	29

Inhaltsverzeichnis

3.2.2. Virologische Methoden.....	30
3.2.2.1. Virusvermehrung	30
3.2.2.2. Medien und Lösungen für die Virustitration	30
3.2.2.3. Virustitration.....	31
3.2.3. Tierversuch.....	31
3.2.3.1. Tierhaltung.....	32
3.2.3.2. Infektion und Tötung der Versuchstiere.....	32
3.2.3.3. Serumgewinnung und Organentnahme.....	32
3.2.3.4. Fixierung der entnommenen Organe.....	32
3.2.4. Anfertigung von Gewebeschnitten	33
3.2.4.1. Vorbehandlung der Objektträger	33
3.2.4.2. Anfertigung von Kryo- und Paraffinschnitten	33
3.2.5. Präparation von rekombinanten Plasmiden	34
3.2.5.1. Puffer und Lösungen für die Plasmidpräparation	34
3.2.5.2. Plasmidpräparation.....	35
3.2.5.3. Linearisierung des Plasmids pCVB3-R1	35
3.2.5.4. Phenolextraktion.....	36
3.2.5.5. Ethanolfällung.....	36
3.2.5.6. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	36
3.2.6. Herstellung der RNA-Hybridisierungssonden.....	37
3.2.6.1. Radioaktive Markierung der RNA-Sonden	37
3.2.6.2. Sephadex G50 Säulenzentrifugation.....	38
3.2.6.3. Limitierte alkalische Hydrolyse der radioaktiv markierten RNA	39
3.2.6.4. Nichtdenaturierende Agarosegelelektrophorese	39
3.2.7. RNA/RNA <i>in situ</i> Hybridisierung	39
3.2.7.1. Allgemeine Vorbereitungsarbeiten zur <i>in situ</i> Hybridisierung	39
3.2.7.2. Vorbehandlung der Deckgläschen	40
3.2.7.3. Puffer und Lösungen für die <i>in situ</i> Hybridisierung.....	40
3.2.7.4. Vorbereitung der Paraffinschnitte für die <i>in situ</i> Hybridisierung.....	40
3.2.7.5. Methode der <i>in situ</i> Hybridisierung	41
3.2.7.6. Permeabilisierung der Gewebeschnitte.....	41
3.2.7.7. Hybridisierung der Gewebeschnitte.....	41
3.2.7.8. Posthybridisierung	42
3.2.7.9. Autoradiographie	43
3.2.7.10. Entwicklung	43

Inhaltsverzeichnis

3.2.7.11. Hämatoxilin - Eosin - Färbung	44
3.2.8. Isolierung enteroviraler RNA aus Myokardgewebe	44
3.2.8.1. Puffer und Lösungen für die Isolierung enteroviraler RNA.....	44
3.2.8.2. Isolierung enteroviraler RNA aus nativem Myokardgewebe.....	45
3.2.9. Nested RT-PCR und Gelelektrophorese zum Nachweis enteroviraler RNA	46
3.2.9.1. Puffer für die nested RT-PCR und Gelelektrophorese	46
3.2.9.2. Reverse Transkription von RNA und Polymerasekettenreaktion	47
3.2.9.3. DNA-Agarosegelelektrophorese.....	49
3.2.10. Immunhistochemische Methoden	50
3.2.10.1. Puffer und Lösungen für die immunhistochemische Markierung.....	50
3.2.10.2. Nachweis spezifischer Oberflächenmarker mittels indirekter Immunhistochemie.....	50
3.2.10.3. Immunhistochemische Markierung.....	51
3.2.11. TUNEL-Assay zum <i>in situ</i> -Nachweis apoptotischer Zellen	52
3.2.12. Vergleichende morphometrische und statistische Untersuchungen im Myokard CVB3-infizierter C57BL/6J Mäuse, Perforin knock out Mäuse und β_2 Mikroglobulin knock out Mäuse	53
3.2.12.1. Quantifizierung der autoradiographischen Signale.....	53
3.2.12.2. Quantifizierung der immunhistochemisch gefärbten Zellen.....	53
3.2.12.3. Morphometrische Analyse des myokardialen Gewebes Schadens	54
3.2.12.4. Statistische Untersuchungen.....	54
4. ERGEBNISSE: Vergleichende Untersuchungen zum Verlauf der CVB3-Infektion in C57BL/6J Mäusen, Perforin knock out Mäusen und β_2 Mikroglobulin knock out Mäusen	55
4.1. Ergebnisse der Virustitration.....	55
4.2. Tierversuchsplan.....	56
4.3. Klinische Beobachtungen und Mortalität.....	56
4.4. Vergleich der histopathologischen Myokardbefunde bei CVB3-infizierten Mäusen	57
4.5. Nachweis enteroviraler RNA im Myokard CVB3-infizierter Mäuse mittels radioaktiver RNA-RNA <i>in situ</i> Hybridisierung und RT-PCR	60
4.5.1. Generierung der CVB3-spezifischen Sonde für die <i>in situ</i> Hybridisierung	60
4.5.2. Vergleich der myokardialen Infektionsmuster in CVB3-infizierten Mäusen mittels radioaktiver RNA-RNA <i>in situ</i> Hybridisierung	61

