

**Aus der Klinik für Innere Medizin, SP Kardiologie
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Bernhard Maisch**

**des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg
in Zusammenarbeit
mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Marburg**

**Expression des murinen Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptors (CAR)
im Herzen verschiedener Mausarten**

**Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Humanmedizin**

**dem
Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von**

**Verena Marx
aus Braunschweig**

Marburg/Lahn 2007

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

am: 28.11.2007

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. med. M. Rothmund

Referent: Prof. Dr. med. B. Maisch

Koreferent: Prof. Dr. K. Radsak

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Myokarditis.....	1
1.2	Coxsackieviren.....	3
1.3	Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptor (CAR).....	6
1.4	CVB3 induzierte Myokarditis.....	9
2	Material und Methoden	17
2.1	Materialien.....	17
2.2	Versuchstiere und Versuchstierhaltung.....	19
2.3	Präparation und Entnahme der Organe.....	20
2.4	Isolierung von Kardiomyozyten.....	20
2.5	Vorversuche/Testung der mCAR Primer.....	21
2.6	Isolierung von RNA aus verschiedenen Mausegeweben.....	23
2.6.1	RNA-Gehaltsbestimmung am Photometer.....	24
2.7	Nachweis von mCAR mRNA mittels RT-PCR.....	24
2.7.1	One-step RT-PCR.....	25
2.7.2	Real-time RT-PCR.....	27
2.8	Agarose-Gelelektrophorese.....	29
2.9	Analyse der mCAR mRNA Sequenz.....	29
2.9.1	Reinigen der PCR-Amplifikate und ddF-Reaktion.....	30
2.9.2	Nicht-denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	31
2.10	Statistische Auswertung.....	32
3	Ergebnisse	34
3.1	Messpräzision (Intraassay-Varianz und Interassay-Varianz).....	34
3.2	Vergleich der PCR-Methoden.....	37
3.3	Vergleich der mCAR mRNA Expression in verschiedenen Organen der C57/Bl6-Maus.....	39
3.4	Vergleich der mCAR mRNA Expression im Herzen und Skelett- muskel der DBA/2- und C57/Bl6-Maus.....	40
3.5	Vergleich der mCAR mRNA Expression im Herzen der DBA/2- und C57/Bl6-Maus.....	42

3.6	Vergleich der mCAR mRNA Expression in isolierten Kardiomyozyten der DBA/2- und C57/Bl6-Maus.....	44
3.7	Vergleich der mCAR mRNA Expression im Herzen der DBA/2-, Balb/c-, C57/Bl6- und CBA-Maus.....	46
3.8	Analyse der mCAR mRNA Sequenz bei verschiedenen Mausarten.....	48
4	Diskussion.....	51
4.1	Diskussion der Methoden.....	51
4.1.1	Versuchstiere.....	51
4.1.2	Kardiomyozyten.....	51
4.1.3	Messpräzision (Intraassay- und Interassay-Varianz).....	52
4.1.4	Nachweis der mCAR mRNA Expression mittels RT-PCR.....	52
4.1.4.1	One-step RT-PCR.....	53
4.1.4.2	Real-time RT-PCR.....	54
4.1.5	Sequenzanalyse.....	55
4.2	Diskussion der Ergebnisse.....	56
4.2.1	Vergleich der mCAR mRNA Expression in verschiedenen Organen der C57/Bl6-Maus.....	56
4.2.2	Vergleich der mCAR mRNA Expression im Herzen und Skelettmuskel der DBA/2-undC57/Bl6-Maus.....	57
4.2.3	Vergleich der mCAR mRNA Sequenz der verschiedenen Mausarten.....	58
4.2.4	Vergleich der mCAR mRNA Expression im Herzen der verschiedenen Mausarten.....	60
5	Zusammenfassung.....	69
6	Literaturverzeichnis.....	72

Verwendete Abkürzungen:

AK	Antikörper
AS	Aminosäure
Basen:	
A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
bp	Basenpaare
CAR	Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptor
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten
CVB3	Coxsackievirus der Gruppe B 3
DCM	dilatierende Kardiomyopathie
ddF	Dideoxy Fingerprinting
DNA	Desoxyribonukleinsäure
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
hCAR	humaner Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptor
Ig	Immunglobulin
ISFC	International Society and Federation of Cardiology Task Force
kDa	KiloDalton
M	molar
mCAR	muriner Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptor
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (messenger-RNA)
NCR	nicht-kodierende Region
NK-Zellen	Natürliche-Killer-Zellen
nm	Nanometer
nt	Nukleotide
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
Primer:	
F	forward

R	reverse
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
RT-PCR	Reverse Transkription-PCR
SA-Valvulae	Sinuatricale Valvulae
SM	Skelettmuskel
TH-Zellen	T-Helfer Zellen
Triphosphate:	
ATP	Adenosintriphosphat
CTP	Cytosintriphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
TTP	Thymidintriphosphat
VK	Variationskoeffizient
VP	Virusprotein
WHF	World Heart Federation
WHO	World Health Organisation

1 Einleitung

1.1 Myokarditis

Bei der Myokarditis handelt es sich um eine entzündliche Herzmuskelerkrankung, die in unterschiedlichem Ausmaß die Herzmuskelzellen, das Interstitium sowie koronare Gefäße betreffen kann (Strauer *et al.*, 2001).

Nach der WHO/ISFC-Klassifikation von 1995 gehört die Myokarditis zu den spezifischen Herzmuskelerkrankungen, deren Ursache auf eine Vielzahl verschiedener Noxen zurückzuführen ist (Richardson *et al.*, 1996), wobei in erster Linie infektiöse von nicht infektiösen Ursachen unterschieden werden. Die Mehrzahl der infektiösen Myokarditiden wird durch kardiotope Viren verursacht, von denen insbesondere die Enteroviren (v. a. Coxsackieviren der Gruppe B), Adenoviren, Zytomegalieviren sowie Parvovirus B19, Hepatitis-C-Virus und HIV hervorzuheben sind. Aber auch bakterielle Erreger wie Borrelien oder Chlamydien sowie Protozoen und Pilze kommen als Auslöser in Betracht. Zu den selteneren, nicht infektiösen Ursachen zählen neben den Kollagenosen, Vaskulitiden und rheumatischen Erkrankungen u. a. auch verschiedene Medikamente (Feldman *et al.*, 2000, Strauer *et al.*, 2001, Pankuweit *et al.*, 2003).

Der Verlauf einer Myokarditis ist akut oder chronisch und meist gutartig mit passagerem Krankheitsbild. In bis zu 30% der Fälle kann sich jedoch aus einer Myokarditis eine aktive dilatierende Kardiomyopathie (DCM) mit zunehmender Herzinsuffizienz entwickeln. Auch fulminante Verläufe mit akutem Pumpversagen des linken Ventrikels und bedrohlichen Arrhythmien sind möglich, aber selten. Insgesamt ist die kardiale Beteiligung bei der Myokarditis meist fokal, selten diffus (Richardson *et al.*, 1996, Strauer *et al.*, 2001).

Die Klassifikation der Myokarditis erfolgt nach klinischen, histologischen und immunhistochemischen Kriterien. Nach klinisch-pathologischen Gesichtspunkten wird eine fulminante Myokarditis von akuten und chronischen Formen unterschieden (Lieberman *et al.*, 1991). Patienten mit einer fulminanten Myokarditis weisen einen akuten Krankheitsbeginn mit schwerer kardialer Dysfunktion auf, die entweder spontan ausheilt oder einen tödlichen Verlauf zeigt. Histopathologisch finden sich bei den fulminanten Formen multiple Foci einer aktiven Myokarditis. Patienten mit einer akuten, chronisch aktiven oder chronisch persistierenden Myokarditis zeigen einen leichteren Krankheitsverlauf. Die akute Myokarditis geht häufig mit einer ventrikulären

Dysfunktion einher, die entweder auf immunsuppressive Therapie anspricht oder einen Übergang in eine dilatierende Kardiomyopathie zeigt. Patienten mit einer chronisch aktiven Myokarditis sprechen initial ebenfalls gut auf eine Behandlung mit Immunsuppressiva an, zeigen aber oft sowohl klinische als auch histologische Residuen und entwickeln häufig eine ventrikuläre Dysfunktion, die histologisch mit chronisch entzündlichen Veränderungen (inklusive Riesenzellen) einhergeht. Die chronisch persistierende Myokarditis ist durch ein persistierendes histologisches Infiltrat, oft in Kombination mit Nekrosen, gekennzeichnet (Lieberman *et al.*, 1991).

Histologisch finden sich bei der fulminanten Myokarditis akut behandlungsbedürftige Formen wie die Riesenzellmyokarditis (giant cell myocarditis, Cooper *et al.*, 1997) und die akute lymphozytäre Myokarditis. Erste führt, falls nicht umgehend immunsuppressiv behandelt, rasch zum Tode, während die fulminante lymphozytäre Myokarditis oft spontan ausheilt. Zur Differenzierung beider Formen ist eine Endomyokardbiopsie unverzichtbar (Maisch *et al.*, 2006 a, b).

Zur histologischen Klassifikation der akuten Myokarditis wurden die Dallas-Kriterien eingeführt (Aretz *et al.*, 1987), welche im Jahre 1998 von einem Expertenkomitee der World Health Federation (WHF) erweitert und durch die Einführung immunhistochemischer Methoden zur Diagnosestellung präzisiert wurden (Maisch *et al.*, 2000). Nach histologischen Gesichtspunkten wird die Myokarditis als ein Prozess definiert, der durch ein entzündliches Infiltrat im Myokard gekennzeichnet ist. Während für die Definition einer akuten (aktiven) Myokarditis zusätzlich eine Nekrose und/oder eine Degeneration der das Infiltrat umgebenden Myozyten gefordert wird, stellt die Nekrose kein obligates Merkmal einer chronischen Myokarditis dar (Maisch *et al.*, 2000, Strauer *et al.*, 2001). Nach den Dallas-Kriterien werden beim histologischen Nachweis der Myokarditis das Vorliegen von Entzündungszellen, Myozytolysen und ggf. Fibrose gefordert. Bei der neuen Klassifikation nach WHF wird die Entzündung zusätzlich quantifiziert (≥ 14 Lymphozyten/mm², inklusive bis zu vier Makrophagen). Die infiltrierenden Zellen werden immunhistochemisch differenziert, wodurch vor allem chronische Entzündungsprozesse (Borderline bzw. chronische Myokarditis) besser charakterisiert werden, zumal Myozytolysen nicht immer in Myokardbiopsien nachweisbar sind und somit durch die Dallas-Kriterien nicht definiert sind (Maisch *et al.*, 2006 a, b, 2000, Strauer *et al.*, 2001, Pankuweit *et al.*, 2002). In Anlehnung an die Dallas-Kriterien unterscheidet man bei der ersten Biopsie die akute/aktive (mit Myozytolyse) von der „Borderline“ (ohne Myozytolyse) bzw. keiner Myokarditis.

Durch Entnahme weiterer Biopsien kann eine persistierende von einer abheilenden oder abgeheilten Myokarditis abgegrenzt werden. Eine persistierende Myokarditis liegt dann vor, wenn in einer Folgebiopsie die Kriterien der akuten Myokarditis (Myozytolyse, Infiltrat etc.) weiterhin nachweisbar sind. Fehlen diese Kriterien nach einer initial positiven Biopsie, so spricht man von einer abgeheilten Myokarditis. Eine abheilende Myokarditis liegt vor, wenn in einer Folgebiopsie zwar noch Kriterien einer akuten bzw. chronischen Myokarditis nachweisbar sind, der immunologische Prozess aber deutlich geringer ausgeprägt ist als in der ersten Biopsie (Maisch *et al.*, 2000, 2006 b).

Liegen neben den oben genannten histologischen Kriterien der Myokarditis auch hämodynamische Veränderungen in Verbindung mit einer kardialen Dilatation sowie einer eingeschränkten linksventrikulärer Funktion (EF < 50%) vor, so handelt es sich nach der WHF-Definition von 1995 um eine sog. inflammatorische Kardiomyopathie, wobei zwischen idiopathischen, autoimmunen und infektiösen Formen unterschieden werden kann (Maisch *et al.*, 2000, 2005, 2006 a, b, Richardson *et al.*, 1999).

Die virale Kardiomyopathie wird als Persistenz viralen Genoms bei DCM definiert. Liegt zusätzlich eine begleitende myokardiale Entzündung (≥ 14 Lymphozyten und Makrophagen/mm² in einer Myokardbiopsie) vor, so wird laut WHF-Definition von 1995 von einer viralen inflammatorischen Kardiomyopathie oder Virusmyokarditis gesprochen (Maisch *et al.*, 2005, Pankuweit *et al.*, 2004).

1.2 Coxsackieviren

Coxsackieviren zählen neben den Polio- und ECHO-Viren zur Gruppe der Enteroviren aus der Familie der Picornaviren. Die Einteilung der Coxsackieviren erfolgt in zwei Gruppen, Typ A und B (CVA und CVB), anhand ihrer Pathogenität bei neugeborenen Mäusen. CVA infizieren vor allem Herz- und Skelettmuskelgewebe und verursachen eine schlaffe Lähmung, während CVB eine Vielzahl von Geweben wie ZNS, Leber, quergestreifte Muskulatur (Herz- und Skelettmuskel), exokrines Pankreasgewebe und braunes Fettgewebe infizieren können und zu einer spastischen Lähmung führen (Hyypiä *et al.*, 1993, Harvala *et al.*, 2002).

CVA und CVB können weiterhin in mehrere Serotypen unterteilt werden, wobei CVA 23/24 und CVB 6 Serotypen umfassen (Hyypiä *et al.*, 1997).

Coxsackieviren sind kleine, nicht umhüllte Viren mit einem Durchmesser von ungefähr 30 nm, deren Genom (ca. 7500 Nukleotide) aus einer einzelnen Positiv-Strang RNA besteht und von einem Protein-Kapsid umgeben wird (Dunn *et al.*, 2000, Hyypiä *et al.*, 1997, Harvala *et al.*, 2002, 2005). Das Kapsid besteht aus jeweils 60 Kopien der vier Virusproteine (VP1-4), die eine ikosaedrische Hülle bilden und das Genom umschließen. Ein besonderes Merkmal des Kapsids von Entero- und Rhinoviren ist eine Einsenkung an der Oberfläche, die als „Canyon“ bezeichnet wird und die die Rezeptorbindestelle der Picornaviren darstellt (He *et al.*, 2001, Muckelbauer *et al.*, 1997, Hyypiä *et al.*, 1997).

Die kodierende Region der RNA ist ein sogenannter „open reading frame“, der ein ca. 200 kDa großes Polyprotein kodiert und am 5' und 3' Ende von nicht kodierenden Regionen (NCR) umgeben wird. Die 5'NCR hat eine Länge von ca. 750 Nukleotiden, während die 3'NCR nur 70-100 Nukleotide lang ist und in einen Poly-A-Schwanz übergeht (Hyypiä *et al.*, 1997, Dunn *et al.*, 2000, Cheung *et al.*, 2005, Harvala *et al.*, 2002, 2005).

Durch posttranslationale Prozessierung entstehen aus dem primären Polyprotein die eigentlichen Virusproteine, zu denen vier Strukturproteine (VP1-4) sowie sieben Nicht-Strukturproteine (2A-C, 3A-D) zählen (Harvala *et al.*, 2002, 2005). Die Strukturproteine bilden das Kapsid, während die Nicht-Strukturproteine (RNA-Polymerase, Proteasen etc.) an der Virusreplikation, Translation und Proteinprozessierung beteiligt sind (Dunn *et al.*, 2000, Harvala *et al.*, 2002). Die 5'NCR enthält eine so genannte „internal ribosome entry site“ (IRES) und spielt somit für die Initiation der Translation eine wichtige Rolle (Harvala *et al.*, 2002, Cheung *et al.*, 2005). Des Weiteren werden dieser Region Determinanten für den Gewebetropismus (Harvala *et al.*, 2002, 2005, Cheung *et al.*, 2005) sowie für die Kardiovirulenz bzw. Pathogenität von CVB3 zugeordnet (Dunn *et al.*, 2000, 2003, Tu *et al.*, 1995). Aber auch die Strukturprotein-kodierende-Region scheint Determinanten für die Kardiovirulenz bzw. Pathogenität (Caggana *et al.*, 1993, Ramsingh *et al.*, 1995, Knowlton *et al.*, 1996) und den Gewebetropismus (Harvala *et al.*, 2002, 2005) von CVB zu enthalten. Die 3'NCR hingegen ist an der Initiation der Synthese von komplementärer RNA beteiligt (Harvala *et al.*, 2002).

CVB benutzen mindestens zwei Membranproteine als Rezeptor: Zum einen den Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptor (CAR; Bergelson *et al.*, 1997), einem Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie, zum anderen den Decay-Accelerating-Factor (DAF

oder CD55; Bergelson *et al.*, 1995, Shafren *et al.*, 1995), einem Bestandteil des Komplementsystems.

Nach der Bindung an den spezifischen Rezeptor an der Zelloberfläche erfolgt die Internalisierung des Virus mit Freisetzung des viralen Genoms in die Zelle. Anschließend erfolgen im Zytoplasma die Replikation sowie die Translation der Virus-RNA mit Hilfe verschiedener Virus- und Wirtsproteine. Die genomische RNA der Coxsackieviren ist von positiver Polarität und fungiert zum einen als mRNA, die direkt in das Virusprotein translatiert werden kann, zum anderen dient sie als Matrize für die Bildung einer Negativ-Strang RNA, die wiederum als Vorlage zur Synthese neuer genomischer RNA dient. Während der Infektion wird die Proteinsynthese der Wirtszelle durch die Aktivität der viralen 2A Protease gehemmt (host-cell shut-off) (Hyypiä *et al.*, 1997). Nach der Produktion ausreichend vieler infektiöser Viruspartikel (ca. 10^4 - 10^5) wird die infizierte Zelle schließlich zerstört, um die Viren freizusetzen (Woodruff, 1980, Hyypiä *et al.*, 1997, Harvala *et al.*, 2005).

Der natürliche Wirt der Coxsackieviren ist der Mensch, jedoch kann auch eine Vielzahl von Tieren infiziert werden. Wie bei allen anderen Enteroviren liegt in erster Linie ein fäkal-oraler Übertragungsweg vor, obwohl auch Infektionen über den Respirationstrakt möglich sind (Woodruff, 1980, Kim *et al.*, 2001, Hyypiä *et al.*, 1997). Nach der Replikation im Respiration- bzw. Gastrointestinaltrakt folgt der Übertritt der Viren ins Blut mit Virämie und nachfolgender Infektion sekundärer Organe, wie z. B. Herz und Pankreas (Woodruff, 1980, Harvala *et al.*, 2005).

CVB sind wichtige humane Pathogene und können eine Vielzahl von Erkrankungen hervorrufen, die von einer einfachen Erkältung bis hin zu schweren, zum Teil tödlich verlaufenden Erkrankungen wie Myokarditis, aseptische Meningitis, Enzephalitis oder Pankreatitis reichen (Whitton, 2002, Kim *et al.*, 2001). Die meisten Infektionen mit CVB verlaufen asymptomatisch oder mild, aber auch fulminante Verläufe können auftreten, insbesondere bei Kindern. Obwohl die Mehrzahl der Erkrankungen einen akuten Verlauf zeigt, sind auch Übergänge in chronische Formen möglich, wie z. B. chronische Myokarditis/DCM (Whitton, 2002, Kim *et al.*, 2001).

1.3 Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptor (CAR)

Der Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptor (CAR) wurde erstmals im Jahre 1997 isoliert (Bergelson *et al.*, 1997, Tomko *et al.*, 1997, Carson *et al.*, 1997) und fungiert sowohl als Hauptrezeptor für alle 6 Serotypen der Coxsackie B Viren als auch für Adenoviren der Gruppen A, C, D, E und F (Bergelson *et al.*, 1997, Roelvink *et al.*, 1998), obwohl diese Viren zu verschiedenen Familien zählen. Bei CAR handelt es sich um ein 365 Aminosäuren umfassendes, transmembranes Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 46 kDa. Die Proteinstruktur setzt sich zusammen aus einer extrazellulären Domäne, bestehend aus zwei Ig-ähnlichen Anteilen (D1 und D2), gefolgt von einer einzelnen hydrophoben, α -helikalen transmembranen Domäne und einer 107 Aminosäuren langen, hochkonservierten zytoplasmatischen Domäne, die ca. ein Drittel des Proteins ausmacht (Bergelson *et al.*, 1997, Tomko *et al.*, 1997). Aufgrund seiner Struktur gehört CAR zur Immunglobulin-Superfamilie, deren weitere wichtige Vertreter u. a. NCAM, ICAM-1, CD4 und MHC sind (Poller *et al.*, 2002).

CAR wurde während der Evolution gut konserviert, so dass neben dem humanen CAR auch CAR Varianten bei einer Vielzahl anderer Spezies existieren, wie z. B. in Mäusen (Tomko *et al.*, 1997, Bergelson *et al.*, 1998), Ratten, Hunden, Schweinen (Fechner *et al.*, 1999), Kühen (Thoelen *et al.*, 2001a) und Zebrafischen (Petrella *et al.*, 2002). Humaner CAR (hCAR) und muriner CAR (mCAR) weisen eine hohe Aminosäuresequenzähnlichkeit auf, mit 91% Übereinstimmung innerhalb der extrazellulären Domäne, 77% innerhalb der transmembranen Domäne und 95% innerhalb der zytoplasmatischen Domäne (Bergelson *et al.*, 1997, 1998, Wang *et al.*, 1999, Cohen *et al.*, 2001). Von CAR existieren mindestens zwei Isoformen (CAR1/CAR2), die zuerst aus Mäusen (Bergelson *et al.*, 1998), später aber auch aus Ratten und Menschen (Fechner *et al.*, 1999, Thoelen *et al.*, 2001a) isoliert werden konnten. Beide Formen dienen als Virusrezeptor und unterscheiden sich nur in ihrem C-Terminus, wobei der C-Terminus von mCAR1 fast identisch ist mit dem von hCAR. Beide Isoformen resultieren vermutlich aus alternativem splicing, welches verschiedene Exons mit einbezieht (Bergelson *et al.*, 1998, Chen *et al.*, 2003, Thoelen *et al.*, 2001b). Das hCAR Gen ist auf dem langen Arm von Chromosom 21 (21q11.2) lokalisiert und besteht aus 7 Exons. Es existieren jedoch noch mindestens 4 Pseudogene auf den Chromosomen 15, 18 und 21, die aber kein funktionstüchtiges Protein kodieren (Bowles *et al.*, 1999).

Das mCAR Gen umfasst ca. 40.000 Nukleotide und ist auf dem distalen Ende von Chromosom 16 lokalisiert. Es besteht aus mindestens 8 Exons, wobei die Intron-Exon Grenzen denen des hCAR Gens ähneln (Chen *et al.*, 2003).

Im Rahmen der Funktion als Virusrezeptor für Coxsackieviren der Gruppe B vermittelt CAR sowohl die Bindung als auch die Internalisierung aller 6 Serotypen (Bergelson *et al.*, 1997). Die Interaktion zwischen Rezeptor und Virus erfolgt, indem CAR mit dem distalen Ende von Domäne 1 in einer Einkerbung auf der Kapsidoberfläche von CVB bindet, dem sog. "Canyon". Alle externen Virusproteine (VP1-3) sind an der Rezeptorbindung beteiligt, wobei die Hauptinteraktion zwischen CAR und VP1 erfolgt (He *et al.*, 2001).

CAR wird in einer Vielzahl von Organen wie beispielsweise Herz, Gehirn, Pankreas, Leber, Lunge, Niere und Prostata exprimiert. Es finden sich jedoch zum Teil ausgeprägte Expressionsunterschiede in den verschiedenen Geweben, was wiederum teilweise mit dem bekannten Gewebetropismus von CVB korreliert (Bergelson *et al.*, 1998, Tomko *et al.*, 1997, Honda *et al.*, 2000).

Während die pathologische Rolle von CAR als Virusrezeptor schon gut untersucht ist, ist seine biologische Funktion noch weitgehend unbekannt.

Verschiedene Untersuchungen zeigen, dass CAR sowohl homotypische (d. h. zwischen Zellen gleicher Art) (Cohen *et al.*, 2001, Honda *et al.*, 2000) als auch heterotypische Zellkontakte (zwischen Zellen unterschiedlicher Herkunft) vermittelt (Zen *et al.*, 2005) und Bestandteil wichtiger interzellulärer Verbindungen wie beispielsweise der epithelialen „tight junctions“ (Cohen *et al.*, 2001) sowie der kardialen „intercalated discs“ darstellt (Noutsias *et al.*, 2001, Selinka *et al.*, 2004), was eine Rolle als Zelladhäsionsmolekül vermuten lässt. Andere Untersuchungen weisen auf einen wachstumshemmenden Effekt von CAR in verschiedenen Tumorzelllinien wie z. B. von Blase, Prostata und Gliomazellen hin (Okegawa *et al.*, 2000, 2001, Kim *et al.*, 2003).

Die Expression von CAR weist insbesondere im Herzen (Ito *et al.*, 2000, Fechner *et al.*, 2003, Kashimura *et al.*, 2004), Gehirn (Honda *et al.*, 2000, Hotta *et al.*, 2003) und Skelettmuskel (Nalbantoglu *et al.*, 1999, 2001) von Menschen und Nagetieren eine ausgeprägte Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium auf. Während die Expression in der embryonalen Phase am höchsten ist, kommt es nach der Geburt zu einem Rückgang der Expression mit fehlendem oder nur noch geringem Nachweis von CAR im adulten Gewebe. CAR scheint somit eine wichtige Funktion während der embryonalen

Entwicklung von Herz, Gehirn und Skelettmuskel einzunehmen. Ebenso korreliert diese Beobachtung mit der altersabhängigen Empfindlichkeit gegenüber einer CVB Infektion sowohl bei Menschen als auch Mäusen, wobei CVB eine höhere Affinität zu unreifem Gewebe aufweist (Honda *et al.*, 2000).

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass CAR eine wichtige Rolle in der frühen kardialen Entwicklung spielt und durch die Ausbildung interzellulärer Kontakte sowohl an der Regulation der Proliferation als auch der Differenzierung des kardialen Gewebes beteiligt ist. CAR „knock-out“ Mäuse zeigen eine verzögerte kardiale Entwicklung sowie schwere kardiale Abnormalitäten, wie beispielsweise eine Hyperplasie des linken Ventrikels, eine Dilatation kardialer Venen oder fehlende Sinuatriale-Valvulae und versterben frühzeitig an kardialen Komplikationen, während in anderen Organen zum gleichen Zeitpunkt keine Fehlentwicklungen nachweisbar sind. Histologisch zeigt sich im Herzen CAR-defizienter Mäuse u. a. eine verstärkte Apoptose sowie eine Desorganisation der Myofibrillen (Chen *et al.*, 2006, Asher *et al.*, 2005, Dorner *et al.*, 2005). Eine ähnliche Bedeutung von CAR konnte auch bei der Entwicklung des Gehirns nachgewiesen werden, wo CAR an der Formation und Differenzierung des neuronalen Gewebes beteiligt ist (Honda *et al.*, 2000).

Die Expression von CAR unterliegt einer ausgeprägten Regulation und kann u. a. durch regenerative (Sinnreich *et al.*, 2005) sowie inflammatorische Prozesse (Ito *et al.*, 2000), durch Zytokine (Vincent *et al.*, 2004), die Zelldichte (Carson *et al.*, 1999, Fechner *et al.*, 2003), den Gewebetyp und das Entwicklungsstadium beeinflusst werden. Des Weiteren können insbesondere verschiedene kardiale Erkrankungen wie die dilatative Kardiomyopathie des Menschen (Noutsias *et al.*, 2001, Selinka *et al.*, 2004, Sasse *et al.*, 2003), der Myokardinfarkt (Ratte) (Fechner *et al.*, 2003) und die autoimmune Myokarditis (Ratte) (Ito *et al.*, 2000) zu einer Induktion von CAR im Herzen führen, wobei die genauen Mechanismen für diese Induktion noch unbekannt sind. Es erscheint möglich, dass im Rahmen dieser Erkrankungen die Funktion von CAR während der myokardialen Entwicklung rekapituliert wird und dass die Reexpression von CAR somit zur Regeneration des Gewebes beiträgt, in dem es zur Ausbildung neuer Zellkontakte sowie zur Hemmung der Proliferation von Kardiozyten kommt (Chen *et al.*, 2006, Noutsias *et al.*, 2001).

Mutationen im hCAR Gen scheinen für die Entwicklung einer Myokarditis oder DCM keine wesentliche Rolle zu spielen, da bei der Analyse des hCAR Gens von Patienten

mit Myokarditis oder DCM zwar diverse Polymorphismen, aber keine Mutationen nachgewiesen werden konnten (Bowles *et al.*, 2002).

