

Aus der Klinik für Kardiologie und Pneumologie
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Auswirkung des Coxsackie- Adenovirus- Rezeptorproteins,
CAR 4/7
auf CVB 3 induzierte Myokarditis in BALB / c Mäusen**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Ayse Isik
aus Gemerek / Türkei

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. med. H.-P. Schultheiß
 2. Prof. Dr. D. Grimm
 3. Priv.- Doz. Dr. med. Dechend

Datum der Promotion: 16.05.2010

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	S 6
1.1. Myokarditis	S 6
1.1.1. Definition	S 6
1.1.2. Epidemiologie	S 7
1.1.3. Ätiologie	S 8
1.1.4. Klinischer Verlauf	S 9
1.1.5. Pathophysiologie	S 9
1.2. Cocksackie- Adenovirus- Rezeptor	S 12
1.3. Lösliche CAR-Isoformen	S 13
1.4. Fragestellung	S 14
2. Materialien und Methoden	S 15
2.1. Studiendesign	S 15
2.2. Transformation	S 16
2.3. Expression des CAR- Proteins	S 16
2.4. Extraktion der Proteine	S 18
2.5. Proteinbestimmung (BCA-Methode)	S 18
2.6. SDS- Polyacrylamidgelelektrophorese	S 19
2.7. Western- Blot	S 20
2.8. Test der Mäuseseren auf CAR- Reaktivität	S 21
2.9. Histologie	S 21
2.10. Immunhistologie	S 22
2.11. ELISA (= Enzym- Verbundene Immunosorbentassay) zur Bestimmung von Gesamt IgG / Anti CAR 4/7- IgG	S 24

2.12. Materialienliste	S 25
2.12.1. Chemikalien	S 25
2.12.2. Antikörper	S 27
2.12.3. Lösungen und Puffer	S 27
2.13. Statistik	S 31
3. Ergebnisse	S 32
3.1. Expression von CAR 4/7 im bakteriellen System	S 32
3.2. Reinigung des CAR 4/7-Proteins mittels Affinitätschromatographie	S 33
3.2.1. Reinheitsgradsanalyse des isolierten CAR 4/7-Proteins mittels der SDS-Gelelektrophorese	S 34
3.2.2. Nachweis der Spezifität des isolierten CAR 4/7-Proteins	S 35
3.3. Wirkung von CAR 4/7 auf die CVB 3 induzierte Myokarditis in Balb C Mäusen	S 36
3.3.1.1. Analyse der unspezifischen humoralen Immunreaktion	S 36
3.3.1.2. Analyse der CAR spezifischen humoralen Immunreaktion	S 38
3.3.1.3. Spezifischer Nachweis der CAR 4/7 Antikörper mittels Western Blot	S 40
3.3.2.1. Analyse der zellulären Immunantwort im Myokard der behandelten Mäuse nach Induktion der Myokarditis	S 41
3.3.2.2. Makrophageninfiltration im Herzen der behandelten Tiere	S 43
4. Diskussion	S 44
4.1. Zusammenfassung	S 47
5. Abkürzungsverzeichnis	S 49
6. Abbildungsverzeichnis	S 51

7. Literaturverzeichnis	S 53
8. Anhang	S 59
8.1. Danksagung	S 59
8.2. Lebenslauf	S 60
8.3. Wissenschaftliche Publikation	S 61
8.4. Eidesstattliche Erklärung	S 62

1. Einleitung

1.1. Myokarditis

1.1.1. Definition

Die Myokarditis ist eine entzündliche Erkrankung des Myokards, die die Herzmuskelzellen, das Interstitium und die Herzgefäße betreffen kann. In der Regel wird sie von einer myokardialen Dysfunktion mit Dilatation der Herzhöhlen begleitet und kann gemäß der WHO Kriterien in diesem Fall auch als inflammatorische Kardiomyopathien bezeichnet werden.

Histologisch kennzeichnet sie sich durch ein ödematös verbreitertes Interstitium mit gemischtem Infiltrat aus mononuklearen Zellen, neutrophilen, eosinophilen Granulozyten und reichlich perinukleare Lipofuszinablagerungen in den Herzmuskelzellen (Abbildung 1 B). Im Gesunden dazu die Herzmuskelfasern mit quergestreiftem Zytoplasma (Abbildung 1 B). Zwischen den einzelnen Zellen sind deutlich dunkle Glanzstreifen (\rightarrow), sowie rund um die Zellkerne (\leftrightarrow) spindelförmige Aufhellungen des Zytoplasmas mit feinkörnigen braunen Lipofuszinablagerungen zu erkennen. Die Myokarditis tritt am häufigsten als Komplikation von Virusinfekten auf, seltener ist sie durch Bakterien oder Parasiten bedingt (Gauntt et al., 2003). Vor allem im Rahmen rheumatischer Erkrankungen kann die Myokarditis unabhängig von Krankheitserregern auftreten.