4.5.3. Nachweis enteroviraler RNA im Myokard CVB3-infizierter Mäusen mittels RT-PCR.....	64
4.6. Qualitative und quantitative Differenzierung der Entzündungszellinfiltrate im Myokard CVB3-infizierter Mäuse	66
4.6.1. Differenzierung der mononukleären Entzündungszellinfiltrate	66
4.6.2. Qualitative Analyse der Infiltratzellen im Myokard CVB3-infizierter Mäuse.....	67
4.6.3. Quantifizierung der Infiltratzellen im Myokard CVB3-infizierter Mäuse	69
4.7. Nachweis apoptotischer Zellen im Myokard CVB3-infizierter Mäuse	71
4.8. Verlauf der CVB3-Infektion in den verschiedenen Organen infizierter Mäuse.....	72
4.8.1. Histologische Untersuchung verschiedener Organe infizierter Mäuse während der akuten und chronischen Phase der CVB3-Myokarditis	73
4.8.2. Nachweis viraler RNA in verschiedenen Organen CVB3-infizierter Mäuse mittels <i>in situ</i> Hybridisierung.....	74
5. DISKUSSION	77
6. ZUSAMENFASSUNG	89
7. SUMMARY	90
8. LITERATURVERZEICHNIS	91
DANKSAGUNG	106
LEBENS LAUF	107
SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	108

Abkürzungen

ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
AP	Alkalische Phosphatase
APC	antigen presenting cell
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	cluster of differentiation
cpm	counts per minute
CVB3	Coxsackievirus B3
depc	Diethylpyrocarbonat
DNA	Deoxyribonucleicacid
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HSV	Herpes simplex Virus
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
LB Medium	Luria Bertani Medium
LCMV	Lymphozytäres Choriomeningitis Virus
MIP	macrophage inflammatory peptide
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
PCR	polymerase chain reaction/Polymerasekettenreaktion
pfu	plaque-forming unit
p.i.	post infectionem
PBS	phosphate buffered saline
OD	Optische Dichte
RANTES	regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted
RNA	Ribonucleicacid
RNAguard	RNase-Inhibitor
rpm	rounds per minute
RT	Reverse Transkription
rTth-Polymerase	reverse Thermus thermophilus DNA-Polymerase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	standard saline citrate
Taq-Polymerase	Thermus aquaticus DNA-Polymerase

Abkürzungen

TBS	Tris buffered saline
UV	ultraviolett
TCR	T-cell receptor

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde am Pathologischen Institut der Eberhard-Karls-Universität Tübingen in der Abteilung für Molekulare Pathologie, Ärztlicher Direktor Prof. Dr. R. Kandolf, durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. R. Kandolf danke ich für den Arbeitsplatz, Mittel und Unterstützung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. H. Ludwig danke ich für die Vertretung der Arbeit vor dem Fachbereich Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Karin Klingel für die ausdauernde Betreuung, intensive Unterstützung und freundschaftliche Zusammenarbeit bei der Durchführung dieser Arbeit.

Ferner bedanke ich mich bei allen Mitgliedern der Abteilung für Molekulare Pathologie für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und die zahllosen, hilfreichen Ratschläge – vor allem Carmen Ruoff und Sandra Bundschuh möchte ich für ihre Unterstützung beim Anfertigen von unzähligen Gewebeschnitten danken.

Außerdem ein herzliches Dankeschön an meine Familie, die mich bei allen meinen Vorhaben stets unterstützt hat.

Mein ganz spezieller Dank geht an Heinrich Heller, der mir in einer entscheidenden Phase die nötigen Impulse zur Fertigstellung der vorliegenden Arbeit gegeben hat.

LEBENS LAUF

Geboren am 22. Januar 1966 in Stuttgart.

Eltern:

Dipl. Ing. (FH) Werner Sauter, Jahrgang 1925, Unternehmer im Ruhestand

Annemarie Sauter geb. Guth, Jahrgang 1927, Buchhalterin im Ruhestand

Schulbildung:

1972-1976 Römergrundschule in Stuttgart

1976-1985 Gymnasium Königin-Olga-Stift in Stuttgart; Erlangung der allgemeinen Hochschulreife

Studium:

1987 Beginn des Studiums der Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin

1993 Beendigung des Studiums mit Ablegung des 3. Staatsexamens

18. Januar 1994 Erlangung der Approbation als Tierärztin

Seit September 1994 beschäftigt in der Abteilung für Molekulare Pathologie, Ärztlicher Direktor Prof. Dr. R. Kandolf, Universitätsklinikum Tübingen. Von 1998-2002 Dissertation mit dem Thema "Die Bedeutung der zytotoxischen CD8⁺ T-Lymphozyten im Verlauf der CVB3-induzierten Myokarditis im Mausmodell".

SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Hiermit bestätige ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Ich versichere, daß ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Tübingen 2003

Martina Sauter