Verschiedene Studien deuten auf eine Interaktion zwischen CAR und dem Immunsystem hin, da CAR zum einen in der Lage ist, Immunglobuline zu binden (Carson *et al.*, 2001b) und zum anderen durch inflammatorische Prozesse (autoimmune Myokarditis) induziert werden kann (Ito *et al.*, 2000). Diese Assoziation zwischen der CAR Expression und der Immunantwort scheint insbesondere im Hinblick auf die pathogenetische Rolle des Immunsystems im Rahmen der CVB3 induzierten Myokarditis ein wichtiger Aspekt zu sein, da eine Stimulation von CAR durch das aktivierte Immunsystem zu einer erhöhten Virusaufnahme und somit zur Verstärkung der Entzündung führen könnte (Liu *et al.*, 2000).

Insgesamt scheint die Expression von CAR nach den bisherigen Untersuchungen eine mögliche Determinante für die Empfindlichkeit gegenüber einer CVB Infektion zu sein. Eine vermehrte Expression von CAR (basal oder durch Induktion) könnte somit einen prädisponierenden Faktor für eine erhöhte Virusempfindlichkeit darstellen (Noutsias *et al.*, 2001).

Neben der Expression scheint aber auch die Lokalisation von CAR die Virusempfindlichkeit zu beeinflussen. Eine diffuse Expression von CAR auf der gesamten Kardiozytenoberfläche wie sie bei Kindern vorkommt, erhöht die Empfindlichkeit, während eine lokalisierte Expression im Bereich der „intercalated discs“ bei Erwachsenen die Empfindlichkeit reduzieren soll (Kashimura *et al.*, 2004).

1.4 CVB3 induzierte Myokarditis

Enteroviren, insbesondere Coxsackieviren der Gruppe B3 (CVB3), gehören zu den häufigsten Erregern einer viralen Myokarditis beim Menschen. Bei einer systemischen Infektion mit Enteroviren kommt es in 0,5-1% der Fälle zu einer kardialen Mitbeteiligung (Strauer *et al.*, 2001). Ein direkter kausaler Zusammenhang zwischen einer Coxsackievirus B Infektion und der Entwicklung einer Myokarditis konnte durch Virusisolierung aus Biopsiematerial, serologische Verfahren und vor allem molekularbiologische Techniken wie In-situ-Hybridisierung, Blotting und PCR nachgewiesen werden (Kim *et al.*, 2001, Whitton *et al.*, 2002). Verschiedene frühe Studien aus den 90iger Jahren zeigten, dass mit molekularbiologischen Verfahren bei

bis zu 25% der Patienten mit Myokarditis oder DCM enterovirale RNA im Herzgewebe nachgewiesen werden kann (Baboonian *et al.*, 1997). Heute liegt die Inzidenz enteroviraler RNA im Biopsiematerial jedoch bei < 5% (Maisch *et al.*, 2000, 2006 b, Pankuweit *et al.*, 2002, Strauer *et al.*, 2001).

Da Coxsackieviren der Gruppe B jedoch nicht nur eine Myokarditis beim Menschen, sondern auch bei Mäusen hervorrufen können, wurde eine Reihe von Mausmodellen zum Studium der CVB3 induzierten murinen Myokarditis etabliert, die die humane Erkrankungssituation sehr gut widerspiegeln (Wolfgram *et al.*, 1986, Chow *et al.*, 1991, Klingel *et al.*, 1992, Woodruff, 1980, Huber *et al.*, 1986).

Der Verlauf der virusinduzierten murinen Myokarditis kann in zwei Phasen unterteilt werden: eine akute virämische Phase mit Nachweis einer Infiltration, die sich aber in der Mehrzahl der Fälle nach der Elimination des Virus innerhalb von 2-3 Wochen zurückbildet und eine chronische Phase mit persistierender, geringgradiger Entzündung, in deren Endstadium es zu Fibrose und Dilatation der Ventrikel kommen kann (Gebhard *et al.*, 1998, Whitton, 2002).

Nach der Inokulation von CVB3 werden für die Schädigung von myokardialem Gewebe in erster Linie zwei verschiedene Pathomechanismen verantwortlich gemacht: zum einen die direkt virusinduzierte Zytolyse infizierter Zellen, zum anderen die Schädigung des Gewebes durch virusinduzierte sekundäre Immunmechanismen, die immunpathologische Phase (Kawai, 1999, Whitton, 2002, Huber *et al.*, 1986). Je nachdem gegen welche Art von Antigen sich der Immunprozess dabei richtet, kann zwischen virusspezifischen und autoimmunen Mechanismen unterschieden werden (Whitton, 2002).

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass CVB3 sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nicht nur in der Lage ist, Kardiomyozyten zu infizieren, sondern auch direkt zu lysieren (Herzum *et al.*, 1994, Ruppert, 1995, Kandolf *et al.*, 1985, Gomez *et al.*, 1993). Die Feststellung, dass eine CVB3 Infektion auch bei Mäusen mit einem schweren kombinierten Immundefizit (SCID) zu ausgedehnten Nekrosen im Myokard führen kann (Chow *et al.*, 1992), unterstreicht weiterhin die Bedeutung der direkt virusvermittelten Zellschädigung in der Pathogenese der CVB3 bedingten Myokarditis. Dies gilt auch für die Beobachtung, dass eine immunsuppressive Therapie (z. B. Prednisolon und/oder Ciclosporin A) oftmals weder die Schwere, noch den Verlauf und die Mortalität der akuten CVB3 induzierten Myokarditis in immunkompetenten Mäusen verbessern konnte (O'Connell *et al.*, 1986, Matoba *et al.*, 1991, Tomioka *et al.*, 1986,

Matsumori *et al.*, 1989). Hierfür dürfte entweder ein Anstieg der Viruskonzentration oder eine Verzögerung der Viruselimination aus dem Herzen verantwortlich sein (O'Connell *et al.*, 1986, Tomioka *et al.*, 1986, Herzum *et al.*, 1994).

Durch die Diskrepanz zwischen dem maximalen Virustiter (3./4. Tag p.i.) und dem Auftreten der Entzündung im Herzen (7.-14. Tag p.i.) sowie dem Nachweis eines zellulären Infiltrats wird dem Immunsystem eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der Myokarditis zugeschrieben (Herzum *et al.*, 1994, Huber *et al.*, 1987), wobei sowohl zelluläre als auch humorale Immunmechanismen eine Rolle spielen dürften. Das inflammatorische Infiltrat im Herzen setzt sich dabei in erster Linie aus Makrophagen, Natürlichen-Killer-Zellen (NK-Zellen) und CD8+ T-Lymphozyten zusammen (Henke *et al.*, 1995, Gebhard *et al.*, 1998).

In verschiedenen Studien konnte der Einfluss von T-Lymphozyten in der Entwicklung der kardialen Entzündung nachgewiesen werden, wobei insbesondere den CD8+ zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) eine entscheidende Rolle zukommt, da sie einerseits an der Viruselimination beteiligt sind, zum anderen aber die myokardiale Schädigung verstärken können (Henke *et al.*, 1995, Huber *et al.*, 1984, 1986, Gebhard *et al.*, 1998). Während nämlich die selektive Entfernung CD4+ T-Zellen die Myokarditis-Empfindlichkeit erhöht, führt eine Depletion CD8+ T-Zellen zwar zu einer deutlichen Abschwächung der Myokarditis, dafür aber zu einer Erhöhung des Virustiters im Herzen (Henke *et al.*, 1995).

Neben virusspezifischen CTLs werden im Rahmen der CVB3 induzierten Myokarditis auch autoreaktive CTLs aktiviert, so dass nicht nur infizierte, sondern auch nicht infizierte Kardiozyten lysiert werden (Huber *et al.*, 1984, 1986).

Bei der CD8+ T-Zell vermittelten Lyse infizierter kardialer Zellen scheint insbesondere die Sekretion des zytolytischen Proteins Perforin eine wichtige Rolle bei der Verstärkung der Myokarditis zu spielen, da nachgewiesen werden konnte, dass Perforin „knock-out“ Mäuse nach einer CVB3 Infektion nur eine milde Myokarditis entwickeln (Gebhard *et al.*, 1998, Seko *et al.*, 1991, 1993).

Weitere Studien zeigten, dass bei den verschiedenen Mausstämmen unterschiedliche T-Zell-Subpopulationen für die kardiale Schädigung verantwortlich sind. Während bei Balb/c-Mäusen in erster Linie CD8+ (Lyt2+) zytotoxische T-Zellen die kardialen Läsionen verursachen, wird die Myokarditis bei DBA/2-Mäusen hauptsächlich durch CD4+ (L3T4+) T-Helfer-Zellen vermittelt. Eine selektive Depletion dieser Zellen führt

bei dem jeweiligen Tier zu einer deutlichen Reduktion der kardialen Entzündung (Huber *et al.*, 1986, 1997, Lodge *et al.*, 1987). Des Weiteren stellen $\gamma\delta$ -T-Zellen einen großen Anteil des inflammatorischen Infiltrats von Balb/c-Mäusen, nicht aber von DBA/2-Mäusen dar (Huber *et al.*, 1997).

Neuere Untersuchungen von Huber *et al.* weisen den $\gamma\delta$ -T-Zellen eine zentrale Rolle in der Immunpathogenese der Myokarditis zu. $\gamma\delta$ -T-Zellen exprimieren den $\gamma\delta$ -T-Zell-Rezeptor ($\gamma\delta$ -TCR) und sind Bestandteile der angeborenen Immunantwort. Sie akkumulieren in inflammatorischen Arealen und können die Myokarditis-Empfänglichkeit durch Verstärkung oder Unterdrückung der Entzündung über eine Beeinflussung der TH-Antwort modulieren (Huber *et al.*, 2001). Insbesondere die Subpopulation $V\gamma 4+$ spielt bei der Verstärkung der CVB3 induzierten Myokarditis eine entscheidende Rolle. Die Aktivierung der $V\gamma 4+$ -T-Zellen erfolgt durch CD1, einem MHC Klasse I ähnlichen Molekül (Huber *et al.*, 2002, 2003), welches sowohl in vitro als auch in vivo durch CVB3 induziert werden kann (Huber *et al.*, 2003, 2005a, b). Nach ihrer Aktivierung bewirken $V\gamma 4+$ Zellen eine durch $IFN\gamma$ vermittelte Induktion von virusspezifischen $CD4+$ TH1-Zellen. Diese TH1-Zellen werden wiederum zur Aktivierung von autoimmunen, herzspezifischen $CD8+$ zytotoxischen $\alpha\beta$ -T-Zellen benötigt, welche als Hauptverursacher der myokardialen Schäden anzusehen sind, da sie zu einer ausgedehnten Nekrose von Myozyten führen (Huber *et al.*, 2002, 2005a, b). Weiterhin exprimieren $V\gamma 4+$ T-Zellen große Mengen des Fas-Liganden und induzieren eine Fas-abhängige Apoptose von infizierten Kardiozyten sowie $CD4+$ TH2-Zellen (Huber *et al.*, 1999a, 2000a, 2003, 2005b), wobei die selektive Zerstörung der TH2-Zellen die TH1-Antwort und damit die myokardiale Schädigung weiter verstärkt.

Andere Studien berichten über eine CVB3 induzierte Apoptose von Kardiozyten in der frühen Phase der murinen Myokarditis, die vermutlich durch die virale Replikation in den Kardiozyten getriggert wird (Joo *et al.*, 2003, Saraste *et al.*, 2003). Die Apoptose scheint somit einen weiteren wichtigen Mechanismus in der Pathogenese der CVB3 induzierten Myokarditis darzustellen. Während Balb/c-Mäuse eine ausgedehnte Apoptose von Kardiozyten sowohl in den inflammatorischen Arealen als auch außerhalb der Läsionen aufweisen, kann im Herzen von DBA/2-Mäusen keine Apoptose nachgewiesen werden (Huber *et al.*, 1997).

Neben der T-Zell vermittelten Immunpathogenese spielen auch humorale Faktoren bei der Entstehung der viralen Myokarditis eine Rolle. So konnten nach einer CVB3 Infektion herzspezifische Antikörper in den infizierten Mäusen nachgewiesen werden

(Wolfgram *et al.*, 1985), die später als Anti-Myosin-Antikörper identifiziert wurden (Neu *et al.*, 1987a). Ebenso konnte in empfindlichen Mäusen durch die Immunisierung mit kardialem Myosin eine schwere Myokarditis hervorgerufen werden, die histologisch der virusinduzierten Myokarditis entsprach (Neu *et al.*, 1987b), wobei sowohl myosinspezifische T-Zellen als auch Antikörper gebildet wurden. Betrachtet man die Übereinstimmung zwischen virusinduzierter und myosininduzierter Myokarditis, so scheint dem kardialen Myosin eine wichtige pathogenetische Bedeutung als Antigen für humorale und zelluläre Immunreaktionen im Rahmen der CVB3 induzierten Myokarditis zuzukommen (Wolfgram *et al.*, 1985, Neu *et al.*, 1987b). Die Bildung myosinspezifischer Antikörper im Rahmen einer CVB3 Infektion wird in erster Linie auf das so genannte „molekulare Mimikry“ zurückgeführt. Dabei besteht eine Ähnlichkeit zwischen antigenen Epitopen von CVB3 und Myosin, so dass es zur Bildung kreuzreagierender Antikörper zwischen viralen und kardialen Strukturen kommt. Eine andere Möglichkeit besteht darin, dass die virusvermittelte Zytolyse zur Freisetzung von Myosin führt, welches somit als Antigen fungiert und die Bildung myosinspezifischer Antikörper induziert (Maisch *et al.*, 2002, Whitton, 2002).

Betrachtet man die humorale Immunpathogenese bei verschiedenen Mausstämmen, so zeigt sich, dass DBA/2-Mäuse nach einer CVB3 Infektion herzspezifische Antikörper vom Typ IgG ausbilden, die sowohl im Serum als auch als Ablagerungen im Herzen nachgewiesen werden können, während Balb/c-Mäuse hingegen weder im Serum noch im Myokard autoreaktive IgG-Antikörper aufweisen. Weiterhin führt eine Depletion von Komplementfaktoren durch Kobragift (cobra venom factor) bei DBA/2-Mäusen zu einer deutlichen Abschwächung der Myokarditis. Bei Balb/c-Mäusen zeigt dies jedoch keinen Effekt. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass humorale Faktoren insbesondere bei DBA/2-Mäusen einen wesentlichen Anteil an der Immunpathogenese haben (Huber *et al.*, 1986, 1997, Lodge *et al.*, 1987).

Auch in Seren und Myokardgewebe von Patienten mit Myokarditis können Autoantikörper nachgewiesen werden, die gegen verschiedene Bestandteile des myokardialen Gewebes gerichtet sind (Pankuweit *et al.*, 2002). Dazu zählen, neben Antikörpern gegen myolemmale (AMLA) und sarkolemmale (ASA) Strukturen (Maisch *et al.*, 1991, 1992, 1993), auch Antikörper gegen verschiedene intrazelluläre Proteine wie beispielsweise Myosin, Aktin (Maisch, 1989, Caforino *et al.*, 1996), den Adenin-Nukleotid-Transporter (ANT) (Schultheiss *et al.*, 1985), Kalzium-Kanäle (Kühl *et al.*,

1991), β -Adrenozeptoren (Limas *et al.*, 1987) oder den mitochondrialen ADP/ATP Carrier (Schulze *et al.*, 1990, 1995) sowie Antikörper gegen verschiedene Proteine der extrazellulären Matrix (Maisch, 1989, Wolff *et al.*, 1989).

Auch hier handelt es sich in der Mehrzahl der Fälle um „molekulares Mimikry“ mit kreuzreagierenden Antikörpern zwischen viralen und kardialen Epitopen (Maisch *et al.*, 2002). Dabei konnte gezeigt werden, dass die autoreaktiven Antikörper entweder direkt zur Lyse von Kardiozyten führen oder aber zumindest ihre Funktion beeinträchtigen können. Zum Beispiel können ANT-Antikörper den Energiemetabolismus der Kardiozyten beeinträchtigen (Schulze *et al.*, 1999), während AMLAs und ASAs eher zytolytische Eigenschaften aufweisen (Maisch *et al.*, 1992, 1993).

Insgesamt scheint für die Mehrzahl der herzspezifischen Antikörper die pathogenetische Rolle für die Entstehung der Myokarditis bzw. DCM noch ungeklärt. Ihr Nachweis dient aber als Indikator für das Vorliegen von kardialen Schäden sowie die Tendenz in Richtung einer autoimmunen Herzerkrankung (Pankuweit *et al.*, 2002).

Auch Zytokine spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenese der CVB3 induzierten Myokarditis, da Virusinfektionen zu einer verstärkten Expression verschiedener Zytokine führen können (Huber *et al.*, 2005a). Insbesondere die proinflammatorischen Zytokine TNF α und Il-1 begünstigen die Entwicklung einer Myokarditis. In Untersuchungen von Lane *et al.* (1992, 1993) konnte gezeigt werden, dass durch exogene Zufuhr von TNF α und IL-1 eine CVB3 induzierte Myokarditis in eigentlich resistenten Mäusen hervorgerufen werden kann. Andere Studien stellten fest, dass TNF α und Il-1 die Pathogenität von CVB3 Infektionen verstärken, indem sie zur Hochregulation von CD1d und damit zur Aktivierung von V γ 4+ T-Zellen beitragen, die, wie bereits erwähnt, über die Beeinflussung der CD4+TH-Antwort die Myokarditis-Empfänglichkeit erhöhen (Huber *et al.*, 2005a, b). Weiterhin ist bekannt, dass TNF α und Il-1 durch negativ inotrope Effekte auch direkt zu einer Beeinträchtigung der kardialen Funktion im Rahmen der Myokarditis beitragen können (Meldrum, 1998, Gulick *et al.*, 1989). Auch bei Patienten mit Myokarditis konnten im Plasma erhöhte Mengen der Zytokine TNF α , Il-1 und Il-6 nachgewiesen werden, wobei die Höhe der Zytokine mit dem Schweregrad der Erkrankung von DCM Patienten korrelierte (Matsumori *et al.*, 1994, Maisch *et al.*, 2000).

Insgesamt scheint die Pathogenese der CVB3 induzierten Myokarditis durch ein komplexes Zusammenspiel verschiedenster Faktoren gekennzeichnet zu sein.

In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass verschiedene Inzucht-Mausstämme eine unterschiedliche Empfänglichkeit für eine CVB3 induzierten Myokarditis aufweisen. Während die Stämme DBA/2 und Balb/c nach der Inokulation von CVB3 eine schwere Myokarditis mit ausgedehnten Nekrosen und entzündlichen Infiltraten entwickeln, zeigen die Stämme C57/Bl6 und CBA nur eine unbedeutende Myokarditis mit geringen kardialen Läsionen (Huber *et al.*, 1986, 1993, 1997, Lodge *et al.*, 1987, Chow *et al.*, 1991). Auch in einer Studie, in der die Wirkung von CVB3 auf isolierte Kardiomyozyten verschiedener Mausarten untersucht wurde, konnten ähnliche Unterschiede in der CVB3 Empfindlichkeit nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich, dass die Viabilität der Kardiomyozyten der DBA/2-Maus nach einer CVB3 Infektion deutlich geringer war als bei den Kardiomyozyten der C57/Bl6- und CBA-Maus (Ruppert, 1995).

Es ist bekannt, dass verschiedene Faktoren die Empfänglichkeit für eine CVB3 Infektion bzw. CVB3 induzierten Myokarditis beeinflussen können. Dazu zählen neben Alter, Geschlecht, Hormonstatus, Ernährung und körperlicher Aktivität vor allem auch genetische Faktoren von Wirt und Virus (Woodruff, 1980, Wolfgram *et al.*, 1986, Kawai, 1999). Letzteren kommt dabei eine entscheidende Bedeutung zu, wobei die Unterschiede in der genetisch determinierten Empfänglichkeit auf eine Vielzahl von Faktoren, wie beispielsweise die An- oder Abwesenheit virusspezifischer Rezeptoren auf der Zelloberfläche, Art und Ausmaß der Immunantwort (Wolfgram *et al.*, 1986) oder die Beeinflussung der Replikation bzw. Translation durch verschiedene intrazelluläre Faktoren zurückgeführt werden können (Cheung *et al.*, 2005).

Es konnte wiederholt gezeigt werden, dass die Empfänglichkeit für eine Virusinfektion einer multigenetischen Kontrolle unterliegt, die sowohl spezifische Gene mit der Bezeichnung H2 des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) als auch nicht MHC assoziierte Gene (sog. Background Gene) involviert (Wolfgram *et al.*, 1986, Kawai, 1999).

Da auch in Zellkulturen ohne den Einfluss des Immunsystems eine unterschiedliche CVB3 Empfindlichkeit bei den verschiedenen Mausstämmen nachgewiesen werden konnte (Ruppert, 1995), stellt sich die Frage, inwieweit andere genetische Faktoren, insbesondere die Expression des CVB3 spezifischen Rezeptors CAR zur Resistenz bzw. Sensitivität gegenüber CVB3 beitragen.

Die Anwesenheit eines virusspezifischen Rezeptors an der Zelloberfläche stellt einen zentralen Faktor in der Viruspathogenese dar, da ohne einen entsprechenden Rezeptor

ein Eindringen des Virus in die Zielzelle nicht möglich ist (Poller *et al.*, 2002). Je größer die Anzahl des Rezeptors an der Zelloberfläche, desto mehr Virus gelangt in die Zelle und desto schneller erfolgt die Zellyse und damit die Virusausbreitung. Die Expression eines spezifischen Virusrezeptors scheint somit eine entscheidende Determinante für die Empfindlichkeit gegenüber einer Virusinfektion darzustellen. Mit der vorliegenden Arbeit sollte daher untersucht werden, ob Mutationen in der mRNA Sequenz sowie Unterschiede in der Expression des Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptors (CAR) vorliegen, die einen möglichen Einfluss auf die Myokarditis-Empfänglichkeit von virussensiblen und -resistenten Mausarten haben könnten.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

Für die nachfolgend beschriebenen Methoden wurden die in Tabelle 1 aufgezählten Chemikalien und die in Tabelle 2 aufgelisteten Geräte verwendet:

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien

Äther	(Riedel-de-Häen)
Agarose	(Sigma Aldrich)
Aqua ad iniectabilia	(B/Braun-Melsungen AG)
β-Mercaptoethanol	(Sigma Aldrich)
DNA Molecular Weight Marker XIV	(Roche Diagnostics GmbH)
Double Distilled Water (Bidest)	(Eppendorf)
Ethanol	(Riedel-de-Häen)
Ethidiumbromid	(Sigma Aldrich)
Exo SAP	(USB)
Loading Puffer	(Eppendorf)
Mineralöl	(Sigma Aldrich)
One step RT-PCR Kit	(Qiagen)
Primer GAPDH F/R	(TIB Mol Biol)
Primer mCAR F/R	(TIB Mol Biol)
Proteinase K Solution	(Qiagen)
Qiashredder	(Qiagen)
RNase-Free DNase Kit	(Qiagen)
RNeasy Mini Kit	(Qiagen)
RNeasy Protect Mini Kit	(Qiagen)
Sybr Green	(Sigma Aldrich)
Termination Mix	(Perkin Elmer)
TBE Puffer	(Invitrogen)

Tabelle 2: Verwendete Geräte

Elektrophorese Kammer	(Pharmacia)
Erlenmeyer Kolben	(Kobe)
Gel Blotting Papier	(Schleiche & Schill)
iCycler	(Bio Rad)
Microzentrifuge (Microfuge)	(Beckman)
Photometer	(Pharmacia Biotech)
Pipetten	(Eppendorf)
Reaction Tubes	(Applied Biosystems)
Röhrchen (15 ml/50 ml)	(Falcon)
Self-lock-Tubes	(Nunc)
Sterile Arbeitsbank	(Gelaire, Flow Laboratories)
Thermocycler	(Applied Biosystems/ MWG Biotech)
Tubes (1,5ml/2,0ml)	(Eppendorf)
Transformator	(BioRad)

2.2 Versuchstiere und Versuchstierhaltung

Die Versuche wurden mit den Inzucht-Mausstämmen DBA/2, C57/B16, Balb/c und CBA durchgeführt, welche von der Firma Charles River Wega GmbH in Sulzfeld bezogen wurden. Die Tiere wurden in herkömmlichen Käfigen mit Sägespaneinstreu gehalten und erhielten eine normale Standarddiät sowie Wasser ad libitum. Die Mäuse, die in den Versuchen eingesetzt wurden, waren alle im Alter von 5-6 Wochen.

Die Anzahl der untersuchten Tiere in den jeweiligen Versuchen ist der Tabelle 3 zu entnehmen.

Tabelle 3:

Versuch:	Mausstamm:	Anzahl:
mCAR Expression in verschiedenen Geweben	C57/B16	n = 4
Vergleich der mCAR Expression im Herzen und Skelettmuskel	DBA/2 C57/B16 DBA/2 C57/B16	n = 7 (Herz) n = 8 (Herz) n = 6 (SM) n = 6 (SM)
Vergleich der mCAR Expression in isolierten, nicht infizierten Kardiozyten	DBA/2 C57/B16	n = 3 n = 3
Vergleich der mCAR Expression im Herzen verschiedener Mausarten	DBA/2 C57/B16 CBA Balb/c	n = 9 n = 10 n = 10 n = 10

2.3 Präparation und Entnahme der Organe

Die Tötung der Mäuse erfolgte jeweils im Alter von 5-6 Wochen. Zunächst wurden die Mäuse durch eine Injektion von 0,5-0,9 mg/kg Pentobarbital narkotisiert. Anschließend wurde die Narkose mit Äther aufrechterhalten. Die betäubten Mäuse wurden auf dem Rücken liegend auf einer Styroporplatte fixiert und mit 70%igem Ethanol desinfiziert. Im Anschluss erfolgte die Eröffnung der Brust- und Bauchhöhle, indem zunächst die Haut inzidiert und das darunter liegende Gewebe präpariert wurde. Danach erfolgte die seitliche Durchtrennung der Rippen, so dass diese mitsamt Sternum hochgeklappt werden konnten. Die Organe der Brust- und Bauchhöhle lagen nun frei und konnten vorsichtig im Ganzen entnommen werden. Zur weiteren Aufbewahrung wurden die Organe in gleichmäßige Stücke zerkleinert, in Tubes überführt und sofort in flüssigen Stickstoff gegeben. Anschließend wurden die Proben bei - 80° Celsius eingefroren.

2.4 Isolierung von Kardiomyozyten

Die in den Versuchen verwendeten Kardiomyozyten wurden von Herrn Dr. Ruppert zur Verfügung gestellt. Durch ihn erfolgte die Isolierung der Kardiomyozyten. Nach entsprechender Vorbereitung der Tiere (siehe 2.3) wurde das Herz mit einem Stück Aorta ascendens entnommen und in eisgekühltes kalziumfreies MEM (Jokliks-Modifikation) überführt. Nach der Entfernung von anhängenden Geweberesten wurde eine Kanüle in die Aorta eingeführt und das Herz mit der Kanüle an eine Perfusionsapparatur angehängt. Anschließend wurde durch retrograde Spülung mit erwärmtem Perfusionsmedium I das restliche Blut aus dem Herzen gewaschen. Danach wurde das Herz solange mit erwärmtem Perfusionsmedium II durchspült, bis es weich wurde und eine helle Farbe annahm. Nach anschließender Zerkleinerung des Herzens wurden die Zellen durch Auf- und Abpipettieren mechanisch dissoziiert und durch ein feines Nylonsieb abfiltriert. Danach erfolgte eine kontinuierliche Erhöhung des Kalziumgehaltes der Zellsuspensionen bis auf 1,7 mM, wobei die Zellen bei 37°C inkubiert wurden. Zur Anreicherung der vitalen Kardiomyozyten wurde eine Dichte-Zentrifugation mit einem Optiprep-Gemisch durchgeführt, wobei die vitalen und avitalen Zellen voneinander getrennt wurden. Die vitalen Zellen wurden anschließend in ein Kulturmedium überführt und nach der Zellzahlbestimmung in Zellkulturflaschen

oder Mikrotiterplatten ausplattiert. Nach einer 3-4-stündigen Inkubation wurden die Zellen entweder direkt in den nachfolgenden Versuchen eingesetzt oder zunächst bei -80°C eingefroren (Ruppert, 1995, Herzum *et al.*, 1994).

Ausführlichere Informationen zur exakten Durchführung sind der Arbeit „Wirkung von Coxsackievirus B3 auf isolierte kardiale Zellen der adulten Maus und Ratte“ von Herrn Dr. Ruppert (1995, Herzum *et al.*, 1994) zu entnehmen.

2.5 Vorversuche/Testung der mCAR Primer

Zur Amplifikation von mCAR mRNA- bzw. cDNA-Segmenten im Rahmen der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) wurden fünf verschiedene mCAR Primerpaare eingesetzt. Zur Etablierung der optimalen PCR-Bedingungen wurden diese fünf Primerpaare in mehreren Probe-PCR-Durchgängen getestet, um herauszufinden, unter welchen PCR-Bedingungen die besten Ergebnisse erzielt werden können. Dabei wurden u. a. die Höhe der Annealing Temperatur, die Zyklusanzahl und die eingesetzte RNA-Menge variiert. Im Anschluss an jede PCR wurde jeweils eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt, um die Primerfunktion zu beurteilen.

Da mit den Primerpaaren mCAR 3 F/R und mCAR 5 F/R die besten Ergebnisse erzielt werden konnten, wurden diese Primerpaare für die Hauptversuche ausgewählt. Als Kontrolle diente bei allen Vorversuchen das Housekeeping Gen Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), welches auch in den Hauptversuchen eingesetzt wurde. Als optimale Annealing Temperatur für die Primer mCAR und GAPDH wurde 58°C ermittelt. Die Anzahl der Zyklen wurde auf jeweils 40 festgesetzt.

Die Sequenzen der Primer mCAR und GAPDH können der Tabelle 4 und 5 entnommen werden.

Tabelle 4:

Primer: [mCAR]	Sequenz:
F1 R1	5`- GAA TTC CCG GGT CGA CCC A 5`- ACC CGT CCT TTC AGA TCC GG
F2 R2	5`- CCG GAT CTG AAA GGA CGG GT 5`- GCC ATG GCG TAG GCA TTG TC
F3 R3	5`- TCG GAC TCC CAG ACA ATG CC 5`- GCA GTG GAT GTC CGA CTC T
F4 R4	5`- AGA GTC GGA CAT CCA CTG CC 5`- AGG ACA TCA CGG CTC ACC TC
F5 R5	5`- CTG AGG TGA GCC GTG ATG TC 5`- GGA TCC CCA AAG GCC ACA TA

Tabelle 5:

Primer: [GAPDH]	Sequenz:
F R	5`- AAT GGT GAA GGT CGG TGT GAA C 5`- GAA GAT GGT GAT GGG CTT CC

2.6 Isolierung von RNA aus den verschiedenen Mausgeweben

Die Isolierung von RNA aus den verschiedenen Mausgeweben wurde mit Hilfe des RNeasy Mini Kits und Qiashredder Kits durchgeführt.

Die bei -80°C eingefrorenen Organproben wurden in einen mit flüssigem Stickstoff gefüllten Behälter überführt. Zur Zerkleinerung der Organstücke wurden Mörser und Stößel benötigt, wobei für jede Probe ein neuer Satz verwendet wurde. Mörser und Stößel wurden vor Gebrauch kurz in flüssigem Stickstoff vorgekühlt. Anschließend wurden die Organstücke nacheinander zu Pulver zermahlen. Dabei wurde der Mörser mit Stickstoff gefüllt, das Organstück hinzugegeben und rasch unter ständigem Nachfüllen von Stickstoff mit dem Stößel zerkleinert. Das Pulver wurde in ein gekühltes Tube gefüllt und sofort wieder in flüssigen Stickstoff gegeben. Nachdem alle Proben zerkleinert wurden, ließ man den restlichen Stickstoff aus den Tubes verdampfen und gab pro Probe 300 μl des zuvor mit β -Mercaptoethanol (β -ME) versetzten RLT Puffers hinzu (10 μl β -ME pro 1 ml RLT Puffer). Das Lysat wurde mit der Pipette gut vermischt und anschließend direkt auf ein Qiashredder spin column gegeben. Durch zweiminütiges Zentrifugieren bei maximaler Geschwindigkeit (13000 U/min) wurde das Lysat homogenisiert. Um noch vorhandene Proteine aus den Proben zu entfernen, wurden jeweils 590 μl destilliertes Wasser (Bidest) und 10 μl Proteinase K zum Lysat hinzugefügt und gut vermischt. Die Proben wurden danach für 10 Minuten zum Inkubieren auf einen bei 55°C vorgewärmten Heizblock gestellt. Anschließend wurde nach dreiminütigem Zentrifugieren der Überstand in ein neues Tube pipettiert und mit 450 μl 96%igem Ethanol versetzt. Das Lysat wurde nun in ein RNeasy Mini Column überführt und nach kurzem Zentrifugieren und Verwerfen des Durchflusses erstmals mit 350 μl RW1 Puffer gewaschen. Zum Entfernen störender DNA-Reste folgte der DNA-Verdau mit Hilfe des RNase-freien DNase Sets. Pro Probe wurden 10 μl der DNase I Grundlösung mit 70 μl RDD Puffer vermischt. Der DNase-Mix wurde danach direkt auf die Membran des RNeasy Mini Columns pipettiert und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das RNeasy Mini Column erneut mit 350 μl RW1 Puffer gewaschen. Nach dem Einsetzen des Columns in ein neues Tube erfolgte ein zweimaliges Waschen mit jeweils 500 μl RPE Puffer. Zum Abschluss wurde das Column noch einmal in ein neues Tube überführt, 50 μl RNase freies Wasser wurden direkt auf die Membran pipettiert und die Probe ein letztes Mal bei maximaler

Geschwindigkeit zentrifugiert. Die Proben enthielten nun jeweils die gesamte Zell-RNA.

Das hier beschriebene Vorgehen gilt nur für die RNA-Isolierung aus Herz- und Skelettmuskelgewebe, bei allen anderen Geweben sowie bei den Kardiomyozyten wurde das Protokoll wie vom Hersteller beschrieben in einigen Schritten abgewandelt. Anstelle des 96%igen Ethanol wurde bei den übrigen Geweben lediglich 70%iger Ethanol verwendet. Des Weiteren entfiel der Protein-Verdau mit Hilfe der Proteinase K Lösung. Der DNA-Verdau konnte optional durchgeführt werden. Alle übrigen Schritte inklusive der Mengenangaben waren identisch.

2.6.1 RNA-Gehaltsbestimmung am Photometer

Im Anschluss an die RNA-Isolierung erfolgte die RNA-Gehaltsbestimmung der Proben am Photometer durch Messung der Absorption bei 260 nm. Zunächst wurden aus den RNA-Proben jeweils 1:10 (oder 1:20) Verdünnungen hergestellt. Als Referenzprobe diente RNase freies Wasser. Nach der Programmierung des Photometers wurden nun zuerst 10 µl der Referenzprobe möglichst luftblasenfrei in die Mikroküvette pipettiert und diese zum Messen in das Photometer eingesetzt. Nach erfolgter Messung wurde die Küvette entnommen und mit destilliertem Wasser ausgespült. Anschließend erfolgte in gleicher Weise das Messen der RNA-Proben. Die Gehaltsbestimmungen wurden ein weiteres Mal wiederholt. Anhand der erhaltenen RNA-Gehaltswerte wurden alle Proben durch entsprechende Verdünnung mit RNase freiem Wasser auf 20 ng/µl eingestellt, um in allen Proben eine gleiche Ausgangskonzentration zu erhalten. Zum Schluss wurden die Proben aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

2.7 Nachweis von mCAR mRNA mittels RT-PCR

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) dient der Amplifikation von DNA-Segmenten. Sie stellt ein sehr sensitives Verfahren dar, um auch kleinste Mengen von Nukleinsäuren bzw. geringste Unterschiede in der Genexpression nachzuweisen.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei verschiedene Methoden der sog. One-Step RT-PCR durchgeführt, die nachfolgend getrennt erläutert werden. RT steht für reverse

Transkription, d. h. die Umschreibung von RNA in cDNA mit Hilfe des aus Retroviren stammenden Enzyms Reverse Transkriptase. Bei der RT-PCR wird also zunächst RNA in cDNA umgeschrieben, bevor der eigentliche PCR Vorgang, d.h. die Amplifikation der durch die Primer festgelegten cDNA-Segmente erfolgt. One Step bedeutet in diesem Zusammenhang, dass reverse Transkription und PCR zwar zeitlich nacheinander, aber in einer zusammenhängenden Reaktion stattfinden.

Bei beiden Methoden wurde für die Herstellung des PCR-Ansatzes das One Step RT-PCR Kit verwendet. Bei den eingesetzten mCAR Primern handelte es sich, wie unter Punkt 2.5 begründet, vorwiegend um die Paare mCAR 3 F/R und mCAR 5 F/R. Das Housekeeping Gen Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) diente bei jeder PCR als Kontrolle. Die optimale Annealing Temperatur, die in den Vorversuchen für die verwendeten Primer mCAR und GAPDH ermittelt wurde, lag bei 58° C. Die Anzahl der PCR-Zyklen wurde auf jeweils 40 festgesetzt.

2.7.1 One-step RT-PCR

Zuerst erfolgte die Herstellung des PCR-Ansatzes auf Eis (Tabelle 6), dessen Gesamtmenge 45 µl pro Probe betrug. Zu diesem Ansatz wurden dann jeweils 5 µl einer zuvor auf 20 ng/µl eingestellten RNA-Probe hinzugefügt, gut vermischt und kurz zentrifugiert. Die Proben wurden beschriftet und in den Thermocycler eingesetzt, das entsprechende PCR-Programm (Tabelle 7) wurde eingestellt und gestartet.

Ab dem 20. PCR-Zyklus wurde das Programm alle 3-5 Zyklen (z. B. bei 20, 25, 30 und 35 Zyklen) für kurze Zeit gestoppt, um aus jeder Probe je nach Ansatzmenge 7-12 µl herauszupipettieren. Nach Beendigung der PCR wurden die Proben entweder bei -80°C eingefroren oder gleich für die nachfolgende Agarose-Gelelektrophorese weiterverwendet.

Tabelle 6:

PCR-Ansatz für eine Probe:

Komponente:	Menge:
RNase freies Wasser	9 µl
5x Puffer	10 µl
Q-Solution	10 µl
dNTPs	2 µl
mCAR F	15 pmol
mCAR R	15 pmol
GAPDH F	15 pmol
GAPDH R	15 pmol
Enzym Mix	2µl

Tabelle 7:

One-Step RT-PCR Programm:

Zeit:	Temperatur:	Zyklus:	Vorgang:
30 min 15 min	50° C 95° C		Reverse Transkription Denaturierung
30 sec 45 sec 60 sec	94° C 58° C 72° C	40 x	Denaturierung Annealing Extension
07 min ~	72° C 04° C		Extension Abkühlung

2.7.2 Real-time RT-PCR

Die Real-time RT-PCR ist eine computergestützte, vollautomatisierte Form der PCR-Durchführung. Nach vorheriger Zugabe eines speziellen Fluoreszenzfarbstoffes (Sybr Green), der spezifisch an die Doppelstrang-DNA bindet, wird bei dieser Methode vollautomatisch die Fluoreszenz der Proben nach jedem Zyklus der PCR gemessen, so dass nach Beendigung des Programms eine exakte Graphik über den PCR-Verlauf abgerufen werden kann.

Vor Durchführung der PCR konnten mit Hilfe des iCycler Programms Name und Anordnung (und ggf. Verdünnungen) der Proben auf der Mikrotiterplatte festgelegt werden.

Die Herstellung der PCR Ansätze erfolgte gemäß der Zusammensetzung aus Tabelle 8, wobei die Ansatzmenge pro Probe 47,5 µl betrug. Anstelle eines gemeinsamen Ansatzes wurden bei dieser Methode pro Probe zwei getrennte Ansätze für die Primerpaare mCAR und GAPDH hergestellt. Zusätzlich wurde jeweils von einer RNA-Probe (z. B. Herz) eine Verdünnungsreihe (1:5) erstellt, die als Standard diente. Zu jeder Probe musste der Fluoreszenzfarbstoff Sybr Green (Tabelle 8) hinzugefügt werden, um eine Messung der Fluoreszenz nach jedem PCR-Zyklus zu ermöglichen.

Jeweils 2,5 µl einer RNA-Probe (20 ng/µl) wurden zusammen mit 47,5 µl Ansatz vermischt und auf die Mikrotiterplatte pipettiert. Nach der Übertragung aller Proben wurde die Platte mit einer Klebefolie überzogen und vorsichtig in den iCycler eingesetzt. Anschließend wurde das entsprechende PCR Programm (Tabelle 9) gestartet. Nach Beendigung des Programms konnte am Computer der exakte PCR-Verlauf sowie Schmelzpunkt- und Standardkurven abgerufen werden.

Tabelle 8:

Real-time-RT-PCR Ansatz für eine Probe:

Komponente:	Menge:
RNase freies Wasser	12,5 µl
5x Puffer	10 µl
Q-Solution	10 µl
dNTPs	2 µl
Primer F	15 pmol
Primer R	15 pmol
Sybr Green	5 µl
Enzym Mix	2 µl

Tabelle 9:

Real-time RT-PCR Programm:

Zeit:	Temperatur:	Zyklus:	Vorgang:
30 min 15 min	50° C 95° C		reverse Transkription
45 sec 45 sec 45 sec	95° C 58° C 72° C	40x	PCR
01 min	95° C		
01 min	55° C		
01 min	55° C	80x	
~	20° C		

2.8 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der elektrophoretischen Auftrennung der PCR-Amplifikate.

Zur Herstellung eines 1,5 %igen Elektrophorese Gels wurden 250 ml TBE Puffer (Tris-HCL, Borsäure, EDTA) und 3,75 g Agarose miteinander vermischt und kurz in der Mikrowelle aufgekocht. Danach ließ man die Lösung unter ständigem Rühren abkühlen und gab zur späteren Sichtbarmachung der DNA-Banden 30 µl einer 1%igen Ethidiumbromidlösung hinzu.

Die Gelkammer wurde vorher mit Klebeband abgedichtet und mit 1-2 Kämmen besetzt. Anschließend wurde das noch flüssige Gel möglichst luftblasenfrei in die Gelkammer gegossen. Nach dem Erstarren des Gels wurden die Klebestreifen abgenommen und die Kämmen vorsichtig aus dem Gel entfernt. Die Gelkammer wurde nun in eine mit TBE Puffer gefüllte Elektrophoresekammer eingesetzt und mit weiterem Puffer übergossen, bis das gesamte Gel von Flüssigkeit bedeckt war. Daraufhin wurden jeweils 2 µl eines Gel-loading Puffers (Bromphenolblau, Saccharose in Wasser) und 5 µl des PCR-Reaktionsgemisches miteinander vermischt und in eine Geltasche pipettiert. In die äußersten Taschen wurde jeweils ein mit Gel-loading Puffer vermischter Basenpaarmarker gegeben (3 µl Puffer/3,5 µl unverdünnter Marker).

Nachdem alle Proben übertragen wurden, wurde die Elektrophoresekammer an einen Transformator angeschlossen und die Elektrophorese ca. 1-1,5 Stunden bei 120-130 Volt laufen gelassen.

Nach Ablauf der Elektrophorese wurde das Gel vorsichtig aus der Kammer genommen, auf einen Transluminator gelegt und unter UV-Licht betrachtet. Die fluoreszierenden Banden wurden photographiert und auf dem Computer zur späteren Bearbeitung gespeichert.

2.9 Analyse der mCAR mRNA Sequenz

Zur Analyse der mCAR mRNA Sequenz der verschiedenen Mausarten wurde die Methode des „dideoxy-Fingerprintings“ (ddF-Reaktion) mit nachfolgender Sequenzierung der Proben mit unterschiedlichem Bandenmuster durchgeführt. Nach der Isolierung von RNA aus den Herzen der verschiedenen Mausarten mit Hilfe des

RNeasy Mini Kits erfolgte zunächst die Durchführung einer RT-PCR mit nachfolgender Agarose-Gelelektrophorese. Die erhaltenen PCR-Reaktionsgemische wurden anschließend für die unten beschriebenen Reaktionen eingesetzt.

2.9.1 Reinigen der PCR-Amplifikate und ddF-Reaktion

Um die PCR-Amplifikate von überschüssigen Primern, Nukleotiden etc. zu reinigen, wurden jeweils 1,25 µl des PCR-Reaktionsgemisches mit 0,5 µl EXO/SAP (Exonuklease I und Shrimp Alkaline Phosphatase) vermischt und mit einem Tropfen Mineralöl bedeckt. Die Proben wurden in den Thermocycler eingesetzt und das Reinigungsprogramm (Tabelle 10) wurde gestartet.

Im Anschluss erfolgte die Durchführung der ddF-Reaktion, d.h. das „radioaktive Labeln“ der gereinigten PCR-Amplifikate. Dazu wurde zunächst ein Ansatz gemäß der Zusammensetzung aus Tabelle 11 hergestellt, wobei immer nur ein Termination Mix (ddATP oder ddGTP oder ddTTP oder ddCTP) hinzugefügt wurde. Zu den gereinigten PCR-Amplifikaten wurden dann jeweils 3,7 µl des Ansatzes pipettiert und gut vermischt. Die Proben wurden in den vorgeheizten Thermocycler eingesetzt und die ddF-Reaktion nach folgendem Programm (Tabelle 12) gestartet. Nach Abschluss der Reaktion wurde zu jeder Probe 2 µl Stopplösung hinzugegeben.

Tabelle 10:

Reinigungsprogramm:

Zeit:	Temperatur:
15 min	37°C
15 min	80°C
~	4°C

Tabelle 11:

Ansatz für ddF-Reaktion:

Komponente:	Menge:
Wasser	1,27 µl
Primer	0,50 µl
10 x Mix	0,75 µl
Termination Mix	1,00 µl
35 S-dATP	0,23 µl

Tabelle 12:

Programm für ddF-Reaktion

Zeit:	Temperatur:	Zyklen:	Vorgang:
2 min	95°C		Denaturierung
1 min 1 min 1 min	95°C Annealing Temperatur 72°C	30 x	Denaturierung Annealing Extension
< 45 min	4°C		Abkühlung

2.9.2 Nicht-denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Nach entsprechender Vorbereitung der Glasplatten erfolgte die Herstellung des Elektrophoresegels gemäß der Zusammensetzung aus Tabelle 13.

Tabelle 13:

Ansatz Polyacrylamid-Gel:

Komponente:	Menge:
Wasser	46,6 ml
Acrylamid (Rotiphorese Gel 30)	21,6 ml
Glycerin	8,0 ml
20 x GTP	4,0 ml
TEMED	32,0 µl
APS (10%ig)	640,0 µl

Anschließend wurde das Gel möglichst luftblasenfrei zwischen die Platten gegossen, ein Kamm wurde eingelegt und mit Klammern befestigt. Nach Kristallisation des Gels wurden die Klammern, der Kamm und eventuell vorhandene Gelreste entfernt und die Platten gereinigt. Danach wurden die Gelplatten in das Sequenziergerät eingespannt. In das obere Gel-Reservoir wurde 0,5 x GTP (Glycerintoleranter Puffer) eingefüllt, das

Gel wurde gespült und ein Kamm aufgelegt. Anschließend wurde auch in das untere Gel-Reservoir GTP (1 x) eingefüllt und das Gel erneut gespült.

Zum Denaturieren wurden die Proben für 5 Minuten auf 95 °C erhitzt und danach sofort auf Eis gestellt. Im Anschluß wurden jeweils 3 µl der Proben auf das Gel aufgetragen.

Die Elektrophorese erfolgte bei 18 Watt für 4,5 Stunden.

Nach Ablauf der Elektrophorese wurden die Platten aus dem Sequenziergerät entnommen und vorsichtig mit einem Spatel voneinander getrennt, so dass das Gel auf einer der Platten haften blieb. Ein Blotpapier wurde auf das Gel aufgelegt und vorsichtig mitsamt dem Gel von der Glasplatte abgezogen. Das nun auf dem Blotpapier haftende Gel wurde möglichst luftblasenfrei mit einer Frischhaltefolie überzogen und in den vorgewärmten Gelrockner gelegt. Ein Vakuum wurde angelegt und das Gel für ca.1 Stunde getrocknet.

Nach dem Trocknen erfolgte das Belichten des Gels, indem ein Film aufgelegt und anschließend für 16 Stunden belichtet wurde. Danach wurde der Film entwickelt.

Da das Bandenmuster bei den verschiedenen Mausarten bei Verwendung der mCAR Primer 4F und 5F variierte, wurden die gereinigten Proben zum Sequenzieren an das Labor SeqLab nach Göttingen geschickt. Die sequenzierten Proben wurden im Anschluss mit Hilfe des DNAsis Programms (Hitachi Software) mit Standardsequenzen verglichen, um mögliche Sequenzunterschiede zwischen den untersuchten Tieren festzustellen.

2.10 Statistische Auswertung

Die Auswertung der Elektrophorese-Banden erfolgte mit Hilfe des Gel-Analyse-Programms Quantity One von BioRad.

Nach Durchführung der Real-time RT-PCR wurde zur relativen Quantifizierung der mCAR Expression folgende Formel zur Berechnung der Ratio verwendet (Pfaffl, 2001):

$$\text{Ratio} = 2^{-[\Delta \text{CP sample} - \Delta \text{CP control}]}$$

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta \text{CP}}$$

Die Erstellung der Diagramme erfolgte mit Hilfe der Programme iCycler von BioRad und SigmaPlot/SigmaStat. Bei allen angegebenen Werten handelt es sich um Mittelwerte +/- der Standardabweichung. Zur Prüfung der Signifikanz wurde unter Verwendung des Programms SigmaPlot/SigmaStat der t-Test bzw. der Mann-Whitney

Rank Sum Test für ungepaarte Proben durchgeführt. Zuvor erfolgte eine automatische Prüfung der Proben auf Normalverteilung. Ein statistisch signifikanter Unterschied wurde bei einem p-Wert $< 0,05$ angenommen.

3 Ergebnisse

3.1 Messpräzision (Intraassay-Varianz und Interassay-Varianz)

Um die Messpräzision zu untersuchen, wurde die Intraassay- und Interassay-Varianz bestimmt. Die Intraassay-Varianz gibt Aufschluss über die Messwertstreuung bei Mehrfachbestimmung einer Probe innerhalb eines Assays an einem Tag, während die Interassay-Varianz die Streuung der Ergebnisse einer Probe bei wiederholten Messungen an unterschiedlichen Tagen wiedergibt. Die Intra- und Interassay-Varianz werden dabei durch Bestimmung des Variationskoeffizienten, d.h. der relativen Standardabweichung ermittelt. Bei der Intraassay-Varianz wird die relative Standardabweichung zum Mittelwert aller Messwerte an einem Tag bestimmt, während bei der Interassay-Varianz die Bestimmung der relativen Standardabweichung zum Mittelwert aller Messwerte an verschiedenen Tagen erfolgt.

$\text{Varianz: } s^2 = \frac{1}{n-1} \sum (x_i - \bar{x})^2$	$\text{Standardabweichung: } s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum (x_i - \bar{x})^2}$
$\text{Variationskoeffizient: } \text{VK}(\%) = \frac{s}{x} \cdot 100$	

Abb. 1 zeigt die Verteilung der Einzelwerte bei der Mehrfachbestimmung verschiedener Proben (C57/Bl6 Nr. 1/2, DBA/2 Nr. 1/2) während eines PCR-Durchganges an einem Tag. Die Variationskoeffizienten (VK) zur Bestimmung der Intraassay-Varianz betragen dabei:

C57/Bl6 Nr. 1: VK = 2,6%, C57/Bl6 Nr. 2: VK = 3,21%

DBA/2 Nr. 1: VK = 3,2%, DBA/2 Nr. 2: VK = 3,2%

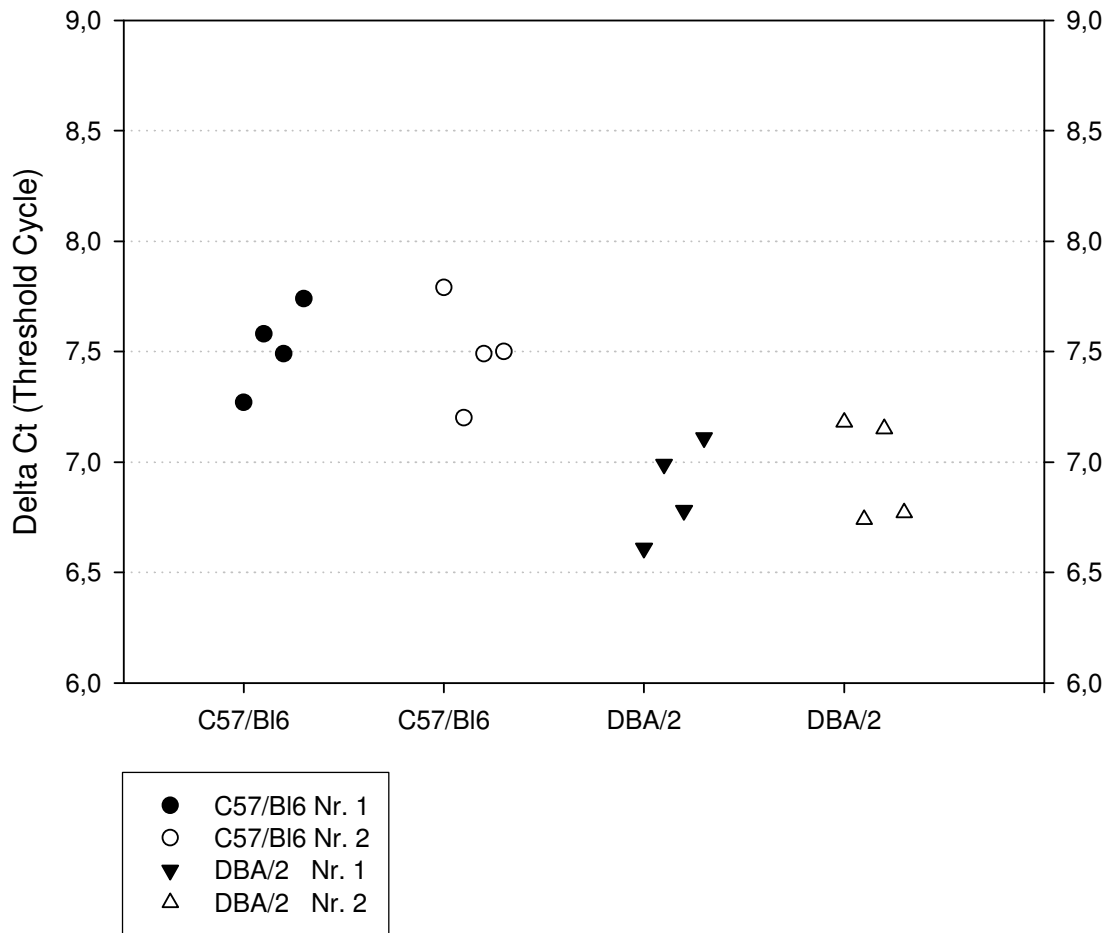


Abb. 1: Intraassay-Varianz: Verteilung der Einzelwerte bei Mehrfachbestimmung verschiedener Proben (C57/Bl6 und DBA/2) während eines PCR-Durchganges.

●: C57/Bl6 Nr. 1 (VK = 2,6%), ○: C57/Bl6 Nr. 2 (VK = 3,21%),

▼: DBA/2 Nr. 1 (VK = 3,2%), △: DBA/2 Nr. 2 (VK = 3,2%)

Abb. 2 zeigt die Verteilung der Einzelwerte bei mehrfacher Messung einer Probe (C57/Bl6 Nr. 4) bei verschiedenen PCR-Durchgängen (1.-3. PCR) an unterschiedlichen Tagen. Der Variationskoeffizient zur Ermittlung der Interassay-Varianz betrug 7,6%.

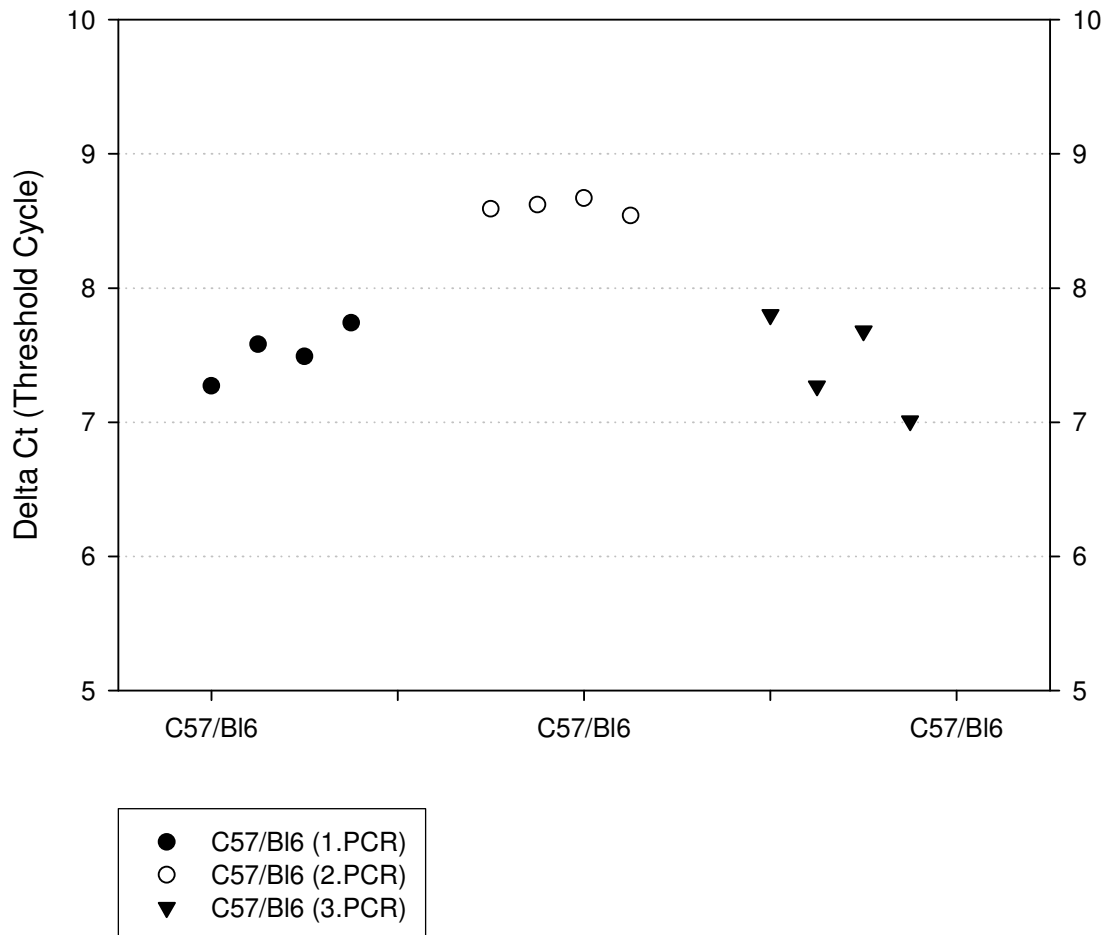


Abb. 2: Interassay-Varianz: Verteilung der Einzelwerte bei Messung einer Probe (C57/Bl6 Nr. 4) bei verschiedenen PCR-Durchgängen an unterschiedlichen Tagen (VK = 7,6%).

3.2 Vergleich der PCR-Methoden

Zur Untersuchung der mCAR mRNA Expression im Herzen und in den verschiedenen anderen Organen von CVB3 sensiblen sowie resistenten Mausstämmen wurden zwei verschiedene Methoden der RT-PCR durchgeführt: die One-step RT-PCR und die Real-time RT-PCR.

Um zu überprüfen, ob mit beiden PCR-Methoden die gleichen Ergebnisse erzielt werden können, wurde zunächst sowohl mit der One-Step RT-PCR als auch mit der Real-time RT-PCR die mCAR mRNA Expression im Herzen zweier Mausarten (DBA/2 und C57/Bl6) untersucht.

Wie aus den Abb. 3 und 4 zu entnehmen ist, konnten mit beiden Methoden nahezu identische Ergebnisse erzielt werden. Sowohl mit der One-step RT-PCR als auch mit der Real-time RT-PCR konnte im Herzen der C57/Bl6-Maus eine deutlich geringere mCAR mRNA Expression nachgewiesen werden als im Herzen der DBA/2-Maus.

Bezogen auf die mCAR Expression im Herzen der DBA/2-Maus war die mCAR Expression der C57/Bl6-Maus ungefähr um den Faktor 0,75 (Abb. 3) bzw. 0,8 (Abb. 4) erniedrigt. Zur Prüfung der Signifikanz ($p < 0,05$) wurde der t-Test bzw. der Mann-Whitney Rank Sum Test für ungepaarte Proben verwendet. In beiden Fällen war der Unterschied statistisch signifikant ($p^* = 0,001$ bzw. $p^* = 0,03$). Die Anzahl der untersuchten Tiere betrug bei der One-step RT-PCR: DBA/2 $n = 9$, C57/Bl6 $n = 10$ und bei der Real-time RT-PCR: DBA/2 $n = 10$, C57/Bl6 $n = 11$.

Da die Real-time RT-PCR die etwas sensitivere Methode darstellt, wurden die nachfolgenden Versuche in erster Linie mit dieser Methode durchgeführt. Die Real-time RT-PCR hat den Vorteil der einfachen und schnellen Durchführbarkeit sowie der besseren Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Zudem ist der „sampling error“ bei dieser Methode geringer als bei der One-Step RT-PCR.

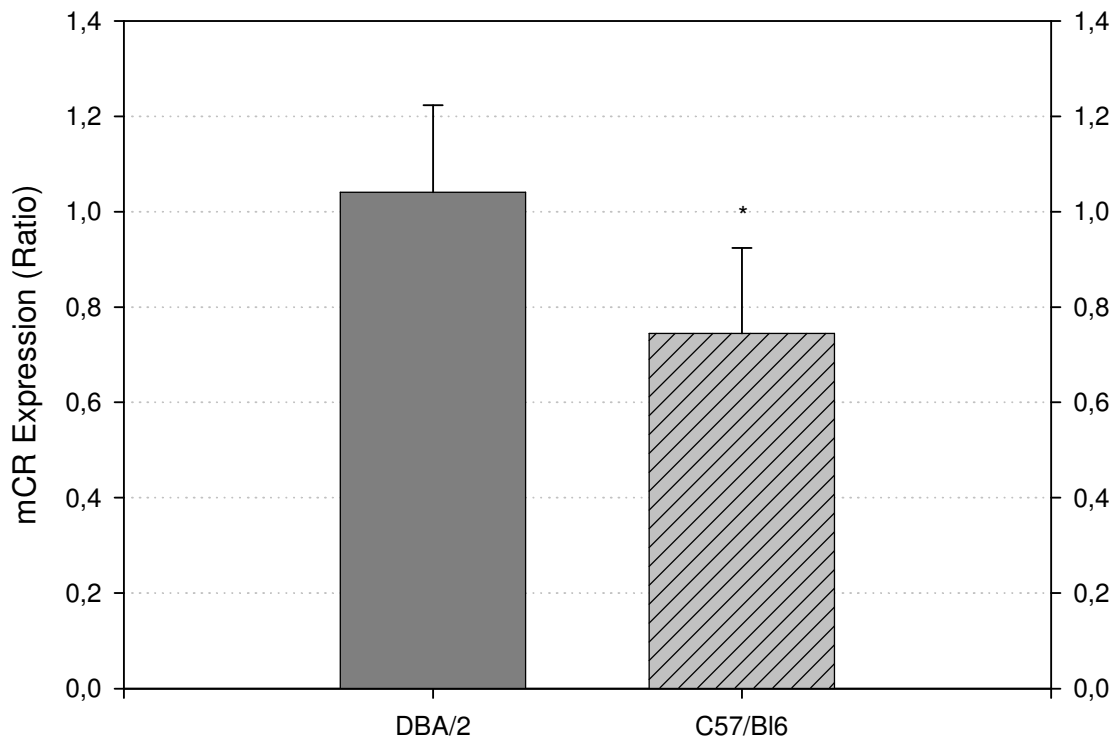


Abb. 3: Real-time RT-PCR. mCAR Expression im Herzen der DBA/2- und C57/Bl6-Maus (n = 10/11). Die mCAR Expression im Herzen der DBA/2-Maus wurde gleich 1 gesetzt (*p = 0,001).

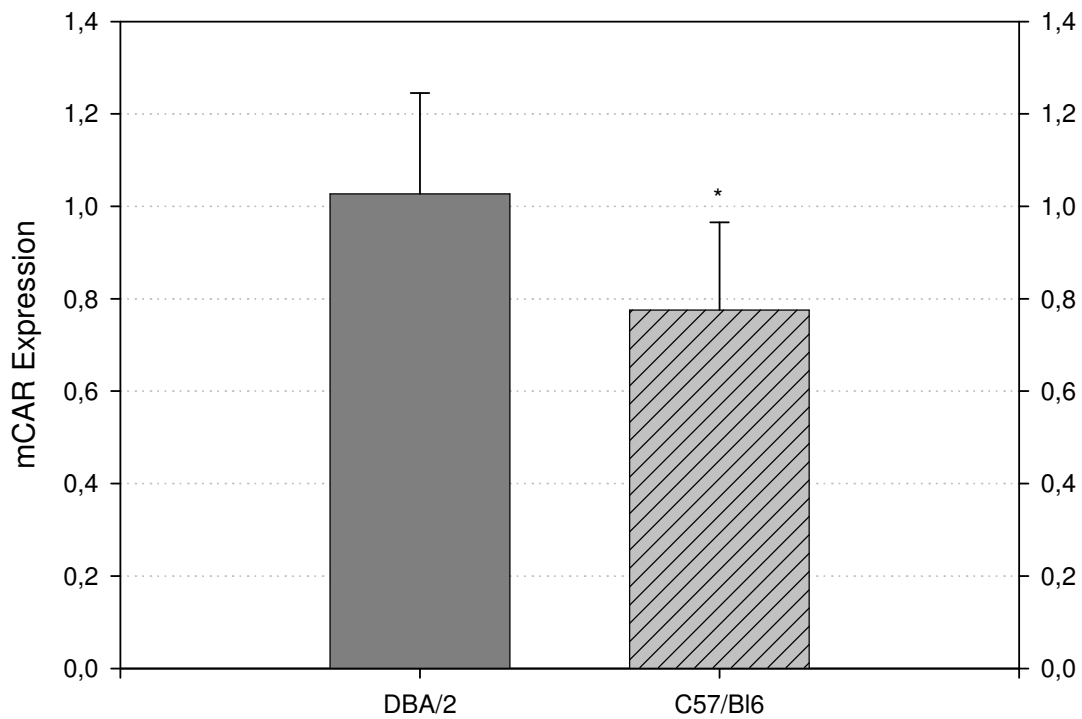


Abb. 4: One-step RT-PCR. mCAR Expression im Herzen der DBA/2- und C57/Bl6-Maus (n = 9/10). Die mCAR Expression der DBA/2-Maus wurde gleich 1 gesetzt (*p = 0,03).

3.3 Vergleich der mCAR mRNA Expression in verschiedenen Organen der C57/B16-Maus

Zunächst wurde die Expression der mCAR mRNA in verschiedenen Organen der C57/B16 Maus untersucht, wobei deutliche Expressionsunterschiede in den verschiedenen Geweben nachgewiesen werden konnten. Abb. 5 zeigt die Unterschiede in der Expression der mCAR mRNA in den verschiedenen Geweben. Die höchste Expression von mCAR konnte in der Leber nachgewiesen werden. Aber auch in der Niere und im Herzen fand sich eine ausgeprägte Expression von mCAR, während hingegen in Milz, Lunge und Skelettmuskel nur geringe Mengen mCAR mRNA nachzuweisen waren.

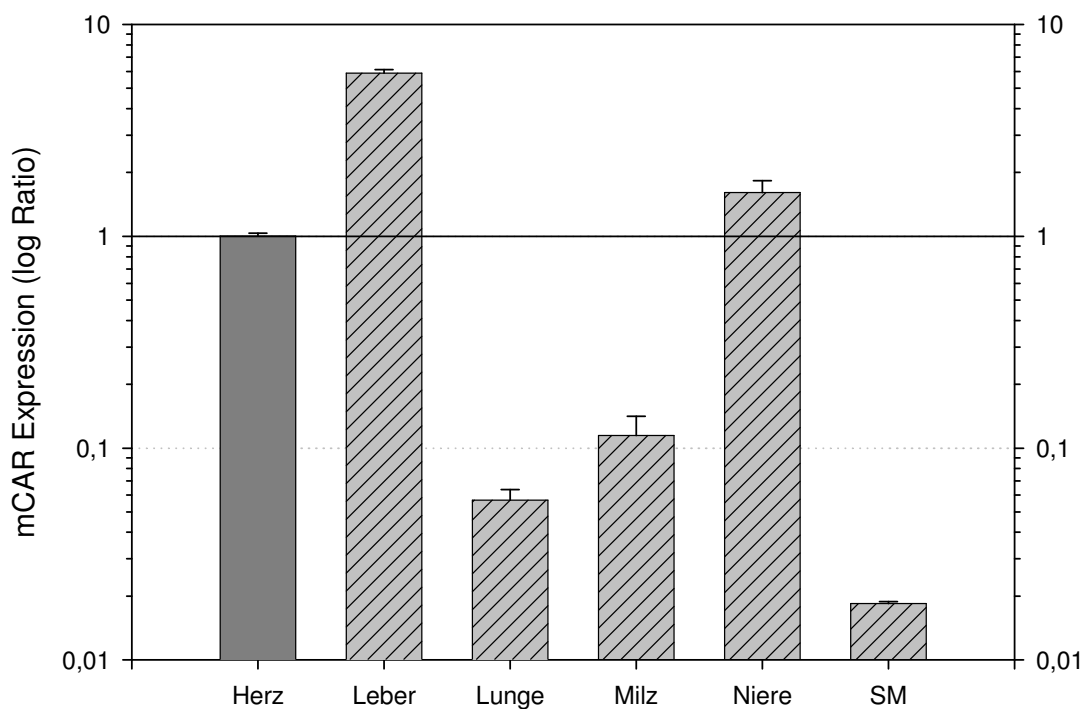


Abb. 5: Expression der mCAR mRNA in den verschiedenen Geweben der C56/B16-Maus (n = 4). Die mCAR Expression im Herzen wurde gleich 1 gesetzt. (SM = Skelettmuskel).

3.4 Vergleich der mCAR mRNA Expression im Herzen und Skelettmuskel der DBA/2- und C57/B16-Maus

Um die Expression der mCAR mRNA in verschiedenen Muskelgeweben zu untersuchen, wurden Herz- und Skelettmuskulatur hinsichtlich ihrer mCAR Expression miteinander verglichen. Abb. 6 stellt den Verlauf der Real-time RT-PCR bei der C57/B16-Maus dar. Die Versuche ergaben sowohl bei der DBA/2- als auch bei der C57/B16-Maus einen sehr ausgeprägten Expressionsunterschied zwischen den beiden Muskelgeweben. Bei beiden Mausarten konnte im Herzen eine deutlich höhere mCAR Expression nachgewiesen werden als im Skelettmuskel. Im Herzen der DBA/2-Maus (n= 7) fand sich hierbei eine ca. 70fach höhere Expression als im Skelettmuskel (n = 6), während die mCAR Expression im Herzen der C57/B16-Maus (n =8, SM: n =6)) sogar 400fach höher lag (Abb. 7). In beiden Fällen war der Expressionsunterschied statistisch signifikant (DBA/2: $p^* = 0,001$, C57/B16: $p^* = <0,001$). Wie aus der Abb. 8 zu entnehmen ist, konnte auch beim Vergleich der mCAR Expression im Skelettmuskel der DBA/2- und C57/B16- Maus ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Mausarten festgestellt werden, wobei die mCAR Expression im Skelettmuskel der DBA/2-Maus ungefähr um den Faktor 10 höher lag als bei der C57/B16-Maus (n = 6, $p^* = 0,002$).

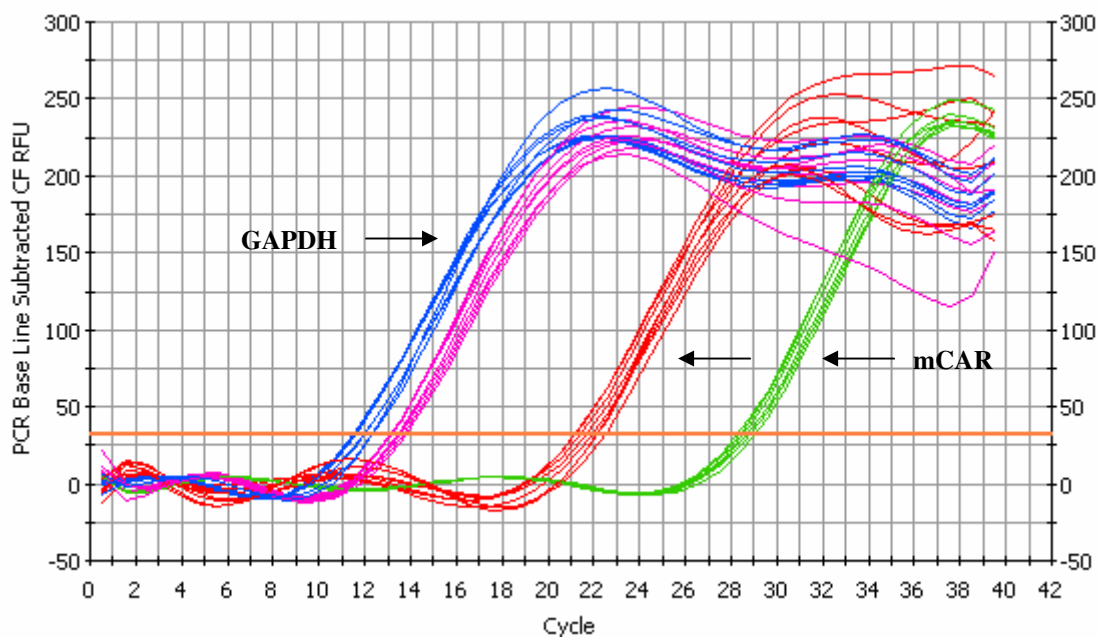


Abb. 6: Real time PCR, Base Line Graph, C57/B16-Maus
Blau: GAPDH SM, Grün: mCAR SM (n = 6)
Pink: GAPDH Herz, Rot: mCAR Herz (n = 8)

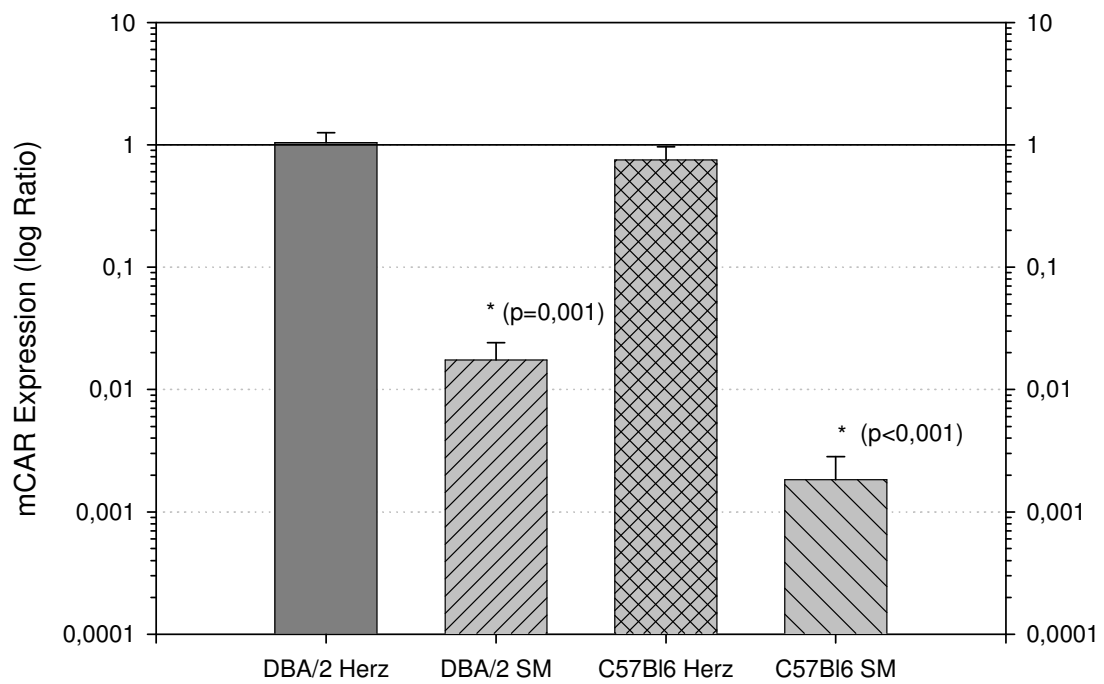


Abb. 7: mCAR Expression im Herzen und Skelettmuskel der DBA/2- und C57/Bl6-Maus. Die mCAR Expression im Herzen der DBA/2-Maus wurde gleich 1 gesetzt (n =7/6/8/6).

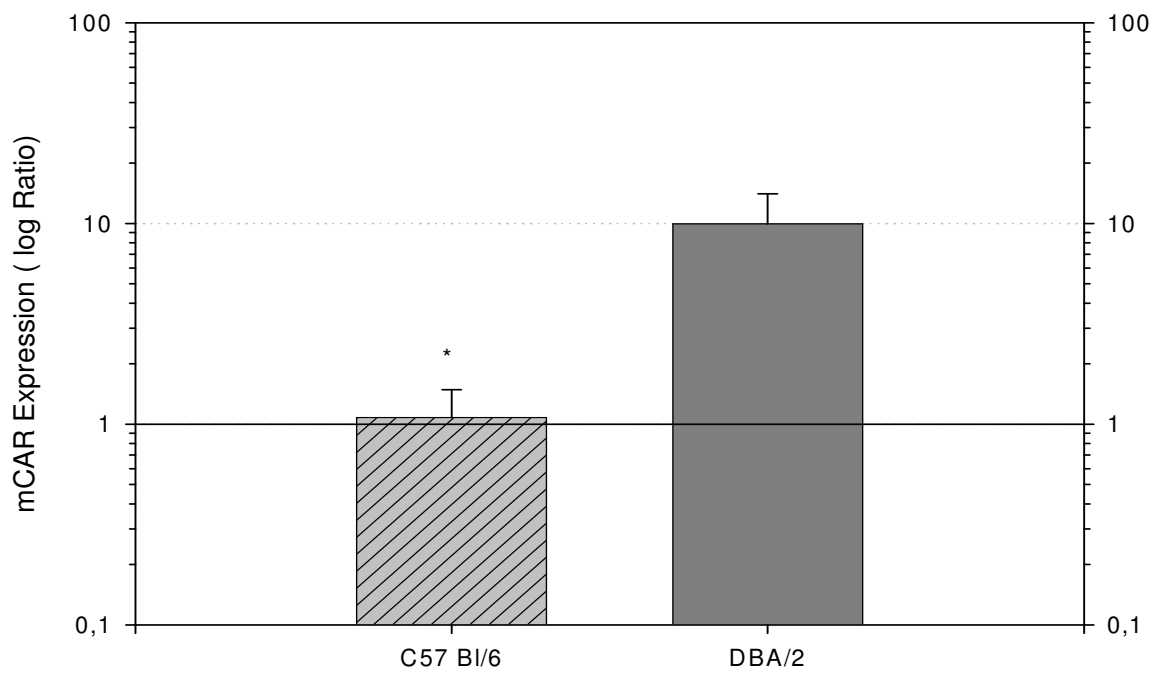


Abb. 8: mCAR Expression im Skelettmuskel der C57/Bl6- und DBA/2-Maus. Die mCAR Expression im Skelettmuskel der C57/Bl6-Maus wurde gleich 1 gesetzt (n = 6, p* = 0,002).

3.5 Vergleich der mCAR mRNA Expression im Herzen der DBA/2- und C57/B16-Maus

Zunächst wurde die mCAR Expression im Herzen von jeweils einem CVB3 sensiblen sowie resistenten Mausstamm untersucht. Dabei wurden DBA/2-Mäuse als CVB3 sensible Tiere ($n = 10$) und C57/B16-Mäuse als CVB3 resistente Tiere ($n = 11$) eingesetzt.

Die Abb. 9 und 10 zeigen den Verlauf der Real-time RT-PCR sowie die Schmelzpunktkurven von mCAR und GAPDH.

Die Versuche ergaben einen deutlichen Expressionsunterschied von mCAR im Herzgewebe der beiden Mausarten. Wie aus der Abb. 11 zu entnehmen ist, war die mCAR Expression im Herzen der CVB3 resistenten C57/B16-Maus im Vergleich zur CVB3 sensiblen DBA/2-Maus ungefähr um den Faktor 0,75 erniedrigt. Die statistische Analyse ergab dabei einen signifikanten Unterschied bezüglich der kardialen mCAR Expression beider Mausarten ($p^* = 0,001$). Abb. 12 zeigt das Ergebnis einer Agarose-Gelelektrophorese. Die mCAR Banden der DBA/2-Maus weisen hierbei eine stärkere Intensität auf als bei der C57/B16-Maus.

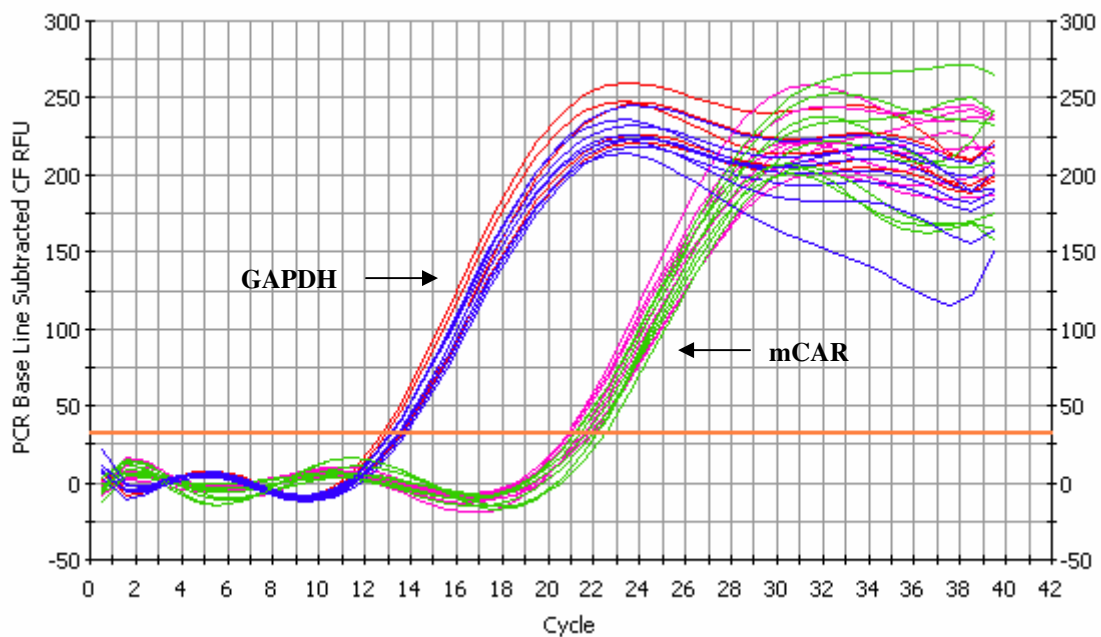


Abb. 9: Real-time RT-PCR, Base Line Graph,
Blau: GAPDH C57/B16, Grün: mCAR C57/B16 ($n = 11$)
Rot: GAPDH DBA/2, Pink: mCAR DBA/2 ($n = 10$)

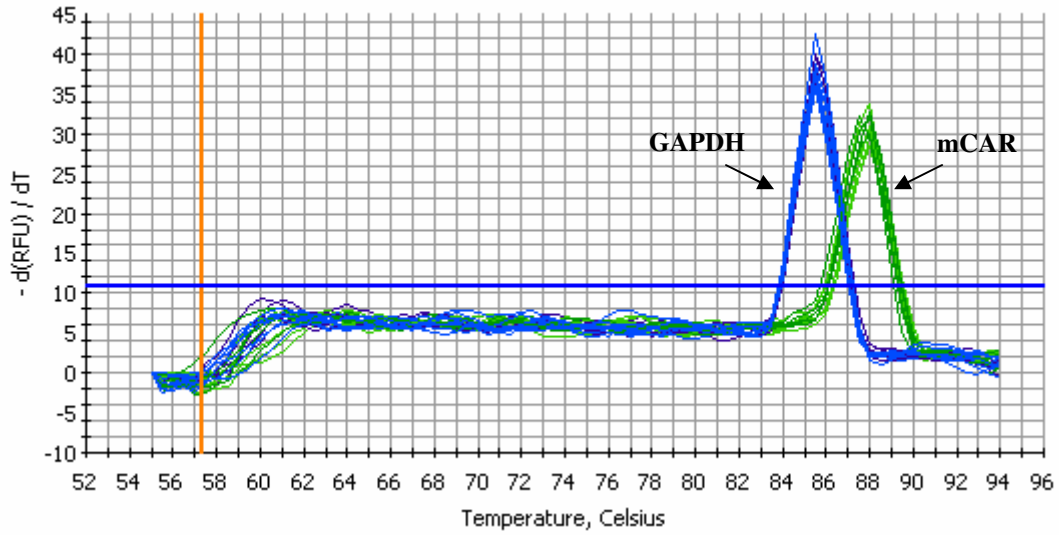


Abb. 10: Schmelzkurven GAPDH (blau) und mCAR (grün).
Schmelzpunkte: GAPDH: 85,5°C, mCAR: 88°C.

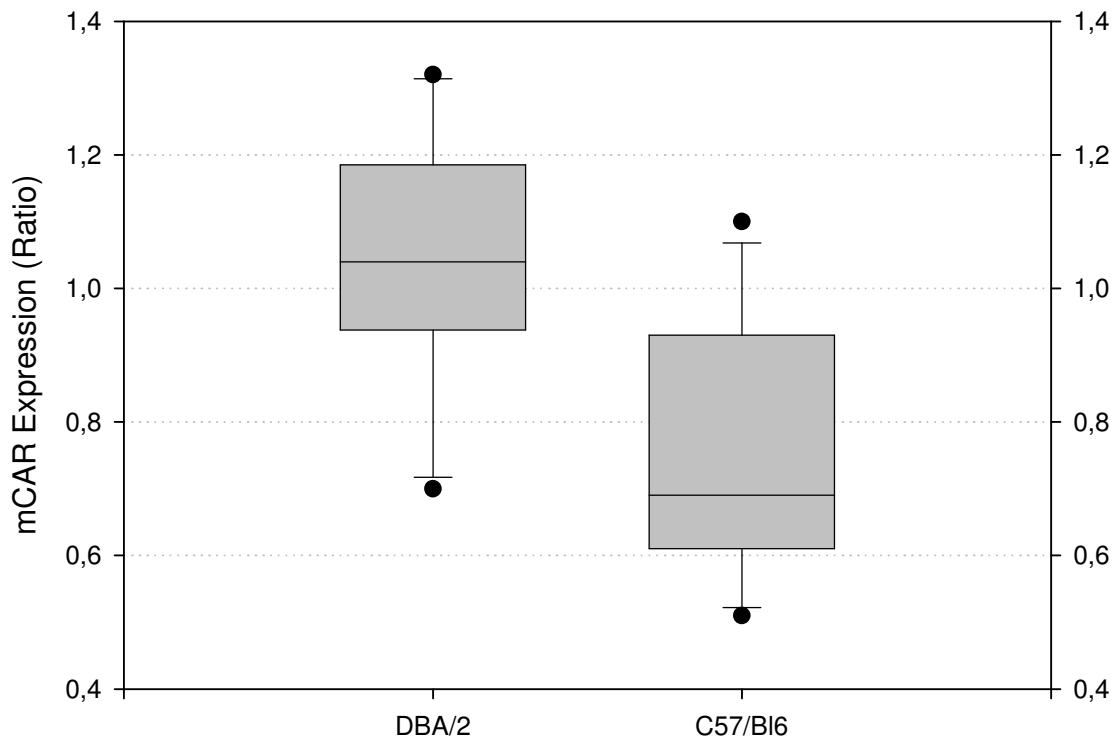


Abb. 11: Box Plot Graph, Verteilung der Einzelwerte unter Angabe des Medians sowie der Standardabweichung. Alle Werte sind auf DBA/2 bezogen (n = 10 bzw. 11)

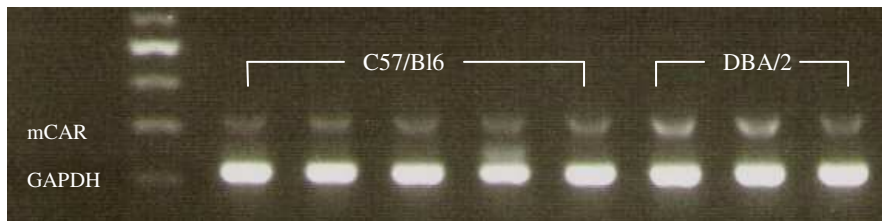


Abb. 12: Agarose-Gelelektrophorese, mCAR Expression im Herzen der C57/B16- und DBA/2-Maus.
1. Reihe: mCAR, 2. Reihe: GAPDH (Kontrolle)

3.6 Vergleich der mCAR mRNA Expression in isolierten Kardiomyozyten der DBA/2- und C57/B16-Maus

Zusätzlich zum Herzgewebe wurde die Expression der mCAR mRNA auch in isolierten Kardiomyozyten der DBA/2- und C57/B16-Maus untersucht ($n = 3$). Dabei konnte in den Kardiomyozyten der beiden Mausarten ein ähnlicher Expressionsunterschied nachgewiesen werden wie zuvor im Herzgewebe. Bezogen auf die mCAR Expression in den Kardiomyozyten der CVB3 sensiblen DBA/2-Maus war die mCAR Expression der CVB3 resistenten C57/B16 Maus ungefähr um den Faktor 0,8 erniedrigt (Abb. 13). Aufgrund der zu geringen Anzahl an untersuchten Tieren war der nachgewiesene Unterschied jedoch nicht statistisch signifikant ($p = 0,262$). Abb. 14 zeigt noch einmal den Verlauf der Real-time RT-PCR.

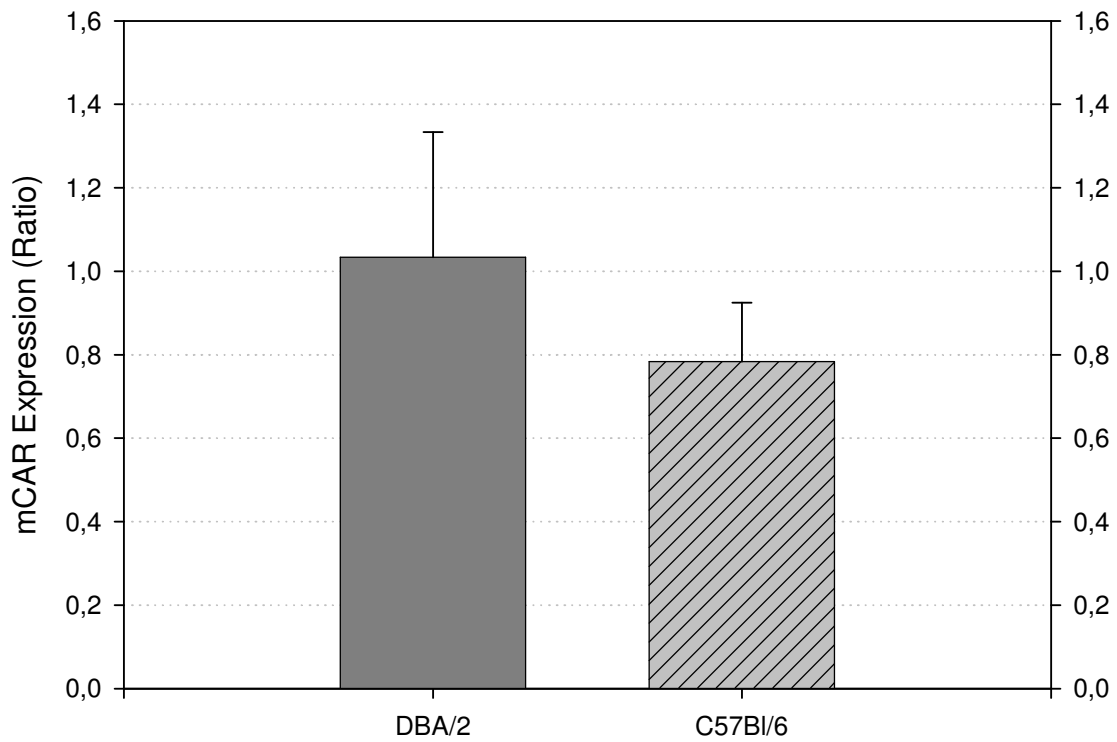


Abb. 13: Expression der mCAR mRNA auf isolierten Kardiomyozyten der DBA/2 und C57/Bl6-Maus. Die mCAR Expression der DBA/2-Maus wurde gleich 1 gesetzt (n = 3, p = 0,262).

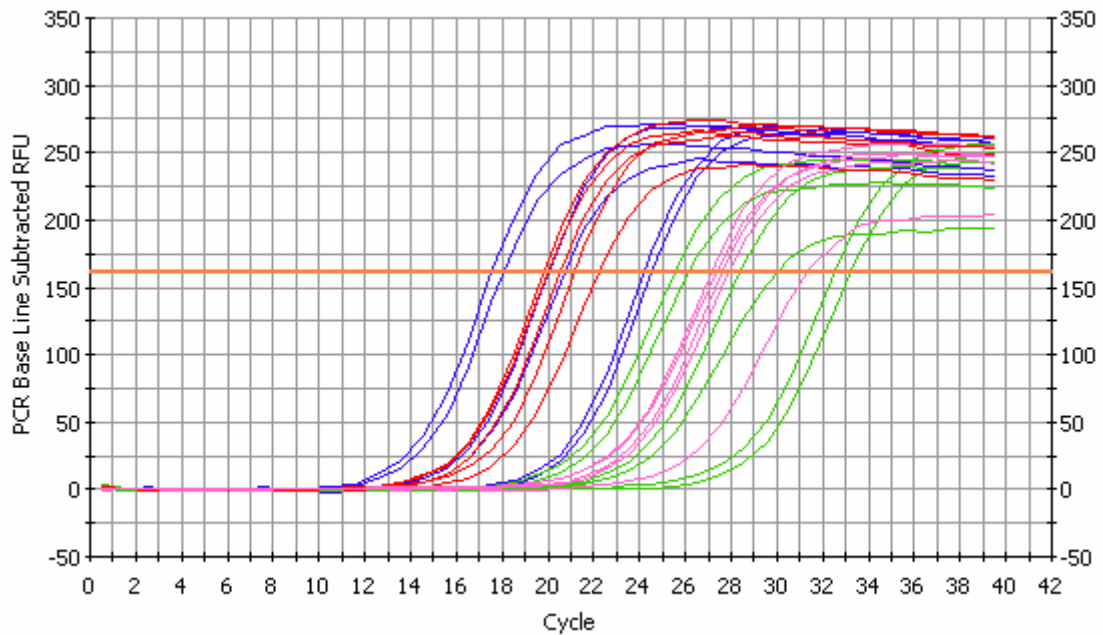


Abb. 14: Real-time RT-PCR Kurve, Base Line Graph, mCAR Expression in isolierten Kardiomyozyten der DBA/2- und C57/Bl6-Maus
 Blau: GAPDH C57/Bl6, Grün: mCAR C57/Bl6,
 Rot: GAPDH DBA/2, Pink: mCAR DBA/2

3.7 Vergleich der mCAR mRNA Expression im Herzen der DBA/2-, Balb/c-, C57/B16- und CBA-Maus

Die Untersuchung der mCAR Expression im Herzgewebe wurde anschließend noch auf zwei weitere Mausstämme ausgeweitet. Zusätzlich zu den Stämmen DBA/2 (n = 9) und C57/B16 (n = 10) wurden nun auch die Mausstämme Balb/c (n = 10) und CBA (n = 10) untersucht. Balb/c-Mäuse gehören wie die DBA/2-Mäuse zu den CVB3 sensiblen Tieren, während CBA und C57/B16 CVB3 resistent sind. Jeweils gleich alte Tiere der vier Mausarten wurden hinsichtlich ihrer mCAR Expression im Herzgewebe untersucht. Beim Vergleich der mCAR Expression konnten dabei deutliche Unterschiede im Expressionslevel zwischen den verschiedenen Mausarten nachgewiesen werden. Wie der Abb. 15 zu entnehmen ist, konnte im Herzgewebe der CVB3 sensiblen DBA/2- und der CVB3 resistenten CBA-Maus eine höhere mCAR Expression nachgewiesen werden als im Herzen der CVB3 resistenten C57/B16- und CVB3 sensiblen Balb/c-Maus. Insgesamt wies die CVB3 resistente CBA Maus von allen untersuchten Mausarten die höchste mCAR Expression auf, während die CVB3 resistente C57/B16-Maus die niedrigste Expression zeigte.

Bezogen auf die mCAR Expression im Herzen der DBA/2-Maus war die mCAR Expression der C57/B16-Maus ungefähr um den Faktor 0,8 und die mCAR Expression der Balb/c-Maus um den Faktor 0,9 erniedrigt. Die CBA-Maus wies hingegen eine um den Faktor 1,1 erhöhte Expression auf im Vergleich zur DBA/2-Maus.

Die statistische Analyse ergab dabei einen signifikanten Unterschied beim Vergleich der mCAR Expression der DBA/2- bzw. CBA-Maus mit der C57/B16-Maus ($p^* = 0,03$ bzw. $p^* = 0,01$), jedoch nicht beim Vergleich mit der Balb/c-Maus ($p = 0,101$ bzw. $p = 0,056$).

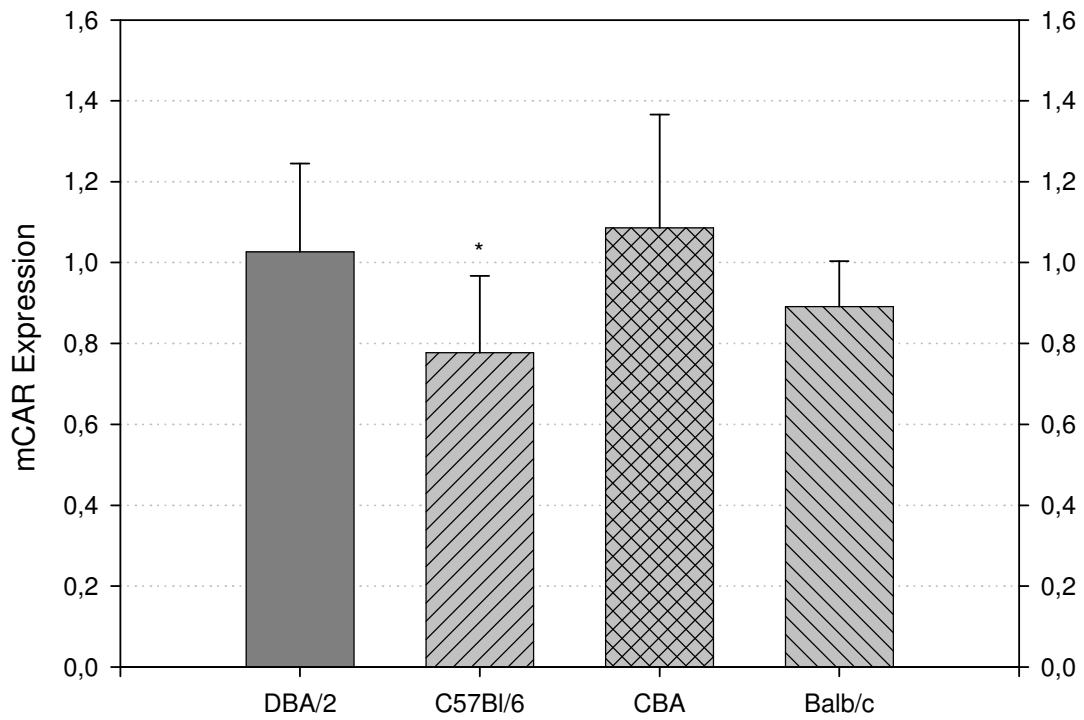


Abb. 15: Vergleich der mCAR Expression im Herzen der verschiedenen Mausarten (n = 9/10).
Die mCAR Expression im Herzen der DBA/2-Maus wurde gleich 1 gesetzt.

3.8 Analyse der mCAR mRNA Sequenz bei verschiedenen Mausarten

Zur Analyse der mCAR mRNA Sequenz bei den Mausarten DBA/2, CBA, C57/B16 und Balb/c wurde die Methode des „dideoxy-Fingerprintings“ (ddF-Reaktion) durchgeführt. Dabei wurden alle fünf mCAR Primer (F) durchgetestet. Die ddF-Analyse ergab Unterschiede im Bandenmuster bei der Verwendung der Primer mCAR 4F und 5F. Wie in den Abb. 16 und 17 dargestellt, zeigten sich dabei Übereinstimmungen im Bandenmuster bei der CVB3 sensiblen DBA/2- und der CVB3 resistenten CBA-Maus sowie bei der CVB3 resistenten C57/B16- und der CVB3 sensiblen Balb/c-Maus.

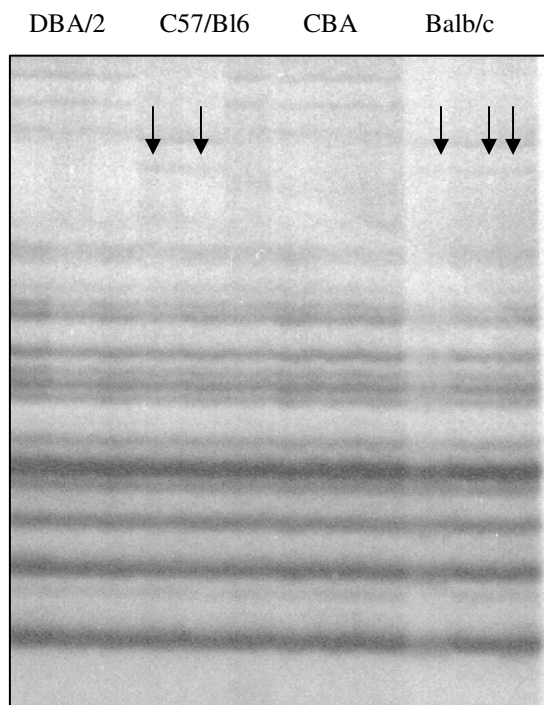


Abb. 16: ddF-Analyse mCAR 4F

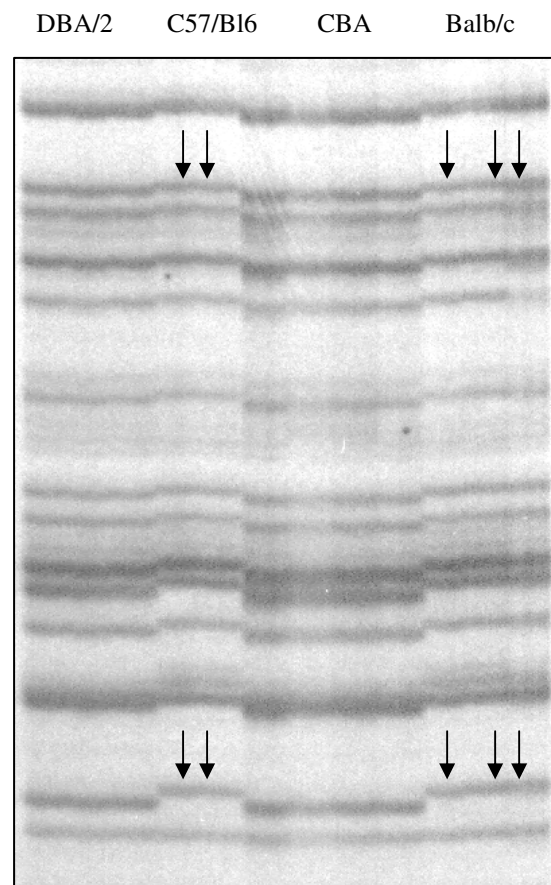


Abb. 17: ddF-Analyse mCAR 5F

Abb. 16/17: ddF-Analyse

Bandenmuster bei Verwendung der Primer mCAR 4F (links) und mCAR 5F (rechts). Es findet sich jeweils eine Übereinstimmung im Bandenmuster bei den Mausstämmen DBA/2 und CBA sowie C57/B16 und Balb/c.

Das anschließende Sequenzieren der entsprechenden Proben ergab zwei Polymorphismen, die jeweils durch den Austausch einer einzelnen Base gekennzeichnet sind (A/T und A/G). Die Analyse der mCAR 5F mRNA Sequenz zeigte einen bereits bekannten Polymorphismus mit dem Austausch der Basen A/T in der nicht kodierenden Region (NCR) der mCAR mRNA (SNP 4208281). Während die mCAR mRNA der Mausstämme DBA/2 und CBA die Base Adenin (A) aufwies, zeigten die Mausstämme C57/B16 und Balb/c an gleicher Position die Base Thymin (T). Die Ergebnisse der Sequenzanalyse sind den Abbildungen 18-20 zu entnehmen.

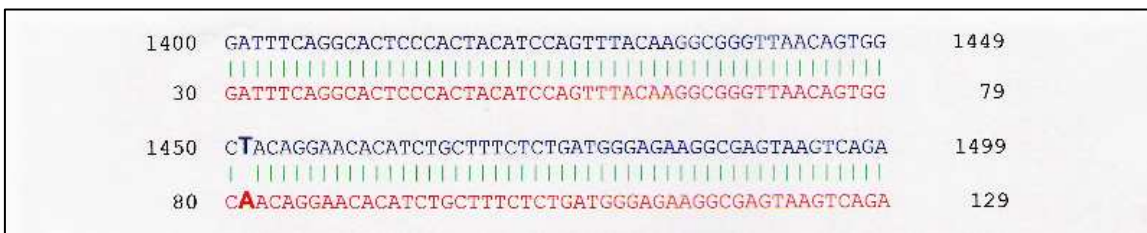


Abb. 18: mCAR mRNA Sequenz (mCAR 5F).
 Bekannter Polymorphismus in der nicht kodierenden Region der mCAR mRNA mit Austausch der Basen A/T (SNP 4208281).
 Blau: mCAR mRNA Sequenz der C57/B16- und Balb/c-Maus (T).
 Rot: mCAR mRNA Sequenz der DBA/2- und CBA-Maus (A).

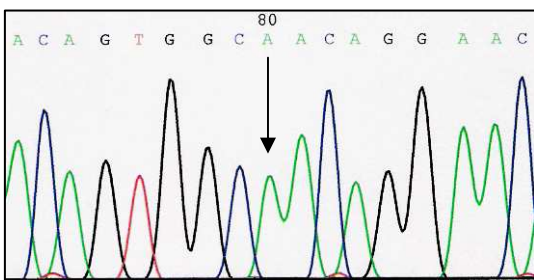


Abb. 19: mCAR mRNA Sequenz (mCAR 5F):
 CVB3 sensible DBA/2-Maus
 CVB3 resistente CBA-Maus

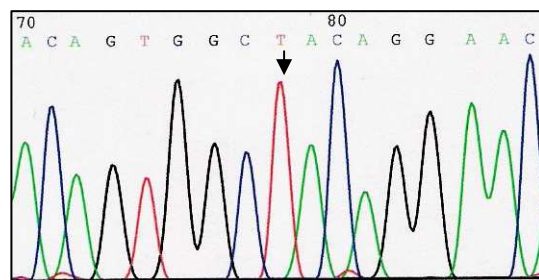


Abb. 20: mCAR mRNA Sequenz (mCAR 5F):
 CVB3 sensible Balb/c-Maus
 CVB3 resistente C57/B16-Maus

Beim Vergleich der mCAR 4F mRNA Sequenz konnte ein weiterer Basenaustausch (A/G) nachgewiesen werden, der ebenfalls in der nicht kodierenden Region der mCAR mRNA lokalisiert ist. Auch hierbei zeigte sich jeweils eine Sequenzübereinstimmung bei den Mäusen DBA/2 und CBA (Adenin) sowie C57/Bl6 und Balb/c (Guanin). Die entsprechenden Sequenzen sind in den Abb. 21 und 22 dargestellt.

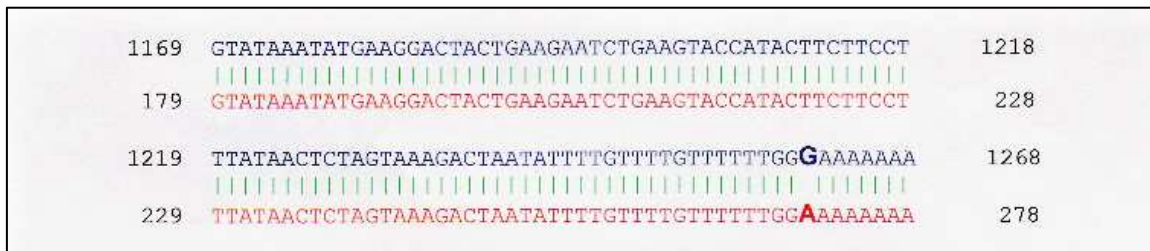


Abb. 21: mCAR mRNA Sequenz (mCAR 4F).
 Polymorphismus mit Austausch der Basen A/G .
 Blau: mCAR mRNA Sequenz der C57/Bl6- und Balb/c-Maus (G).
 Rot: mCAR mRNA Sequenz der DBA/2- und CBA-Maus (A).

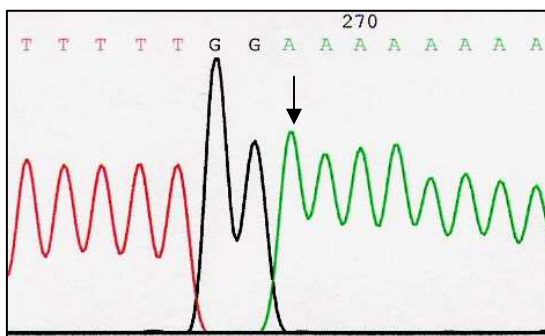


Abb. 22: mCAR mRNA Sequenz (mCAR 4F):
 CVB3 sensible DBA/2-Maus
 CVB3 resistente CBA-Maus

4 Diskussion

4.1 Diskussion der Methoden

4.1.1 Versuchstiere

Zur Untersuchung der mRNA Sequenz sowie der Expression des Coxsackievirus-Adenovirus Rezeptors (CAR) bei verschiedenen Mausstämmen wurde auf etablierte Tiermodelle zurückgegriffen. Untersucht wurden jeweils zwei CVB3 sensible sowie resistente Mausstämme. Als CVB3 sensible Mausstämme wurden DBA/2- und Balb/c-Mäuse eingesetzt, welche nach einer Infektion mit CVB3 eine schwere Myokarditis mit ausgedehnten Nekrosen und inflammatorischen Infiltraten entwickeln, die der Myokarditis des Menschen sehr ähnlich ist. Die Mausstämme C57/Bl6 und CBA zeigen hingegen nach einer CVB3 Infektion nur eine unbedeutende Myokarditis mit geringen kardialen Läsionen und wurden daher als CVB3 resistente Stämme verwendet (Huber *et al.*, 1986, 1993, 1997, Lodge *et al.*, 1987, Chow *et al.*, 1991).

Die Expression von CAR weist insbesondere im Herzen und Skelettmuskel eine altersabhängige Regulation auf (Ito *et al.*, 2000, Fechner *et al.*, 2003, Nalbantoglu *et al.*, 1999, 2001). Um altersbedingte Expressionsunterschiede zu vermeiden, wurden die Tiere daher alle im Alter von 5-6 Wochen getötet.

4.1.2 Kardiomyozyten

Da nicht nur *in vivo* sondern auch *in vitro* Unterschiede in der CVB3 Empfänglichkeit bei den verschiedenen Mausarten festgestellt werden konnte, wurde neben der Untersuchung der mCAR Expression im Herzgewebe auch die Expression auf isolierten, nicht infizierten Kardiomyozyten jeweils eines CVB3 sensiblen und resistenten Mausstammes untersucht.

4.1.3 Messpräzision (Intra-und Interassay-Varianz)

Zur Überprüfung der Messpräzision wurde die Intraassay- und Interassay-Varianz bestimmt. Die Intraassay-Varianz gibt Aufschluss über die Messwertstreuung bei der Mehrfachbestimmung einer Probe innerhalb eines Assays an einem Tag, während die Interassay-Varianz die Streuung der Ergebnisse einer Probe bei wiederholten Messungen an unterschiedlichen Tagen wiedergibt. Die Intra- und Interassay-Varianz werden dabei durch Bestimmung des Variationskoeffizienten, d. h. der relativen Standardabweichung ermittelt. Bei der Intraassay-Varianz wird die relative Standardabweichung zum Mittelwert aller Messwerte an einem Tag bestimmt, während bei der Interassay-Varianz die Bestimmung der relativen Standardabweichung zum Mittelwert aller Messwerte an verschiedenen Tagen erfolgt.

Die Variationskoeffizienten zur Bestimmung der Intraassay-Varianz betragen zwischen 2,6% und 3,21%. Der Variationskoeffizient zur Ermittlung der Interassay-Varianz betrug hingegen 7,6%. Die stärkere Messwertstreuung bei wiederholter Bestimmung einer Probe während verschiedener PCR-Durchgänge an verschiedenen Tagen (Interassay-Varianz) kann trotz Verwendung gleicher Mengen und Einstellungen auf geringgradig variierende PCR-Bedingungen zurückgeführt werden. Schon minimale Mengenunterschiede bei der Herstellung des PCR-Ansatzes, Temperaturunterschiede o.ä. können das PCR-Ergebnis beeinflussen und somit zu Schwankungen der Messwerte bei wiederholter Bestimmung einer Probe führen.

4.1.4 Nachweis der mCAR mRNA Expression mittels RT-PCR

Zum Nachweis bzw. zum Vergleich der mCAR mRNA Expression im Herzen und in verschiedenen anderen Organen der Maus wurden zwei verschiedene Formen der RT-PCR eingesetzt: Die One-step RT-PCR und die Real-time RT-PCR.

Der Nachweis von mRNA mit Hilfe der RT-PCR hat zum einen den Vorteil der einfachen und schnellen Durchführbarkeit, zum anderen stellt die PCR eines der sensitivsten Verfahren dar, um auch kleinste Mengen von Nukleinsäuren bzw. geringste Unterschiede in der mRNA Expression nachzuweisen. Andere Methoden zum RNA Nachweis wie In-situ Hybridisierung oder verschiedene Blotverfahren (Northern-, Slot-, Dot-Blot) sind weniger sensitiv und darüber hinaus auch schwieriger und langwieriger

in der Durchführung. Zudem ist die benötigte RNA-Menge bei diesen Verfahren größer als bei der RT-PCR (Ruppert, 1995).

Bei der RT-PCR erfolgt zunächst die Umschreibung der eingesetzten RNA in cDNA mit Hilfe des aus Retroviren stammenden Enzyms Reverse Transkriptase und im Anschluss die Amplifikation der cDNA im Rahmen der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR). Bei beiden durchgeführten PCR Methoden wurde für den Ansatz das OneStep RT-PCR Kit von Qiagen verwendet.

In den Vorversuchen wurden die optimalen PCR-Bedingungen durch Variation der Annealing Temperatur, der Zyklusanzahl sowie der eingesetzten RNA-Menge ermittelt. Des Weiteren erfolgte die Austestung der fünf mCAR Primerpaare. Aufgrund der erzielten Ergebnisse wurden die Primerpaare 3F/R und 5F/R für die Hauptversuche ausgewählt, die optimale Annealing Temperatur auf 58°C festgesetzt und die Zyklusanzahl auf 40. Bei allen Versuchen diente das Housekeeping Gen GAPDH als Kontrolle.

Housekeeping Gene wie GAPDH, β -Aktin oder 18S rRNA kommen in allen kernhaltigen Zellen vor und werden normalerweise in konstanter Menge exprimiert, d.h. sie unterliegen keiner Regulation (Pfaffl, 2001). Im Rahmen der PCR werden sie deshalb einerseits als Kontrolle eingesetzt, um zu überprüfen, ob in allen Proben die gleiche RNA- bzw. DNA-Ausgangskonzentration vorlag. Andererseits dienen sie als Standard, um die Expression der zu untersuchenden RNA bzw. DNA (hier: mCAR mRNA) relativ quantifizieren zu können. In verschiedenen Studien konnte jedoch gezeigt werden, dass einige Housekeeping Gene doch einer Regulation unterliegen und unter experimentellen Bedingungen in ihrer Expression variieren können (Pfaffl, 2001).

4.1.4.1 One-step RT-PCR

Die Anzahl der Amplifikate steigt bei der PCR solange exponentiell an, bis durch den Verbrauch der Nukleotide ein Sättigungsbereich erreicht wird. Zu diesem Zeitpunkt weisen dann alle Proben ungefähr die gleiche Amplifikatmenge auf, so dass Expressionsunterschiede nur schwer oder gar nicht mehr erfasst werden können. Um diesen Sättigungsbereich, der meist ab dem 25.-35. Zyklus erreicht wird, zu umgehen, wurde die PCR alle 3-5 Zyklen gestoppt, um 5-7 μ l aus jeder Probe herauszupipettieren, so dass am Schluss Proben von verschiedenen Zeitpunkten der PCR (z. B. 20, 25, 30, 35

Zyklen) vorlagen. Dies hatte den Vorteil, dass der Moment des Amplifikatanstiegs erfasst werden konnte, bei dem mögliche Expressionsunterschiede am deutlichsten in der nachfolgenden Gelelektrophorese sichtbar werden. Das Bandenmuster jeder Gelelektrophorese wurde unter UV-Licht betrachtet und auf dem Computer gespeichert. Zur Auswertung der gespeicherten Bilder wurde das Gelanalyse-Programm Quantity One von BioRad verwendet. Trotz vorgegebener Vorgehensweise bei der Gelanalyse variierten die Ergebnisse etwas stärker als bei der Real-time RT-PCR, da die Auswertung u. a. von verschiedenen Faktoren wie beispielsweise der Qualität der Elektrophorese und der gespeicherten Bilder abhängig ist.

Insgesamt ist der Sampling Error bei dieser Methode größer als bei der Real-time RT-PCR, wodurch vermutlich auch die etwas größeren Ergebnisschwankungen erklärt werden können. Zudem ist die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse etwas geringer als bei der Real-time RT-PCR.

4.1.4.2 Real-time RT-PCR

Die Real-time RT-PCR ist eine computergestützte, vollautomatisierte Form der PCR Durchführung. Für die Detektion neu synthetisierter PCR Produkte wird der Fluoreszenzfarbstoff Sybr Green eingesetzt, der spezifisch an die kleine Furche der Doppelstrang-DNA bindet (Pfaffl, 2001). Während der PCR wird die Fluoreszenz der Proben nach jedem Zyklus gemessen. Nach Beendigung der Reaktion kann dann eine exakte Graphik über den PCR-Verlauf sowie über Standard- und Schmelzpunktcurven abgerufen werden. Die Real-time RT-PCR ist hoch sensitiv und ermöglicht die Quantifizierung auch kleinster RNA-Mengen und geringster Veränderungen in der Gen-Expression. Die Methode ist einfach durchzuführen, sehr genau und liefert zuverlässige und schnelle Ergebnisse (Pfaffl, 2001). Durch die automatische Messung der Fluoreszenz nach jedem Zyklus entfällt das mühsame Abstoppen der PCR und der Zeitpunkt des Amplifikatanstiegs wird genauer erfasst. Ebenso entfallen die nachfolgende Gelelektrophorese sowie die eigenhändige Auswertung der Elektrophorese Banden mit Hilfe des Gelanalyse-Programms, wodurch der Sampling Error reduziert wird. Insgesamt ist die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse besser als bei der One-step RT-PCR. Das Ergebnis wird jeweils automatisch als Ct-Wert angegeben, d.h. dem Zyklus, an dem der Kurvenanstieg (Amplifikatanstieg)

beginnt. Für die relative Quantifizierung der mCAR Expression wurde die Formel nach Pfaffl (2001) zur Berechnung der Ratio verwendet.

Zunächst wurde die Expression der mCAR mRNA im Herzen jeweils eines CVB3 sensiblen (DBA/2) und resistenten (C57/B16) Tieres untersucht. Dabei zeigten sich deutliche Expressionsunterschiede bei den Tieren, die recht gut mit der unterschiedlichen Myokarditis-Empfänglichkeit korrelierten. Aufgrund dieser Übereinstimmung von Expression und Empfindlichkeit wurden die Untersuchungen noch auf zwei weitere Mausstämme (Balb/c und CBA) ausgeweitet. Balb/c gehört wie DBA/2 zu den CVB3 sensiblen Mäusen, während CBA ebenso wie C57/B16 als CVB3 resistent anzusehen ist.

4.1.5 Sequenzanalyse

Zum Screening der mCAR mRNA Sequenz auf mögliche Mutationen wurde die Methode des „dideoxy Fingerprintings“ (ddF-Reaktion) durchgeführt.

Das Sequenzieren der DNA ist nach wie vor der Goldstandard zum Nachweis von Mutationen. „Dideoxy Fingerprinting“ (ddF-Reaktion) ist eine Mischung zwischen „dideoxy sequencing“ und SSCP (single-strand conformation polymorphism) und dient dem Nachweis von Veränderungen einzelner Basen oder Sequenzen in PCR-Amplifikaten.

Die ddF-Reaktion beinhaltet eine „cycle-sequencing“ Reaktion unter Zugabe nur eines Terminations-Nukleotids, die gefolgt wird von einer Nicht-Denaturierenden-Gel-Elektrophorese. Der Nachweis von Veränderungen ist auf zweifache Weise möglich:

1. über Unterschiede in der Sekundärstruktur der Einzelstrang-DNA und
2. über Unterschiede in der Kettenabbruchstelle der PCR-Amplifikate.

Die Ergebnisse liefern mutationsspezifische „Fingerprints“, die einfach zu interpretieren sind. Proben mit unterschiedlichem Bandenmuster in der ddF-Analyse wurden zum Sequenzieren an das Labor SeqLab nach Göttingen geschickt. Im Anschluss wurden die sequenzierten Proben mit Hilfe des DNAsis Programms (Hitachi Software) mit Standardsequenzen verglichen, um mögliche Sequenzunterschiede zwischen den untersuchten Tieren festzustellen.

Die Elektrophorese ist nicht temperaturabhängig, lediglich eine Kühlung des Gels mit einem Ventilator ist nötig (Ruppert *et al.*, 2004).

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Vergleich der mCAR mRNA Expression in verschiedenen Organen der C57/Bl6-Maus

Wie bereits aus verschiedenen anderen Studien bekannt ist, wird der Coxsackievirus-Adenovirus Rezeptor (CAR) in einer Vielzahl von Organen, wie beispielsweise Herz, Gehirn, Pankreas, Leber, Niere und Lunge exprimiert, wobei jedoch zum Teil ausgeprägte Expressionsunterschiede in den verschiedenen Geweben nachweisbar sind. Der Nachweis von CAR erfolgte in den meisten Studien auf mRNA Ebene, wobei in erster Linie die Methode des Northern Blottings eingesetzt wurde (Bergelson *et al.*, 1998, Tomko *et al.*, 1997, Honda *et al.*, 2000).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Verteilung sowie die Expressionsmenge der mCAR mRNA in den verschiedenen Geweben der Maus mit Hilfe der RT-PCR untersucht, um festzustellen, ob mit dieser Methode ähnliche Expressionsunterschiede wie in den bereits vorliegenden Studien erzielt werden können.

Die höchste Expression von mCAR mRNA konnte in der Leber nachgewiesen werden, aber auch im Herzen und in der Niere fand sich eine ausgeprägte Expression, während Milz, Lunge und Skelettmuskel nur sehr wenig mCAR aufwiesen. Insgesamt korrelierten die mit der RT-PCR nachgewiesenen Expressionsunterschiede recht gut mit den Ergebnissen der bereits vorliegenden Studien (Bergelson *et al.*, 1998, Tomko *et al.*, 1997).

Die Fähigkeit von Viren, Zellen zu infizieren, hängt u. a. von der Anwesenheit eines spezifischen Rezeptors an der Zelloberfläche ab (Tomko *et al.*, 1997), so dass virusspezifische Rezeptoren als eine wichtige Determinante für den Gewebetropismus sowie die Pathogenität von Viren angesehen werden (Bergelson *et al.*, 1998). Auch im Falle von CVB3 wird der recht ausgedehnte Gewebetropismus größtenteils auf die ebenso weitläufig vorhandene Expression von CAR zurückgeführt (Asher *et al.*, 2005), wobei vermutlich insbesondere die Höhe der Expression eine wichtige Determinante für die Zell- bzw. Gewebeempfindlichkeit gegenüber CVB3 darstellt (Cheung *et al.*, 2005). Die höchste Expression von CAR findet sich im Herzen, Gehirn, Pankreas und in der Leber, also in den Organen, die auch die größte Empfindlichkeit gegenüber CVB3 aufweisen (Bergelson *et al.*, 1998). Auch die Tatsache, dass die Expression von CAR in einigen Organen wie Herz, Gehirn und Skelettmuskel eine altersabhängige Regulation

aufweist, mit hohen Expressionsleveln während der embryonalen Entwicklung sowie perinatal und Rückgang der Expression nach der Geburt bzw. mit zunehmendem Alter (Ito *et al.*, 2000, Honda *et al.*, 2000, Nalbantoglu *et al.*, 1999), passt zu der Beobachtung, dass CVB3 sowohl bei Menschen als auch Mäusen eine höhere Affinität zu unreifem Gewebe zeigt (Bergelson *et al.*, 1998, Honda *et al.*, 2000). Neugeborene Mäuse weisen beispielsweise eine größere Empfänglichkeit für die Entwicklung einer CVB3 induzierten Myokarditis oder Enzephalitis auf als adulte Tiere, was wiederum mit der Höhe der CAR Expression im jeweiligen Entwicklungsstadium übereinstimmt. Allerdings korreliert die Expression von CAR nicht immer mit der bekannten CVB3 Empfindlichkeit von Zellen bzw. Geweben. So konnte in einer Studie von Mena *et al.* (1999) gezeigt werden, dass CVB3 zu einer ausgeprägten produktiven Infektion von B-Lymphozyten führen kann, obgleich diese Zellen keine bzw. nur eine extrem geringe Expression von CAR aufweisen. Ebenso exprimieren Niere und Lunge recht hohe Mengen von CAR, gehören aber dennoch nicht zu den typischen Zielorganen von CVB3 bzw. weisen nach einer CVB3 Infektion keine Läsionen auf (Bergelson *et al.*, 1998).

Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass neben der Expression von CAR noch andere Faktoren, wie beispielsweise das Vorhandensein von zusätzlichen Rezeptoren wie DAF oder verschiedenen intrazellulären Faktoren, die Empfindlichkeit von Zellen oder Geweben gegenüber CVB3 bzw. den Gewebetropismus von CVB3 beeinflussen. Bislang existieren jedoch noch keine Untersuchungen, die eine mögliche Korrelation zwischen der CVB3 Empfänglichkeit verschiedener Mausstämme und Gewebe und der Expression von DAF bzw. DAF und CAR zusammen untersuchen.

4.2.2 Vergleich der mCAR mRNA Expression im Herzen und Skelettmuskel der DBA/2- und C57/B16-Maus

Coxsackieviren der Gruppe B können sowohl das Herz als auch die Skelettmuskulatur infizieren und Erkrankungen wie Myokarditis, Polymyositis und Interkostalneuralgie (Bornholm's disease) hervorrufen (Mena *et al.*, 1999). Weiterhin ist bekannt, dass die Expression von CAR sowohl im Herzen als auch im Skelettmuskel altersabhängig reguliert wird. Des Weiteren konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass es im Rahmen verschiedener kardialer als auch muskulärer Erkrankungen wie autoimmuner

Myokarditis (Ito *et al.*, 2000), DCM (Noutsias *et al.*, 2001, Sasse *et al.*, 2003, Selinka *et al.*, 2004), Myokardinfarkt (Fechner *et al.*, 2003) oder Muskeldystrophie Duchenne zu einer CAR Induktion kommen kann. CAR scheint somit sowohl eine wichtige Rolle bei der embryonalen Entwicklung als auch bei der Geweberegeneration von Herz- und Skelettmuskel zu spielen.

Um herauszufinden, wie sich die basale Expression von CAR in diesen beiden Muskelgeweben der DBA/2- und C57/B16-Maus verhält, wurde die Expression der mCAR mRNA bestimmt. Obwohl beide Muskelgewebe durch CVB infiziert werden können, zeigten sich dennoch deutliche Expressionsunterschiede zwischen Herz- und Skelettmuskulatur. Je nach Mausstamm konnte im Herzen eine ca. 70-400fach höhere mCAR Expression nachgewiesen werden als im Skelettmuskel. Weiterhin wies der Skelettmuskel der DBA/2-Maus signifikant mehr CAR auf als bei der C57/B16-Maus. Die mCAR Expression variiert somit nicht nur in den verschiedenen Muskelgeweben eines Mausstammes, sondern weist auch Unterschiede zwischen den verschiedenen Mausstämmen auf.

Die Feststellung, dass die mCAR Expression in den beiden Muskelgeweben deutliche Unterschiede aufweist, obgleich beide Gewebe durch CVB infiziert werden können, bestätigt die Vermutung, dass die Expression von CAR nicht die einzige Determinante für den Gewebetropismus von CVB darstellt, sondern dass noch weitere Faktoren die Empfindlichkeit der Gewebe gegenüber CVB beeinflussen müssen.

4.2.3 Vergleich der mCAR mRNA Sequenz bei verschiedenen Mausarten

Durch die Analyse der mCAR mRNA Sequenz der verschiedenen Mausstämme sollte untersucht werden, ob die Unterschiede in der Myokarditis-Empfänglichkeit bei den verschiedenen Mausarten auf das Vorliegen von Mutationen im mCAR Gen bzw. in der mCAR mRNA zurückgeführt werden können

Durch Mutationen im mCAR Gen bzw. in der mCAR mRNA könnte sowohl die pathologische als auch physiologische Funktion von CAR beeinflusst werden. Es wäre einerseits denkbar, dass mögliche Mutationen im mCAR Gen Veränderungen in der Proteinstruktur von CAR hervorrufen, die wiederum Auswirkungen auf die Virus-Rezeptor-Interaktion und somit auf die Virusempfindlichkeit haben könnten. So könnten Unterschiede in der Empfänglichkeit u. a. durch eine erschwerte oder

erleichterte Virusbindung und -internalisierung aufgrund einer veränderten Proteinstruktur zustande kommen. Andererseits könnten Mutationen auch die physiologische Funktion von CAR sowohl qualitativ als auch quantitativ beeinträchtigen, so dass die Zelle „versucht“, dieses Defizit über eine Hoch-Regulierung von CAR zu kompensieren. Diese Induktion von CAR hätte dann möglicherweise wiederum Auswirkungen auf die pathologische Funktion als Virusrezeptor und könnte zu einer erhöhten Virusempfindlichkeit beitragen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die mCAR mRNA Sequenz von jeweils zwei CVB3 sensiblen (DBA/2 und Balb/c) sowie resistenten (C57/Bl6 und CBA) Mäusen untersucht. Die Analyse der mCAR mRNA Sequenz ergab dabei zwei Polymorphismen, die jeweils mit dem Austausch einer einzelnen Base einhergehen (A/T und G/A) und in der nicht kodierenden Region der mCAR mRNA lokalisiert sind.

Beim Vergleich der mRNA Sequenzen fanden sich jeweils Übereinstimmungen bei den Tieren DBA/2 und CBA sowie C57/Bl6 und Balb/c, also bei jeweils einem CVB3 sensiblen und resistenten Tier und nicht wie vermutet bei den CVB3 sensiblen bzw. resistenten Tieren.

Sowohl die Tatsache, dass die nachgewiesenen Polymorphismen in der nicht kodierenden Region der mCAR mRNA lokalisiert sind als auch die Übereinstimmung der Sequenzen bei jeweils einem CVB3 sensiblen sowie resistenten Tier legen den Schluss nahe, dass die nachgewiesenen Veränderungen in der mCAR mRNA Sequenz bei den untersuchten Mausstämmen keinen wesentlichen Einfluss auf die Entwicklung einer Myokarditis haben.

Aber auch beim Menschen scheinen Mutationen im hCAR Gen keine entscheidende Rolle in der Pathogenese der Myokarditis bzw. DCM zu spielen. In einer Studie von Bowles *et al.* (2002) ergab die Analyse des hCAR Gens von Patienten mit Myokarditis bzw. DCM zwar auch diverse Polymorphismen, aber keine Mutationen, die für die Entwicklung einer Myokarditis von Bedeutung sein könnten.

4.2.4 Vergleich der mCAR mRNA Expression im Herzen verschiedener Mausarten

Die Empfänglichkeit für eine Virusinfektion unterliegt einer multigenetischen Kontrolle, die sowohl spezifische Gene mit der Bezeichnung H2 des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) als auch nicht MHC assoziierte Gene einbezieht (Wolfgram *et al.*, 1986). So wird die CVB3 induzierte Myokarditis u. a. durch unterschiedliche H2 Allele kontrolliert. Mausstämme mit dem Allel H2d (DBA/2 und Balb/c) entwickeln eine schwere Myokarditis, während bei Maustämmen mit dem Allel H2b (C57/Bl6) nur eine unbedeutende Myokarditis auftritt. Mäuse, die das Allel H2k (CBA) besitzen, variieren hingegen sehr stark in der Ausbildung einer CVB3 bedingten Myokarditis (Ruppert, 1995). Letzteres zeigt, dass auch andere, nicht MHC assoziierte Gene die Resistenz bzw. Sensitivität gegenüber CVB3 beeinflussen. Auch die Feststellung, dass Mäuse mit identischem H2 Haplotyp Unterschiede im Verlauf und Ausmaß einer CVB3 induzierten Myokarditis aufweisen können, bestätigt die Beteiligung weiterer Gene an der Kontrolle der Myokarditis-Empfänglichkeit (Wolfgram *et al.*, 1986).

Unterschiede in der genetisch determinierten Empfänglichkeit können auf verschiedene Faktoren, wie beispielsweise die An- oder Abwesenheit eines spezifischen Virusrezeptors an der Zelloberfläche, Art und Ausmaß der Immunantwort oder intrazelluläre Faktoren zurückgeführt werden (Wolfgram *et al.*, 1986).

Die Anwesenheit eines spezifischen Virusrezeptors an der Zelloberfläche stellt einen zentralen Faktor in der Viruspathogenese dar, da ohne einen entsprechenden Rezeptor ein Eindringen des Virus in die Zielzelle nicht möglich ist (Poller *et al.*, 2002). Die Anzahl des Rezeptors auf der Zelle beeinflusst dabei sowohl die Virusreplikation als auch die virusinduzierte Zellyse. Je größer die Anzahl von Virusrezeptoren auf der Zelloberfläche, desto mehr Virus gelangt in die Zelle und desto schneller erfolgt die Zellyse und damit die Virusausbreitung (Ruppert, 1995).

Die Anwesenheit von und insbesondere die Anzahl des Rezeptors auf der Zelloberfläche scheint somit eine wichtige Determinante für die Empfindlichkeit gegenüber einer Virusinfektion darzustellen, wobei eine erhöhte Expression des Rezeptors als ein prädisponierender Faktor für eine erhöhte Virusempfindlichkeit anzusehen ist.

Der Coxsackievirus-Adenovirus Rezeptor (CAR) fungiert u. a. als Hauptrezeptor für alle 6 Serotypen der Coxsackie B Viren und vermittelt sowohl die Bindung als auch die Internalisierung der Viren. Neben Gehirn, Leber und Pankreas weist das Herz die höchste Expression von CAR auf, was wiederum mit der bekannten Empfindlichkeit dieser Organe gegenüber CVB3 korreliert (Tomko *et al.*, 1997, Bergelson *et al.*, 1998). Ebenso findet sich eine Übereinstimmung zwischen der altersabhängigen Regulation von CAR und der entsprechenden altersabhängigen CVB3 Empfindlichkeit diverser Organe. CVB3 zeigt dabei eine erhöhte Affinität zu unreifem Gewebe, welches wiederum die höchste CAR Expression aufweist (Honda *et al.*, 2000, Tomko *et al.*, 1997, Bergelson *et al.*, 1998).

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob die Expression des CVB3 spezifischen Rezeptors CAR einen Einfluss auf die unterschiedliche Myokarditis-Empfänglichkeit von virussensitiven und -resistenten Mausarten haben könnte. Beim Vergleich der mCAR Expression im Herzen der vier Mausarten zeigten sich deutliche Unterschiede im Expressionslevel von CAR. Eine mögliche Übereinstimmung zwischen der Expression von mCAR und der Empfindlichkeit gegenüber CVB3 konnte bei den Mausstämmen DBA/2 und C57/Bl6 festgestellt werden. Die CVB3 sensible DBA/2-Maus wies dabei im Herzgewebe eine im Vergleich zur CVB3 resistenten C57/Bl6-Maus signifikant höhere mCAR Expression auf (Faktor: 1,5).

Aber nicht bei allen Mausarten korrelierte die mCAR Expression mit der bekannten Empfindlichkeit. Während die CVB3 sensible Balb/c-Maus eine ähnlich geringe mCAR Expression aufwies wie die CVB3 resistente C57/Bl6-Maus, zeigte die CVB3 resistente CBA-Maus von allen vier Mausstämmen die höchste Expression.

Da nicht nur im Herzgewebe, sondern auch in Kardiomyozytenkulturen ohne den Einfluss des Immunsystems eine unterschiedliche CVB3 Empfänglichkeit bei den verschiedenen Mausarten nachgewiesen werden konnte (Ruppert, 1995), wurde zusätzlich zum Herzgewebe auch die mCAR Expression in isolierten Kardiomyozyten der DBA/2- und C57/Bl6-Maus untersucht. Auch dabei wurde ein Expressionsunterschied zwischen den beiden Mausarten festgestellt, der gut mit dem zuvor nachgewiesenen mCAR Expressionsunterschied im Herzgewebe korrelierte. Die mCAR Expression der DBA/2-Maus lag hierbei ungefähr um den Faktor 1,4 höher als bei der C57/Bl6-Maus.

Insgesamt legen die Ergebnisse nahe, dass die mCAR Expression nur bei einigen Mausstämmen (DBA/2 und C57/Bl6) als eine mögliche Determinante für die CVB3 Empfindlichkeit in Frage kommen könnte. Bei den Mausstämmen CBA und Balb/c scheinen andere Faktoren einen größeren Einfluss auf die Empfänglichkeit zu haben.

So spielt das Immunsystem ebenfalls eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der CVB3 induzierten Myokarditis. Art und Ausmaß der Immunantwort sind dabei weitere wichtige genetisch determinierte Faktoren, die die Empfänglichkeit für eine CVB3 induzierte Myokarditis beeinflussen. Es konnte wiederholt gezeigt werden, dass die Immunantwort zum Teil erhebliche Unterschiede bei den verschiedenen Maustämmen aufweist.

Studien von Huber und Lodge *et al.* (1986, 1987, 1997) stellten Unterschiede in der Immunantwort der beiden CVB3 sensiblen Mausstämmen DBA/2 und Balb/c (beide H2d) fest. Während bei Balb/c-Mäusen in erster Linie CD8+ zytotoxische T-Zellen für die kardialen Schäden im Rahmen einer CVB3 induzierten Myokarditis verantwortlich sind, dominieren bei DBA/2-Mäusen CD4+ T-Helfer-Zellen. Weiterhin zeigen DBA/2-Mäuse nach einer CVB3 Infektion ausgeprägte Ablagerungen von autoreaktiven IgG-Antikörper im Myokard, die bei Balb/c-Mäusen nicht nachweisbar sind. Auch eine Depletion von Komplementfaktoren durch Kobragift führt bei DBA/2-Mäusen zu einer deutlichen Abschwächung der Myokarditis, zeigt aber bei Balb/c-Mäusen keinen Effekt. Diese Beobachtungen zeigen, dass bei Balb/c-Mäusen in erster Linie zelluläre Immunmechanismen (CD8+ zytotoxische T-Zellen) für die kardialen Schäden verantwortlich sind, während bei DBA/2-Mäusen humorale Faktoren (herzspezifische IgG-Antikörper) eine wichtige Rolle spielen (zellulär (CD4+) vermittelte humorale Immunantwort).

Auch die Aktivierung unterschiedlicher $\gamma\delta$ -T-Zell-Populationen im Rahmen der Immunantwort scheint einen Einfluss auf die Resistenz bzw. Sensitivität gegenüber einer CVB3 induzierten Myokarditis zu haben. CVB3 resistente C57/Bl6-Mäuse zeigen nach einer CVB3 Infektion eine Aktivierung von V γ 1+ T-Zellen, die über eine Beeinflussung der TH2-Antwort eine Unterdrückung der Myokarditis bewirken (Huber *et al.*, 2000b, 2001).

Bei CVB3 sensiblen Balb/c-Mäusen kommt es hingegen nach der Infektion zur Stimulierung V γ 4+ T-Zellen mit nachfolgender Induktion der TH1-Antwort, die über

eine Aktivierung autoimmuner CD8⁺ zytotoxischer T-Zellen zur Verstärkung der Myokarditis beiträgt (Huber *et al.*, 2001, 2002, 2003).

Dies zeigt, dass die Myokarditis-Empfänglichkeit u. a. auch von der Art der aktivierten $\gamma\delta$ -T-Zell-Subpopulation und somit der TH-Antwort abhängt. Die Art der $\gamma\delta$ -T-Zell-Antwort und damit die Empfänglichkeit für eine CVB3 bedingte Myokarditis wird dabei durch unterschiedliche MHC Klasse II Haplotypen (IA, IE) kontrolliert (IA-> V γ 1+> TH2-> Resistenz; IE-> V γ 4+> TH1-> Sensitivität) (Huber *et al.*, 1999b, 2000b).

Weiterhin weisen CVB3 resistente C57/Bl6-Mäuse eine im Vergleich zu CVB3 sensiblen Balb/c-Mäusen beschleunigte Viruselimination aus dem Herzen auf, die von einer starken virusspezifischen IgG-Antwort begleitet wird. Balb/c-Mäuse zeigen hingegen nach einer CVB3 Infektion nur eine schwache IgG-, dafür aber eine starke IgM-Antwort (Leipner *et al.*, 2004). Für die Viruselimination scheinen somit insbesondere virusspezifische IgG-Antikörper eine wichtige Rolle zu spielen, wobei die Schnelligkeit des Auftretens neutralisierender Antikörper (AK) und damit die Geschwindigkeit der Viruselimination einen Einfluss auf die Myokarditis-Empfänglichkeit haben. Je schneller die Viruselimination durch neutralisierende Antikörper erfolgt, desto größer die Resistenz, da das Virus noch vor dem Auftreten von kardialen Schäden aus dem Herzen entfernt wird (Wolfgram *et al.*, 1986, Leipner *et al.*, 2004).

Neben der Immunantwort stellen auch intrazelluläre Faktoren eine weitere wichtige Determinante dar, die die Virusempfänglichkeit beeinflussen kann. Dabei kann das Fehlen von Enzymen, die für die Virusreplikation benötigt werden, ebenso von Bedeutung sein, wie das Vorliegen von Proteinen, die mit der viralen RNA interagieren und somit zur Regulation der Replikation oder Translation beitragen. In einer aktuellen Studie von Cheung *et al.* (2005) wurde das Vorliegen von Maus-Protein - Virus-RNA Interaktionen mit der CVB3 Empfindlichkeit verschiedener Gewebe verglichen. Dabei zeigte sich, dass die Resistenz mancher Organe wie z. B. der Niere oder des adulten Herzen gut mit dem Vorliegen derartiger Protein-RNA-Komplexe korreliert. Die Maus-Proteine interagieren mit der 5'NCR der viralen RNA, wobei insbesondere solche Regionen betroffen sind, die sog. „internal ribosome entry sites“ (IRES) enthalten. Die 5'NCR spielt über die IRES eine wichtige Rolle für die Initiation der Translation sowie für die virale Replikation. Die Interaktion von Proteinen mit der 5'NCR kann daher zur Beeinflussung der Replikation und/oder Translation beitragen (Cheung *et al.*, 2005).

Die Schnelligkeit der Zellyse wird durch die Anzahl der Viruspartikel bestimmt. Wird eine bestimmte Menge an Partikeln erreicht, erfolgt die Zerstörung der Zelle. Bei Enteroviren stellt dieser Vorgang einen recht ineffizienten Prozess dar, da eine sehr große Anzahl von Viruspartikeln benötigt wird, um die Zelle zu lysieren (Woodruff, 1980). Durch eine Beeinträchtigung der Replikation und/oder Translation durch oben genannte Mechanismen würden daher weniger Viruspartikel produziert werden, wodurch die Lyse der Zelle sehr viel langsamer oder gar nicht erfolgt.

Diese Form des Resistenzmechanismus könnte beispielsweise auch bei CBA-Mäusen eine wichtige Rolle spielen. CBA-Mäuse sind CVB3 resistent, weisen aber dennoch von allen untersuchten Tieren die höchste mCAR Expression auf. Aufgrund der fehlenden Korrelation von mCAR Expression und CVB3 Empfänglichkeit wäre es daher denkbar, dass die Resistenz dieser Tiere durch „post-virus-entry“ Mechanismen bzw. intrazelluläre Faktoren hervorgerufen wird. Trotz einer großen Anzahl von virusspezifischen Rezeptoren (CAR) auf der Zelloberfläche und damit einhergehender erhöhter Virusaufnahme in die Zellen könnte somit über die Beeinflussung der Replikation und/oder Translation durch Protein-RNA Interaktionen oder durch das Fehlen von Enzymen eine Resistenz erzeugt werden.

Weitere Untersuchungen konnten in nicht infizierten CBA-Mäusen eine signifikant höhere NK-Zell-Aktivität im Vergleich zur DBA/2-Maus nachweisen. Während einer Infektion mit CVB3 stieg die NK-Zell-Aktivität bei beiden Mausstämmen ähnlich stark an. Eine Stimulation der NK-Zellen führte zu einer deutlichen Abnahme der Viruskonzentration im Herzen sowie zu einer Reduktion der myokardialen Entzündung (Gauntt *et al.*, 1985). Den NK-Zellen scheint daher eine eher protektive Funktion im Rahmen der CVB3 induzierten Myokarditis zuzukommen. Eine initial erhöhte NK-Zell-Aktivität bei CBA-Mäusen könnte somit zu einer beschleunigten Viruselimination aus dem Herzen und damit zur Resistenz beitragen (Ruppert, 1995).

Da auch Zellen und Gewebe durch CVB3 infiziert werden können, die kein oder nur wenig CAR exprimieren (Mena *et al.*, 1999) und da durch die Blockade von CAR mit monoklonalen Antikörpern eine CVB3 Infektion oftmals nicht komplett gehemmt werden kann (Orthopoulos *et al.*, 2004), müssen zusätzlich CAR unabhängige Mechanismen der Virusbindung und -aufnahme existieren.

Es ist bekannt, dass CVB3 neben CAR auch den Komplement-regulierenden Decay-Accelerating Factor (DAF, CD55) als Co-Rezeptor benutzen (Bergelson *et al.*, 1995,

Shafren *et al.*, 1995). Man geht davon aus, dass CAR und DAF eng miteinander assoziiert sind und in Form eines Rezeptorkomplexes miteinander interagieren. Während CAR sowohl die Bindung als auch die Internalisierung von CVB vermittelt, ist DAF jedoch nur an der Virusbindung beteiligt (Shafren *et al.*, 1995). Dennoch scheint dem Co-Rezeptor eine wichtige Funktion zuzukommen, da durch DAF die Bindung von CVB3 an den DAF-CAR Rezeptorkomplex signifikant verstärkt wird, wodurch wiederum die Virusinternalisierung durch CAR erhöht werden kann (Liu *et al.*, 2000). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass das Fehlen bzw. die Blockade von DAF zu einer Reduktion der Infizierbarkeit von HeLa-Zellen führt (Martino *et al.*, 1998). Die Effizienz der Virusbindung und -aufnahme ist somit auch von der Anwesenheit des Co-Rezeptors DAF abhängig (Liu *et al.*, 2000). Dies lässt vermuten, dass neben CAR auch die Expression von DAF eine Determinante darstellen könnte, die die Virusempfänglichkeit beeinflusst. Eine Studie von Spiller *et al.* (2000) stellte jedoch fest, dass CVB nur an den humanen nicht aber an den murinen DAF Rezeptor binden, so dass DAF zumindest bei Mäusen doch keine allzu große Rolle als Determinante für die Virusempfänglichkeit spielen dürfte.

Weiterhin zeigte eine Untersuchung von Orthopoulos *et al.* (2004), dass für die Infektion von humanem kardialem Gewebe neben CAR und DAF noch weitere Rezeptoren eine Rolle spielen müssen. Sowohl die selektive als auch kombinierte Blockade von CAR und DAF durch monoklonale Antikörper konnte keine komplette Hemmung der Bindung und Internalisierung von CVB3 bewirken. Des Weiteren konnten neben CAR und DAF fünf weitere Zelloberflächenproteine identifiziert werden, die mit CVB3 interagieren, so dass davon auszugehen ist, dass zur Infektion von humanem kardialem Gewebe zusätzliche Rezeptoren benötigt werden. Um welche Rezeptoren es sich dabei handelt, ist allerdings noch unbekannt. Neben CAR und DAF werden auch Nukleolin (Raab de Verdugo *et al.*, 1995), Heparansulfat (Zautner *et al.*, 2003) und C3 (Mena *et al.*, 1999) mit der Bindung und ggf. auch Internalisierung von CVB3 in Verbindung gebracht. Inwieweit diese Faktoren jedoch tatsächlich eine Rolle bei einer CVB3 Infektion spielen, ist allerdings noch unklar. Es wäre denkbar, dass auch bei den verschiedenen Mausarten eine unterschiedliche Rezeptornutzung im Herzen besteht, so dass bei manchen Tieren neben CAR noch andere Rezeptoren an der Virusbindung und -internalisierung beteiligt sind.

Auch die Möglichkeit der posttranslationalen Regulation von CAR sollte in Betracht gezogen werden. In den meisten Studien wurde die Expression von CAR in erster Linie auf mRNA Ebene nachgewiesen. Eine Studie von Honda *et al.* (2000) zeigte jedoch, dass in der Niere trotz Nachweis einer mCAR mRNA Expression keine Expression des mCAR Proteins festgestellt werden konnte, so dass nicht zwangsläufig von der mRNA Expression auf die tatsächliche Proteinexpression geschlossen werden kann. Die möglicherweise in der Niere vorhandene posttranslationale Regulation mit daraus resultierender reduzierter Expression des CAR Proteins würde mit der relativen Resistenz dieses Organs gegenüber CVB3 korrelieren.

Es wäre denkbar, dass eine posttranslationale Regulation auch im Herzen der verschiedenen Mausarten (z. B. CBA) einen Einfluss auf die tatsächliche CAR Expression und somit auf die Empfänglichkeit haben könnte.

In einer Studie von Ito *et al.* (2000) konnte gezeigt werden, dass es im Rahmen einer myosininduzierten autoimmunen Myokarditis bei Ratten zu einer Induktion von CAR kommt, die vermutlich durch inflammatorische Mediatoren ausgelöst wird. Da das Immunsystem auch bei der CVB3 bedingten Myokarditis eine zentrale Rolle in der Pathogenese einnimmt, wäre es denkbar, dass auch hier eine CAR Induktion durch das aktivierte Immunsystem hervorgerufen werden kann. Die vermehrte Expression von CAR könnte dann wiederum zu einer erhöhten Virusaufnahme führen und damit zu einer Verstärkung der Myokarditis beitragen. Es wäre somit möglich, dass die Myokarditis-Empfänglichkeit auch durch das Ausmaß der CAR Induktion im Verlauf einer CVB3 Infektion beeinflusst wird und dass eine solche Induktion bei den verschiedenen Mausarten unterschiedlich stark ausgeprägt ist.

Auch bei Patienten mit dilatierender Kardiomyopathie (DCM) konnte im Vergleich zu gesunden Probanden eine deutlich erhöhte CAR Expression im Myokard nachgewiesen werden (Noutsias *et al.*, 2001, Selinka *et al.*, 2004, Sasse *et al.*, 2003). Dabei wird vermutet, dass die starke CAR Expression bei DCM Patienten wenigstens zum Teil genetisch determiniert ist und somit direkt in die Pathogenese dieser Erkrankung involviert zu sein scheint, indem durch die ausgeprägte CAR Expression im Myokard die Anfälligkeit für kardiale Virusinfektionen und somit für die Entwicklung einer Myokarditis bzw. DCM deutlich erhöht wird (Poller *et al.*, 2002). Die Höhe der CAR Expression scheint somit auch in diesem Fall einen prädisponierenden Faktor für eine erhöhte Virusempfindlichkeit darzustellen.

Trotz der Tatsache, dass die Expression von CAR nicht immer mit der Empfindlichkeit gegenüber einer CVB3 induzierten Myokarditis korreliert und dass neben CAR noch andere Faktoren (zusätzliche Rezeptoren, Immunsystem, intrazelluläre Faktoren etc.) die genetisch determinierte Empfindlichkeit beeinflussen, sollte die Bedeutung von CAR im Rahmen der CVB3 Pathogenese dennoch nicht unterschätzt werden.

Aktuelle Untersuchungen von Werk *et al.* (2005) stellten fest, dass eine Inhibition der CAR Expression durch interferierende RNA (siRNA) zu einer deutlichen Reduktion des Virustiters bzw. der Virusvermehrung in HeLa-Zellkulturen führt (um ca. 60%). Auch eine Untersuchung von Ruppert *et al.* (2005) weist auf einen Zusammenhang zwischen der CAR Expression und der Infizierbarkeit von HeLa-Zellen hin. Dabei zeigte sich, dass die Down-Regulation von CAR durch sog. „Gene silencing“ mit einer Reduktion des zytopathischen Effekts und damit erhöhtem Überleben von HeLa-Zellen nach einer CVB3 Infektion einhergeht. Umgekehrt konnte in einer Studie von Noutsias *et al.* (2001) gezeigt werden, dass die rekombinante Expression von hCAR in Kardiozytenkulturen der Ratte zu einer starken Zunahme der Virusaufnahme in die Zelle führt.

Die Expression von CAR in den verschiedenen Organen ist auch im Hinblick auf therapeutische Interventionen von Bedeutung. Neben den Coxsackie B Viren nutzen auch verschiedene Adenoviren CAR als Hauptrezeptor. Adenoviren werden zunehmend als Vektoren für den therapeutischen Gentransfer eingesetzt. Die Möglichkeit diese Vektoren in das entsprechende Zielgewebe einzubringen, hängt daher auch von der Anwesenheit und Anzahl des spezifischen Rezeptors CAR auf den Zielzellen ab.

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass die Expression von CAR sowohl *in vivo* als auch *in vitro* eine wichtige Determinante für die Effizienz des Adenovirus vermittelten Gentransfers darstellt (Hemminki *et al.*, 2003). Eine Studie von Nalbantoglu *et al.* (2001) stellte beispielsweise fest, dass die normalerweise geringe Effizienz des Adenovirus vermittelten Gentransfers in adultes Muskelgewebe aufgrund der niedrigen CAR Expression durch eine muskelspezifische Hochregulation von CAR deutlich verbessert werden kann, wodurch die Bedeutung der CAR Expression auch für Infektionen bzw. für den therapeutischen Gentransfer mit Adenoviren deutlich wird.

Die Beobachtung, dass in Kardiomyozytenkulturen auch ohne den Einfluss des Immunsystems ähnliche Unterschiede in der Empfindlichkeit gegenüber CVB3 bei den verschiedenen Mausarten nachgewiesen werden konnten wie *in vivo* (Ruppert, 1995),

zeigt ebenfalls, dass neben dem Immunsystem auch andere Faktoren wie beispielsweise die Expression von CAR einen wesentlichen Einfluss auf die CVB3 Empfindlichkeit haben müssen.

Auch wenn wiederholt gezeigt werden konnte, dass die Expression von CAR nicht die einzige Determinante für die Empfindlichkeit gegenüber CVB3 darstellt, so zeigen diese Studien dennoch, dass die CAR Expression einen nicht unbedeutenden Einfluss auf die Infizierbarkeit und damit auch auf Empfindlichkeit von Zellen bzw. Geweben hat.

Mit der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die verschiedenen Mausstämme zwar Unterschiede in der CAR Expression im Herzen aufweisen, dass aber das Ausmaß der Expression von CAR nicht bei allen Tieren mit der bekannten CVB3 Empfindlichkeit korreliert. Während nur bei der DBA/2- und C57/Bl6-Maus eine mögliche Korrelation zwischen der CAR Expression und der CVB3 Empfindlichkeit nachgewiesen werden konnte, wiesen die anderen beiden Mausstämme (CBA und Balb/c) keine Übereinstimmung auf, so dass insbesondere bei diesen Tieren davon auszugehen ist, dass die genetisch determinierte Empfindlichkeit in erster Linie von anderen Faktoren abhängig ist. Aber auch bei DBA/2- und C57/Bl6-Mäusen spielen neben der CAR Expression vermutlich noch zusätzliche Faktoren als Determinanten für die Myokarditis-Empfänglichkeit eine Rolle.

Die Unterschiede in der Myokarditis-Empfänglichkeit der verschiedenen Mausstämme können somit nicht allein auf Unterschiede in der CAR Expression zurückgeführt werden. Vielmehr scheint die Empfänglichkeit für eine CVB3 induzierte Myokarditis durch ein komplexes Zusammenwirken verschiedenster Faktoren bestimmt zu werden, wobei bei den verschiedenen Mausarten vermutlich jeweils unterschiedliche Mechanismen im Vordergrund stehen. Während bei den Mausstämmen DBA/2 und C57/Bl6 neben der Immunantwort auch die Expression von CAR eine wichtige Determinante für die Myokarditis-Empfänglichkeit darzustellen scheint, spielt die Expression von CAR bei den Mausarten CBA und Balb/c vermutlich eine eher untergeordnete Rolle. Die Myokarditis-Empfänglichkeit dieser Tiere wird möglicherweise stärker von intrazellulären Faktoren (CBA) sowie Immunmechanismen (Balb/c) bestimmt.

5. Zusammenfassung

Verschiedene Inzucht-Mausstämme weisen eine unterschiedliche Empfänglichkeit für eine CVB3 induzierte Myokarditis auf. Während die Mausstämme DBA/2 und Balb/c nach der Inokulation von CVB3 eine schwere Myokarditis entwickeln, zeigen die Stämme C57/B16 und CBA nur eine unbedeutende Myokarditis mit geringen kardialen Läsionen. Auch in einer Studie, in der die Wirkung von CVB3 auf isolierte Kardiomyozyten verschiedener Mausarten untersucht wurde, konnten ähnliche Unterschiede in der CVB3 Empfänglichkeit nachgewiesen werden.

Eine Reihe von Faktoren wie Alter, Geschlecht, Ernährung und Hormonstatus können die CVB3 Empfänglichkeit beeinflussen, wobei insbesondere den genetischen Faktoren eine entscheidende Rolle zukommt. Unterschiede in der genetisch determinierten Empfänglichkeit können dabei u. a. auf die An- oder Abwesenheit eines virusspezifischen Rezeptors an der Zelloberfläche, Art und Ausmaß der Immunantwort sowie auf verschiedene intrazelluläre Faktoren zurückgeführt werden.

Spezifische Virusrezeptoren nehmen eine zentrale Rolle in der Viruspathogenese ein, da ohne einen entsprechenden Rezeptor ein Eindringen des Virus in die Zielzelle in der Regel nicht möglich ist. Die Anwesenheit von und insbesondere die Anzahl der Virusrezeptoren auf der Zielzelle wird daher als eine wichtige Determinante für die Empfänglichkeit gegenüber einer Virusinfektion angesehen, wobei eine erhöhte Expression des Rezeptors einen prädisponierenden Faktor für eine erhöhte Virusempfindlichkeit darstellt.

Der Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptor (CAR) dient u. a. als Hauptrezeptor für alle 6 Serotypen der Coxsackie B Viren und vermittelt sowohl die Bindung als auch Internalisierung der Viren.

Mit der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob Mutationen in der mRNA Sequenz sowie Unterschiede in der Expression des Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptors (CAR) vorliegen, die einen möglichen Einfluss auf die Myokarditis-Empfänglichkeit von virussensitiven und -resistenten Mausarten haben könnten.

Zuvor wurde die Expression der mCAR mRNA in verschiedenen Organen der C57/B16-Maus untersucht, wobei der Schwerpunkt anschließend auf einen Expressionsvergleich zwischen Herz- und Skelettmuskulatur gelegt wurde. Beim Vergleich der mCAR mRNA Expression in den verschiedenen Organen der Maus konnten ausgeprägte

Expressionsunterschiede nachgewiesen werden, die teilweise mit dem bekannten Gewebetropismus von CVB3 korrelieren. Leber, Niere und Herz wiesen dabei eine deutlich höhere mCAR Expression auf als Lunge, Milz und Skelettmuskel. Auch beim Vergleich der mCAR Expression in der Herz- und Skelettmuskulatur von DBA/2- und C57/Bl6-Mäusen zeigte sich, dass das Herz bei beiden Mausarten eine deutlich höhere mCAR Expression aufwies als der Skelettmuskel, was ebenfalls mit der bekannten CVB3 Empfindlichkeit dieser Organe übereinstimmt. Es fanden sich jedoch nicht nur Unterschiede zwischen den verschiedenen Muskelgeweben, sondern auch zwischen den beiden Mausarten, wobei im Skelettmuskel der DBA/2-Maus eine höhere mCAR Expression nachgewiesen werden konnte als im Skelettmuskel der C57/Bl6-Maus.

Die Analyse der mCAR mRNA Sequenz bei den verschiedenen Mausarten ergab zwei Polymorphismen, die jeweils mit dem Austausch einer einzelnen Base einhergehen (A/T und A/G) und in der nicht-kodierenden Region der mCAR mRNA lokalisiert sind. In beiden Fällen fand sich eine Sequenzübereinstimmung bei jeweils einem CVB3 sensiblen sowie resistenten Mausstamm (DBA/2 und CBA sowie C57/Bl6 und Balb/c), so dass davon auszugehen ist, dass die nachgewiesenen Veränderungen in der mCAR mRNA Sequenz keinen allzu großen Einfluss auf die Myokarditis-Empfänglichkeit der verschiedenen Mausarten haben dürften.

Die Untersuchung der mCAR mRNA Expression im Herzgewebe sowie in isolierten Kardiomyozyten der verschiedenen Mausarten ergab ebenfalls deutliche Expressionsunterschiede. Allerdings korrelierte die nachgewiesene mCAR Expression nicht bei allen Tieren mit der bekannten CVB3 Empfänglichkeit. Lediglich bei der CVB3 sensiblen DBA/2- und CVB3 resistenten C57/Bl6-Maus konnte eine mögliche Übereinstimmung nachgewiesen werden, wobei die mCAR Expression der DBA/2-Maus ungefähr um den Faktor 1,5 höher lag als bei der C57/Bl6-Maus. Die CVB3 sensible Balb/c-Maus wies hingegen eine ähnlich geringe mCAR Expression auf wie die CVB3 resistente C57/Bl6-Maus, während die CVB3 resistente CBA-Maus von allen vier Mausstämmen die höchste mCAR Expression zeigte.

Die Ergebnisse legen nahe, dass die mCAR Expression lediglich bei den Mausstämmen DBA/2 und C57/Bl6 als eine mögliche Determinante für die Myokarditis-Empfänglichkeit in Frage kommt, während bei den Mäusen CBA und Balb/c vermutlich andere Faktoren wie beispielsweise die Immunantwort, verschiedene intrazelluläre

Faktoren oder das Vorliegen zusätzlicher Rezeptoren einen größeren Einfluss auf die Empfänglichkeit haben.

Insgesamt scheint die Myokarditis-Empfänglichkeit einer komplexen Regulation zu unterliegen, wobei bei den verschiedenen Mausarten vermutlich jeweils unterschiedliche Mechanismen im Vordergrund stehen.

Literaturverzeichnis

Aretz H.T., Billingham M.E., Edwards W.D., Factor S.M., Fallon J.T., Fenoglio J.J. Jr., Olsen E.G., Schoen F.J.:

Myocarditis: a histopathologic definition and classification.
Am. J. Cardiovasc. Pathol. (1987), **1**: 3-14

Asher D.R., Cerny A. M., Weiler S.R., Horner J.W., Keeler M.L., Neptune M.A., Jones S.N., Bronson R.T., DePinho R.A., Finberg R.W.:

Coxsackievirus and adenovirus receptor is essential for cardiomyocyte development.
Genesis (2005), **42**: 77-85

Baboonian C., Davis M.J., Booth J., McKenna W.:

Coxsackie B viruses and heart disease.
Curr. Top. Microbiol. Immunol. (1997), **223**: 31-52

Bergelson J.M., Mohanty J.G., Crowell R.L., St. John, N.F., Lublin D.M., Finberg R.W.:

Coxsackievirus B3 adapted to growth in RD cells binds to decay accelerating factor (CD55).
J. Virol. (1995), **69**: 1903-1906

Bergelson J.M., Cunningham J.A., Droguett G., Kurt-Jones E.A., Krithivas A., Hong J.S., Horwitz M.S., Crowell R.L., Finberg R. W.:

Isolation of a common receptor for coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5.
Science (1997), **275**: 1320-1323

Bergelson J.M., Krithivas A., Celi L., Droguett G., Horwitz M.S., Wickam T., Crowell R.L., Finberg R.W.:

The murine CAR homolog is a receptor for coxsackie B viruses and adenoviruses.
J. Virol. (1998), **72**: 415-419

Bowles K.R., Gibson J., Wu J., Shaffer L.G., Towbin J.A., Bowles N.E.:
Genomic organization and chromosomal localization of the human coxsackievirus B-
adenovirus receptor gene.
Hum. Genet. (1999), **105**: 354-359

Bowles N.E., Fuentes-Garcia F.J., Makar K.A., Li H., Gibson J., Soto F., Schwimmbeck
P.L., Schultheiss H.-P., Pauschinger M. :
Analysis of the coxsackievirus B-adenovirus receptor gene in patients with myocarditis
or dilated cardiomyopathy.
Molecular Genetics and Metabolism (2002), **77**: 257-259

Caforino A.L., Goldman J.H., Haven A.J., Baig K.M., McKenna W.J.:
Evidence for autoimmunity to myosin and other heart-specific autoantibodies in patients
with dilated cardiomyopathy and their relatives.
Int. J. Cardiol. (1996), **54**:157-163

Caggana M., Chan P., Ramsingh A.:
Identification of a single amino acid residue in the capsid protein VP1 of
Coxsackievirus B4 that determines the virulent phenotype.
J. Virol. (1993), **67**: 4797-4803

Carson S.D., Chapman N.N., Tracy S.M.:
Purification of the putative coxsackievirus B receptor from HeLa cells.
Biochem. Biophys. Res. Commun. (1997), **233**: 325-328

Carson S.D., Hobbs J.T., Tracy S.M., Chapman N.M.:
Expression of the coxsackievirus and adenovirus receptor in cultured human umbilical
vein endothelial cells: regulation in response to cell density.
J. Virol. (1999), **73**: 7077-7079

Carson S.D.:
Receptor for the group B coxsackieviruses and adenoviruses: CAR.
Rev. Med. Virol. (2001), **11**: 219-226

Carson S.D., Chapman N.M.:

Coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR) binds immunoglobulins.

Biochemistry (2001), **40**: 14324-14329

Chen J.-W., Ghosh R., Finberg R.W., Bergelson J.M.:

Structure and chromosomal localization of the murine coxsackievirus and adenovirus receptor gene.

DNA and Cell Biology (2003), **22**: 253-259

Chen J.-W., Zhou B., Yu Q.-C., Shin S.J., Jiao K., Schneider M.D., Baldwin H.S., Bergelson J.M.:

Cardiomyocyte-specific deletion of the coxsackievirus and adenovirus receptor results in hyperplasia of the embryonic left ventricle and abnormalities of sinuatrial valves.

Circ. Res. (2006), **98**: 923-939

Cheung P.K.-M., Yuan J., Zhang H.M., Chau D., Yanagawa B., Suarez A., McManus B., Yang D.:

Specific interactions of mouse organ proteins with the 5' untranslated region of coxsackievirus B3: potential determinants of viral tissue tropism.

J. Med. Virol. (2005), **77**:414-424

Chow L.H., Gauntt C.J., McManus B.M.:

Differential effects of myocarditic variants of coxsackievirus B3 in inbred mice. A pathologic characterization of heart tissue damage.

Lab. Invest. (1991), **64**: 55-64

Chow L.H., Beisel K.W., McManus B.M.:

Enteroviral infection of mice with severe combined immunodeficiency.

Lab. Invest. (1992), **66**: 24-31

Cohen C.J., Shieh J.T.C., Pickles R.J., Okegawa T., Hsieh J.-T., Bergelson J.M.:

The coxsackievirus and adenovirus receptor is a transmembrane component of the tight junction.

Med. Sci. (2001), **98**: 15191-15196

Cooper L., Berry G., Shabetai R.:

Idiopathic giant-cell myocarditis – natural history and treatment.

N. Engl. J. Med. (1997), **336**: 1860-1866

Dorner A.A., Wegmann F., Butz S., Wolburg-Buchholz K., Wolburg H., Mack A., Nasdala I., August B., Westermann J., Rathjen F.G., Vestweber D.:

Coxsackievirus-adenovirus receptor (CAR) is essential for early embryonic cardiac development.

J. Cell Sci. (2005), **118**: 3509-3521

Dunn J.J., Chapman N.M., Tracy S., Romero J.R.:

Genomic determinants of cardiovirulence in coxsackievirus B3 clinical isolates: localization to the 5' nontranslated region.

J. Virol. (2000), **74**: 4787-4794

Dunn J.J., Bradrick S.S., Chapman N.M., Tracy S.M., Romero J.R.:

The stem loop II within the 5' nontranslated region of clinical coxsackievirus B3 genomes determines cardiovirulence phenotype in a murine model.

J. Infect. Dis. (2003), **187**: 1552-1561

Fechner H., Haack A., Wang H., Wang X., Eizema K., Pauschinger M., Schoemaker R., Veghel R., Houtsmuller A., Schultheiss H.P., Lamers J., Poller W.:

Expression of coxsackie adenovirus receptor and alpha-v-integrin does not correlate with adenovector targeting in vivo indicating anatomical vector barriers.

Gene Ther. (1999), **6**: 1520-1535

Fechner H., Noutsias M., Tschoepe C., Hinze K., Wang X., Escher F., Pauschinger M., Dekkers D., Vetter R., Paul M., Lamers J., Schultheiss H.-P., Poller W.:

Induction of coxsackievirus-adenovirus-receptor expression during myocardial tissue formation and remodeling: identification of a cell-to-cell contact-dependent regulatory mechanism.

Circulation (2003), **107**: 876-882

Feldman A.M., McNamara D.:

Myocarditis.

N. Engl. J. Med. (2000), **343**: 1388-1398

Gauntt C.J., Arizpe H.M., Kung J.T., Ogilvie K.K., Cheriyan T.:

Antimyocarditic activity of the guanine derivative BIOLF-70 in a coxsackievirus B3 murine model.

Antimicrob. Agents. Chemother. (1985), **27**: 184-191

Gebhard J.R., Perry C.M., Harkins S., Lane T., Mena I., Asensio V.C., Campbell I.L., Whitton J.L.:

Coxsackievirus B3-induced myocarditis. Perforin exacerbates disease, but plays no detectable role in virus clearance.

Am. J. Pathol. (1998), **153**: 417-428

Gomez R.M., Lopez Costa J.J., Pecci Saavedra G., Berria M.I.:

Ultrastructural study of cell injury induced by coxsackievirus B3 in pancreatic and cardiac tissues.

Medicina (B. Aires) (1993), **53**:300-6

Gulick T., Chung M.K., Pieper S.J., Lange L.G., Schreiner G.F.:

Interleukin 1 and tumor necrosis factor inhibit cardiac myocyte β -adrenergic responsiveness.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1989), **86**: 6753-6757

Harvala H., Kalimo H., Dahllund L., Santti J., Hughes P., Hyypiä T., Stanway G.:

Mapping of tissue tropism determinants in coxsackievirus genomes.

J. Gen. Virol. (2002), **83**: 1697-1706

Harvala H., Kalimo H., Bergelson J., Stanway G., Hyypiä T.:

Tissue tropism of recombinant coxsackieviruses in an adult mouse model.

J. Gen. Virol. (2005), **86**: 1897-1907

He Y., Chipman P.R., Howitt J., Bator C.M., Whitt M.A., Baker T.S., Kuhn R.J., Anderson C.W., Freimuth P., Rossmann M G.:

Interaction of coxsackievirus B3 with the full length coxsackievirus-adenovirus receptor.

Nature Structural Biology (2001), **8**: 874

Hemminki A., Kanerva A., Liu B., Wang M., Alvarez R.D., Siegal G.P., Curiel D.T.:

Modulation of coxsackievirus-adenovirus receptor expression for increased adenoviral transgene expression.

Cancer Research (2003), **63**:847-853

Henke A., Huber S., Stelzner A., Whitton J.L.:

The role of CD8+ T lymphocytes in coxsackievirus B3-induced myocarditis.

J. Virol. (1995), **69**: 6720-6728

Herzum M., Ruppert V., Küytz B., Jomaa H., Nakamura I., Maisch B.:

Coxsackievirus B3 infection leads to cell death of cardiac myocytes.

J. Mol. Cell Cardiol. (1994), **26**: 907-913

Honda T., Saitoh H., Masuko M., Katagiri-Abe T., Tominaga K., Kozakai I., Kobayashi K., Kumanishi T., Watanabe Y.G., Odani S., Kuwano R.:

The coxsackievirus-adenovirus receptor protein as a cell adhesion molecule in the developing mouse brain.

Mol. Brain Res. (2000), **77**: 19-28

Hotta Y., Honda T., Naito M., Kuwano R.:

Developmental distribution of coxsackie virus and adenovirus receptor localized in the nervous system.

Dev. Brain Res. (2003), **143** (1): 1-13

Huber S.A., Lodge P.A.:

Coxsackievirus B3-myocarditis in Balb/c mice. Evidence for autoimmunity to myocyte antigens.

Am. J. Pathol. (1984), **116**: 21-29

Huber S.A., Lodge P.A.:

Coxsackievirus B-3 myocarditis. Identification of different pathogenic mechanisms in DBA/2 and Balb/c mice.

Am. J. Pathol. (1986), **122** (2): 284-291

Huber S.A., Lodge P.A., Herzum M., Estrin M., Olszewski J.:

The role of T lymphocytes in the pathogenesis of coxsackievirus B3 myocarditis.

In: Kawai C., Abelmann W.H., eds. *Cardiomyopathy Update 1. Pathogenesis of Myocarditis and Cardiomyopathy. Recent Experimental and Clinical Studies.* University of Tokyo Press, Tokyo, (1987), 9-12.

Huber S., Polgar J., Moraska A., Cunningham M., Schwimbeck P., Schultheiss P.:

T lymphocyte response in CVB-induced murine myocarditis.

Scand. J. Infect. Dis. (Suppl.) (1993), **88**: 67-78

Huber S.A.:

Coxsackievirus-induced myocarditis is dependent on distinct immunopathogenic responses in different strains of mice.

Lab. Invest. (1997), **76**(5): 691-701

Huber S.A., Budd R.C., Rossner K., Newell M.K.:

Apoptosis in coxsackievirus B3-induced myocarditis and dilated cardiomyopathy.

Ann. NY Aca. Sci. (1999a), **887**: 181-190

Huber S.A., Stone J.E., Wagner D.H., Kupperman J., Pfeiffer L., David C., O'Brien R.L., Davis G.S., Newell M.K.:

$\gamma\delta$ +T cells regulate Major Histocompatibility Complex Class II (IA and IE)-dependent susceptibility to coxsackievirus B3-induced autoimmune myocarditis.

J. Virol. (1999b), **73**: 5630-5636

Huber S.A.:

T cells expressing the $\gamma\delta$ T cell receptor induce apoptosis in cardiac myocytes.

Cardiovasc. Res. (2000a), **45**: 579-587

Huber S.A., Graveline D., Newell M.K., Born W.K., O'Brien R.L.O.:

V γ 1+ T cells suppress and V γ 4+ T cells promote susceptibility to coxsackievirus B3-induced myocarditis in mice.

J. Immunol. (2000b), **165**: 4174-4181

Huber S.A., Graveline D., Born W.K., O'Brien R.L.:

Cytokine production by V γ +T-cell subsets is an important factor determining CD4+Th-cell phenotype and susceptibility of Balb/c mice to coxsackievirus B3-induced myocarditis.

J. Virol. (2001), **75**: 5860-5869

Huber S.A., Sartini D., Exley M.:

V γ 4+ T cells promote autoimmune CD8+ cytolytic T-lymphocyte activation in coxsackievirus B3-induced myocarditis in mice: role for CD4+Th1 cells.

J. Virol. (2002), **76**: 10785-10790

Huber S.A., Sartini D., Exley M.:

Role of CD1d in coxsackievirus B3-induced myocarditis.

J. Immunol. (2003), **170**: 3147-3153

Huber S.A., Sartini D.:

Roles of Tumor Necrosis Factor alpha (TNF- α) and the p55 TNF receptor in CD1d induction and coxsackievirus B3-induced myocarditis.

J. Virol. (2005a), **79**: 2659-2665

Huber S.A.:

Increased susceptibility of male Balb/c mice to coxsackievirus B3-induced myocarditis: role for CD1d.

Med. Microbiol. Immunol. (2005b), **194**: 121-127

Hyypiä T., Kallajoki M., Maaronen M., Stanway G., Kandolf R., Auvinen P., Kalimo H.:

Pathogenic differences between coxsackie A and B virus infections in newborn mice.

Virus Res. (1993), **27**: 71-78

Hyypiä T., Hovi T., Knowles N.J., Stanway G.:

Classification of enteroviruses based on molecular and biological properties.

J. Gen. Virol. (1997), **78**: 1-11

Ito M., Kodama M., Masuko M., Yamaura M., Fuse K., Uesugi Y., Hirono S., Okura Y., Kato K., Hotta Y., Honda T., Kuwano R., Aizawa Y.:

Expression of coxsackievirus and adenovirus receptor in hearts of rats with experimental autoimmune myocarditis.

Circ. Res. (2000), **86**: 275-280

Joo, C.H., Hong H.N., Kim E.O., Im J.O., Yoon S.-Y., Ye J.S., Moon M.S., Kim D., Lee H., Kim Y.K.:

Coxsackievirus B3 induces apoptosis in the early phase of murine myocarditis:

A comparative analysis of cardiovirulent and noncardiovirulent strains.

Intervirology (2003), **46**: 135-140

Kandolf R., Canu A., Hofschneider P.H.:

Coxsackie B3 virus can replicate in cultured human foetal heart cells and is inhibited by interferon.

J. Mol. Cell Cardiol. (1985), **17** (2): 167-181

Kashimura T., Kodama M., Hotta Y., Hosoya J., Yoshida K., Ozawa T., Watanabe R., Okura Y., Kato K., Hanawa H., Kuwano R., Aizawa Y.:

Spatiotemporal changes of coxsackievirus and adenovirus receptor in rat hearts during postnatal development and in cultured cardiomyocytes of neonatal rat.

Virchows Arch. (2004), **444**: 283-292

Kawai C.:

From myocarditis to cardiomyopathy: mechanisms of inflammation and cell death.

Circulation (1999), **99**: 1091-1100

Kim K.-S., Hufnagel G., Chapman N.M., Tracy S.:

The group B coxsackieviruses and myocarditis.

Rev. Med. Virol. (2001), **11**: 355-368

Kim M., Sumerel L.A., Belousova N., Lyons G.R., Carey D.E., Krasnykh V.:
The coxsackievirus and adenovirus receptor acts as a tumor suppressor in malignant glioma cells.

Br. J. Cancer (2003), **88**: 1411-1416

Klingel K., Hohenadl C., Canu A., Albrecht M., Seemann M., Mall G., Kandolf R.:
Ongoing enterovirus-induced myocarditis is associated with persistent heart muscle infection: Quantitative analysis of virus replication, tissue damage and inflammation.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992), **89**: 314-318

Knowlton K., Jeon E.S., Berkley N., Wessely R., Huber S.:

A mutation in the puff region of VP2 attenuates the myocarditic phenotype of an infectious cDNA of the Woodruff variant of coxsackievirus B3.

J. Virol. (1996), **70**: 7811-7818

Kühl U., Melzner B., Schultheiss H.-P.:

The Ca-channel as cardiac autoantigen.

Eur. Heart J. (1991), **12** (Suppl. D): 99-104

Lane J.R., Neumann D.A., Lafond-Walker A., Herskowitz A., Rose N.R.:

Interleukin 1 or Tumor Necrosis Factor can promote coxsackievirus B3-induced myocarditis in resistant B10.A mice.

J. Exp. Med. (1992), **175**: 1123-1129

Lane J.R., Neumann D.A., Lafond-Walker A., Herskowitz A., Rose N.R.:

Role of IL-1 and Tumor Necrosis Factor in coxsackievirus-induced autoimmune myocarditis.

J. Immunol. (1993), **151**: 1682-1690

Leipner C., Grün K., Schneider I., Glück B., Sigusch H., Stelzner A.:

Coxsackievirus B3-induced myocarditis: differences in the immune response of C57BL/6 and Balb/c mice.

Med. Microbiol. Immunol. (2004), **193**: 141-147

Lieberman E.B., Hutchins G.M., Herskowitz A., Rose N.R., Baughman K.L.:

Clinicopathologic description of myocarditis.

J. Am. Coll. Cardiol. (1991), **18**: 1617-1626

Limas C.J., Goldenberg I.F.:

Autoantibodies against cardiac beta-adrenoceptors in human dilated cardiomyopathy.

Circulation (1987), **76** (Suppl. 4): 262-269

Liu P.P., Opavsky M.A.:

Viral myocarditis. Receptors that bridge the cardiovascular with the immune system?

Circ. Res. (2000), **86**: 253-254

Lodge P.A., Herzum M., Olszewski J., Huber S.A.:

Coxsackievirus B-3 induced myocarditis. Acute and chronic forms of the disease caused by different immunopathogenic mechanisms.

Am. J. Pathol. (1987), **128**: 455-463

Maisch B.:

Autoreactivity to the cardiac myocyte, connective tissue and the extrazellular matrix in heart disease and postcardiac injury.

Springer Sem. Immunol. Immunopathol. (1989), **11**: 369-395

Maisch B., Drude L., Hengstenberg C., Herzum M., Hufnagel G., Kochsiek K., Schmalz A., Schönian U., Schwab M.D.:

Are antisarcolemmal (ASAs) and antimyolemmal antibodies (AMLAs) „natural“ antibodies?

Basic Res. Cardiol. (1991), **86** (Suppl. 3): 101-114

Maisch B., Drude L., Hengstenberg C., Hufnagel G., Schönian U., Schwab D.:

Cytolytic anticardiac membrane antibodies in the pathogenesis of myopericarditis.

Postgrad. Med. J. (1992), **68** (Suppl. 1): S11-16

Maisch B., Bauer E., Cirsi M., Kochsiek K.:

Cytolytic cross-reactive antibodies directed against the cardiac membrane and viral proteins in coxsackievirus B3 and B4 myocarditis. Characterization and pathogenic relevance.

Circulation (1993), **87** (Suppl. IV): 49-65

Maisch B., Portig I., Ristic A., Hufnagel G., Pankuweit S.:

Definition of inflammatory cardiomyopathy (myocarditis): on the way to consensus.

A status report.

Herz (2000), **25**: 200-209

Maisch B., Ristic A.D., Hufnagel G., Pankuweit S.:

Pathophysiology of viral myocarditis. The role of humoral immune response.

Cardiovasc. Pathol. (2002), **11**: 112-122

Maisch B., Richter A., Sandmöller A., Portig I., Pankuweit S.:

Inflammatory Dilated Cardiomyopathy (DCMI).

Herz (2005), **30**: 535-544

Maisch B., Pankuweit S., Karatolios K., Ristic A.D.:

Invasive techniques – from diagnosis to treatment.

Rheumatology (2006a), **45**: iv 32-iv 38

Maisch B., Richter A., Koelsch S., Alter P., Funck R., Pankuweit S.:

Management of patients with suspected (peri-)myocarditis and inflammatory dilated cardiomyopathy.

Herz (2006b), **31**: 881-890

Martino T.A., Petric M., Brown M., Aitken K., Gauntt C.J., Richardson C.D., Chow L.H., Liu P.P.:

Cardiovirulent coxsackieviruses and the decay-accelerating factor (CD55) receptor.

Virology (1998), **244**: 302-314

Matoba Y., Matsumori A., Okada I., Ohkusa T., Kawai C.:

The effect of cyclosporine on the immunopathogenesis of viral myocarditis in mice.

Jpn. Circ. J. (1991), **55** (4): 407-416

Matsumori A., Tomioka N., Kawai C.:

Viral myocarditis: immunopathogenesis and the effect of immunosuppressive treatment in a murine model.

Jpn. Circ. J. (1989), **53** (1): 58-60

Matsumori A., Yamada T., Suzuki H.:

Increased circulating cytokines in patients with myocarditis and cardiomyopathy.

Br. Heart J. (1994), **72**: 561-566

Meldrum D.R.:

Tumor necrosis factor in the heart.

Am. J. Physiol. (1998), **274**: R577-595

Mena I., Perry C.M., Harkins S., Rodriguez F., Gebhard J., Whitton J.L.:

The role of B lymphocytes in coxsackievirus B3 infection.

Am. J. Pathol. (1999), **155**: 1205-1215

Muckelbauer J.K., Rossmann M.G.:

The structure of coxsackievirus B3.

Curr. Top. Microbiol. Immunol. (1997), **223**: 191-208

Nalbantoglu J., Pari G., Karpati G., Holland P.C.:

Expression of the primary coxsackie and adenovirus receptor is downregulated during skeletal muscle maturation and limits the efficiency of adenovirus-mediated gene delivery to muscle cells.

Hum. Gene Ther. (1999), **10**: 1009-1019

Nalbantoglu J., Larochelle N., Wolf E., Karpati G., Lochmuller H., Holland P.C.:
Muscle-specific overexpression of the adenovirus primary receptor CAR overcomes
low efficiency of gene transfer to mature skeletal muscle.

J. Virol. (2001), **75**: 4276-4282

Neu N., Beisel K.W., Traystman M.D., Rose N.R., Craig S.W.:
Autoantibodies specific for the cardiac myosin isoform are found in mice susceptible to
coxsackievirus B3-induced myocarditis.

J. Immunol. (1987a), **138**: 2488-2492

Neu N., Rose N.R., Beisel K.W., Herskowitz A., Gurri-Glass G., Craig S.W.:
Cardiac myosin induces myocarditis in genetically predisposed mice.

J. Immunol. (1987b), **139**: 3630-3636

Noutsias M., Fechner H., de Jonge H., Wang X., Dekkers D., Houtsmuller A.B.,
Pauschinger M., Bergelson J., Warraich R., Yacoub M., Hetzer R., Lamers J.,
Schultheiss H.-P., Poller W.:

Human coxsackie-adenovirus receptor is colocalized with integrins $\alpha\beta 3$ and $\alpha\beta 5$ on
the cardiomyocyte sarcolemma and upregulated in dilated cardiomyopathy.

Circulation (2001), **104**: 275-280

O'Connell J.B., Reap E.A., Robinson J.A.:

The effects of cyclosporine on acute murine coxsackie B3 myocarditis.

Circulation (1986), **73** (2): 353-359

Okegawa T., Li Y., Pong R.-C., Bergelson J.M., Zhou J., Hsieh J.-T.:

The dual impact of coxsackie and adenovirus receptor expression on human prostate
cancer gene therapy.

Cancer Res. (2000), **60**: 5031-5036

Okegawa T., Pong R.-C., Li Y., Bergelson J.M., Sagalowsky A.I., Hsieh J.-T.:

The mechanism of growth-inhibitory effect of coxsackie and adenovirus receptor (CAR)
on human bladder cancer: a functional analysis of CAR protein structure.

Cancer Res. (2001), **61**: 6592-6600

Orthopoulos G., Triantafilou K., Triantafilou M.:

Coxsackie B viruses use multiple receptors to infect human cardiac cells.

J. Med. Virol. (2004), **74**: 291-299

Pankuweit S., Portig I., Maisch B.:

Pathophysiology of cardiac inflammation: molecular mechanisms.

Herz (2002), **27**: 669-676

Pankuweit S., Moll R., Baandrup U., Portig I., Hufnagel G., Maisch B.:

Prevalence of the parvovirus B19 genome in endomyocardial biopsy specimens.

Hum. Pathol. (2003), **34**: 497-500

Pankuweit S., Ruppert V., Maisch B.:

Inflammation in dilated cardiomyopathy.

Herz (2004), **29**: 788-793

Petrella J., Cohen C.J., Gaetz J., Bergelson J.M.:

A zebrafish coxsackievirus and adenovirus receptor homologue interacts with coxsackie B virus and adenovirus.

J. Virol. (2002), **76**: 10503-10506

Pfaffl M.W.:

A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.

Nucleic Acids Res. (2001), **29**: 2002-2007

Poller W., Fechner H., Noutsias M., Tschoepe C., Schultheiss H.-P.:

Highly variable expression of virus receptors in the human cardiovascular system.

Implications for cardiotropic viral infections and gene therapy.

Z. Kardiol. (2002), **91**: 978-991

Raab de Verdugo U., Selinka H.-C., Huber M., Kramer B., Kellermann J., Hofschneider P.H., Kandolf R.:

Characterization of a 100-Kilodalton binding protein for the six serotypes of coxsackie B viruses.

J. Virol. (1995), **69**: 6751-6757

Ramsingh A.I., Collins D.N.:

A point mutation in the VP4 coding sequence of coxsackievirus B4 influences virulence.

J. Virol. (1995), **69**: 7278-7281

Roelvink P.W., Lizonova A., Lee J.G., Li Y., Bergelson J.M., Finberg R.W., Brogh D.E., Kovesdi I., Wickham T.J.:

The coxsackievirus-adenovirus receptor protein can function as a cellular attachment protein for adenovirus serotypes from subgroups A, C, D, E and F.

J. Virol. (1998), **72**: 7909-7915

Richardson P., McKenna W., Bristow M., Maisch B., Mautner B., O'Connell J., Olsen E., Thiene G., Goodwin J., Gyarfás I., Martin I., Nordet P.:

Report of the 1995 World Health Organization/ International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of Cardiomyopathies.

Circulation (1996), **93**: 841-842

Ruppert V.:

Wirkung von Coxsackievirus B3 auf isolierte kardiale Zellen der adulten Maus und Ratte.

Dissertation/Fachbereich Biologie/Philipps-Universität Marburg (1995)

Ruppert V., Nolte D., Aschenbrenner T., Pankuweit S., Funck R., Maisch B.:

Novel point mutations in the mitochondrial DNA detected in patients with dilated cardiomyopathy by screening the whole mitochondrial genome.

Biochem. Biophys. Res. Commun. (2004), **318**: 535-54

Ruppert V., Pankuweit S., Maisch B.:

„Gene silencing“ of the coxsackievirus-adenovirus-receptor leads to a decreased pathogenic effect after CVB3 infection in HeLa-cells.

Eur. Heart J. (2005), **26** (Abstract Supplement): 395

Saraste A., Arola A., Vuorinen T., Kyto V., Kallajoki M., Pulkki K., Voipio-Pulkki L.M., Hyypia T.:

Cardiomyocyte apoptosis in experimental coxsackievirus B3 myocarditis.

Cardiovasc. Pathol. (2003), **12** (5): 255-262

Sasse A., Wallich M., Ding Z., Goedecke A., Schrader J.:

Coxsackie-and-adenovirus receptor mRNA expression in human heart failure.

J. Gene Med. (2003), **5**: 876-882

Schulze K., Becker B.F., Schauer R., Schultheiss H.P.:

Antibodies to ADP-ATP carrier - an autoantigen in myocarditis and dilated cardiomyopathy - impair cardiac function.

Circulation (1990), **81** (3): 959-969

Schulze K., Schultheiss H.P.:

The role of the ADP/ATP carrier in the pathogenesis of viral heart disease.

Eur. Heart J. (1995), **16** (Suppl. O): 64-67

Schulze K., Witzembichler B., Christmann C., Schultheiss H.-P.:

Disturbance of myocardial energy metabolism in experimental virus myocarditis by antibodies against the adenine nucleotide translocator.

Cardiovasc. Res. (1999), **44**: 91-100

Schultheiss H.-P., Bolte H.-D.:

Immunological analysis of autoantibodies against the adenine nucleotide translocator in dilated cardiomyopathy.

J. Mol. Cell. Cardiol. (1985), **17**: 603-617

Seko Y., Shinkai Y., Kawasaki A., Yagita H., Okumura K., Takaku F., Yazaki Y.:
Expression of perforin in infiltrating cells in murine hearts with acute myocarditis caused
by coxsackievirus B3.
Circulation (1991), **84** (2): 788-795

Seko Y., Shinkai Y., Kawasaki A., Yagita H., Okumura K., Yazaki Y.:
Evidence of perforin-mediated cardiac myocyte injury in acute murine myocarditis
caused by coxsackievirus B3.
J. Pathol. (1993), **170** (1): 53-58

Selinka H.-C., Wolde A., Sauter M., Kandolf R., Klingel K.:
Virus-receptor interactions of coxsackie B viruses and their putative influence on
cardiotropism.
Med. Microbiol. Immunol. (2004), **193**: 127-131

Shafren D.R., Bates R.C., Agrez M.V., Herd R.L., Burns G.F., Barry R.D.:
Coxsackieviruses B1, B3 and B5 use decay accelerating factor as a receptor for cell
attachment.
J. Virol. (1995), **69**: 3873-3877

Sinnreich M., Shaw C.A., Pari G., Nalbantoglu J., Holland P.C., Karpati G.:
Localization of coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR) in normal and
regenerating human muscle.
Neuromuscular Disorders (2005), **15**: 541-548

Spiller O.B., Goodfellow I.G., Evans D.J., Almond J.W., Morgan B.P.:
Echoviruses and coxsackie B viruses that use human decay-accelerating factor (DAF) as
a receptor do not bind rodent analogues of DAF.
J. Infect. Dis. (2000), **181**: 340-343

Strauer B.-E., Kandolf R., Mall G., Maisch B., Mertens T., Figulla H.R., Schwartzkopff
B., Brehm M., Schultheiss H.-P.:
Update 2001. Myokarditis-Kardiomyopathie.
Med. Klinik (2001), **96**: 608-625

- Thoelen I., Keyaerts E., Lindberg M., van Ranst M.:
Characterization of a cDNA encoding the bovine coxsackie and adenovirus receptor.
Biochem. Biophys. Res. Commun. (2001a), **288**: 805-808
- Thoelen I., Magnusson C., Tagerud S., Polacek C., Lindberg M., van Ranst M.:
Identification of alternative splice products encoded by the human coxsackie-adenovirus
receptor gene.
Biochem. Biophys. Res. Commun. (2001b), **287**: 216-222
- Tomioka N., Kishimoto C., Matsumori A., Kawai C.:
Effects of prednisolone on acute viral myocarditis in mice.
J. Am. Coll. Cardiol. (1986), **7** (4): 868-872
- Tomko R.P., Xu R., Philipson L.:
HCAR and MCAR: The human and mouse cellular receptors for subgroup C
adenoviruses and group B coxsackieviruses.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1997), **94**: 3352-3356
- Tu Z., Chapman N.M., Hufnagel G., Tracy S., Romero J.R., Barry W.H., Zhao L.,
Currey K., Shapiro B.:
The cardiovirulent phenotype of coxsackievirus B3 is determined at a single site in the
genomic 5' nontranslated region.
J. Virol. (1995), **69**: 4607-4618
- Vincent T., Pettersson R.F., Crystal R.G., Leopold P.L.:
Cytokine-mediated downregulation of coxsackievirus-adenovirus receptor in endothelial
cells.
J. Virol. (2004), **78**: 8047-8058
- Wang X., Bergelson J.M.:
Coxsackievirus and adenovirus receptor cytoplasmic and transmembrane domains are
not essential for coxsackievirus and adenovirus infection.
J. Virol. (1999), **73**: 2559-2562

Werk D., Schubert S., Lindig V., Grunert H.-P., Zeichhardt H., Erdmann V., Kurreck J.:
Developing an effective RNA interference strategy against a plus-strand RNA virus:
silencing of coxsackievirus B3 and its cognate coxsackievirus-adenovirus receptor.
Biol. Chem. (2005), **386**: 857-863

Whitton J.L.:
Immunopathology during coxsackievirus infection.
Springer Semin. Immunopathol. (2002), **24**: 201-213

Wolff P.G., Kühl U., Schultheiss H.-P.:
Laminin distribution and autoantibodies to laminin in dilated cardiomyopathy and
myocarditis.
Am. Heart J. (1989), **117**: 13030-1309

Wolfgram L.J., Beisel K.W., Rose N.R.:
Heart-specific autoantibodies following murine coxsackievirus B3 myocarditis.
J. Exp. Med. (1985), **161**: 1112-1121

Wolfgram L.J., Beisel K.W., Herskowitz A., Rose N.R.:
Variations in the susceptibility to coxsackievirus B3-induced myocarditis among
different strains of mice.
J. Immunol. (1986), **136**: 1846-1852

Woodruff J.F.:
Viral myocarditis.
Am. J. Pathol. (1980), **101**: 425-484

Zautner A.E., Körner U., Henke A., Badorff C., Schmidtke M.:
Heparan sulfates and coxsackievirus-adenovirus receptor: each one mediates
coxsackievirus B3 PD infection.
J. Virol. (2003), **77**: 10071-10077

Zen K., Liu Y., McCall I.C., Wu T., Lee W., Babbin B.A., Nusrat A., Parkos C.A.:
Neutrophil migration across tight junctions is mediated by adhesive interactions
between epithelial coxsackie and adenovirus receptor and a junctional adhesion
molecule-like protein on neutrophils.

Mol. Biol. Cell (2005), **16**: 2694-2703

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Bernhard Maisch, der es mir ermöglichte, die vorliegende Arbeit in seiner Abteilung durchzuführen sowie für seine freundliche Betreuung und die Begutachtung der Dissertation.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Dr. Volker Ruppert für die hervorragende Betreuung der Dissertation, seine Hilfe bei allen Fragen und Problemen bei der Abfassung der Arbeit sowie für neue Impulse und Denkanstöße bei der Problemstellung.

Ebenso möchte ich mich bei den Mitarbeiterinnen des kardiologischen Labors, Frau Marlis Crombach und Frau Petra Weber, für die Unterstützung bedanken.

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Expression des murinen Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptors (CAR) im Herzen verschiedener Mausarten“ im Medizinischen Zentrum für Innere Medizin/Kardiologie unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. B. Maisch mit Unterstützung durch Herrn Dr. V. Ruppert ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Wiesbaden, September 2007

Verena Marx

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren in Marburg:

Arnold, Bach, Barth, Basler, Baum, Becker, Christiansen, Daut, Eilers, Feuser, Geus, Gotzen, Griss, Gudermann, Happle, Hellinger, Hertl, Hesse, Hofmann, Jungclas, Kern, Klenk, Koolman, Krieg, Kroll, Lang, Maisch, Moll, Mutters, Oertel, Remschmidt, Renz, Schäfer, Schmidt, Steiniger, Werner, Westermann, Wulf, Voigt.