Die dilatative Kardiomyopathie (DCM) ist die häufigste Form der Kardiomyopathie. Sie ist eine primär das Myokard betreffende Erkrankung, deren Ätiologie definitionsgemäß unbekannt ist. Sie wird weder durch eine Hypertension, kardiale Vitien, kongenitale Herzfehler noch durch eine koronare, arterielle oder perikardiale Herzerkrankung verursacht.

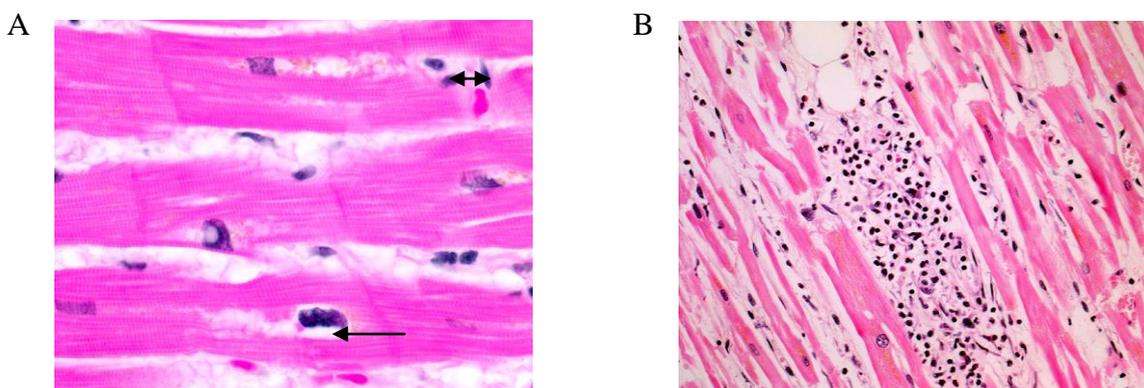


Abbildung 1: Hämatoxylin-Eosin-Färbung eines normalen Myokardiums und einer interstitiellen Myokarditis

Die dilatative Kardiomyopathie ist abzugrenzen von einer sekundären Kardiomyopathie, der eine bekannte Ursache zugrunde liegt. Im Anfangsstadium ist die DCM häufig symptomlos. Sie ist charakterisiert durch die Vergrößerung des linken Ventrikels mit einer Einschränkung der systolischen Pumpleistung. Bei weiterer Progression kommt es zu einer biventrikulären Vergrößerung, zu Links- und Rechtsherzinsuffizienz mit einer deutlichen Leistungseinschränkung, zu Arrhythmien sowie häufig auch zu Embolien aufgrund von Thrombenbildung in den erweiterten Herzhöhlen.

1.1.2. Epidemiologie

Die Epidemiologie der Myokarditis ist aufgrund der variablen Symptomatik weitgehend unbekannt. In den USA wird die Inzidenz auf 1-10/10000 Einwohner pro Jahr geschätzt. Bei 1 bis 5% der Patienten mit einem viralem Infekt wird eine myokardiale Beteiligung angenommen (Naegeli, 2004).

Typische, aber unspezifische Symptome der Myokarditis sind neben leichter Erschöpfbarkeit, Kurzatmigkeit und Schwächegefühl vor allem Missempfindungen des Herzens (Herzrasen, -stolpern, -klopfen, -schmerzen). Handelt es sich um eine virale Myokarditis, treten die genannten Symptome oft zusammen mit allgemeinen Symptomen der Virusinfektion (Halsschmerzen, Husten, Gliederschmerzen) auf. Die Schwere der Erkrankung ist von Fall zu Fall sehr unterschiedlich. Die Mehrzahl der Betroffenen bemerkt allenfalls geringe oder auch gar keine Symptome.

Die sichere Diagnose einer Myokarditis ist nur möglich im Rahmen einer Herzkatheteruntersuchung mit Entnahme einer kleinen Gewebprobe des Herzmuskels (Abbildung 1 A und B), die anschließend mikroskopisch untersucht wird (Testani et al., 2006). Diese aufwendige und nicht völlig ungefährliche Untersuchung wird aber nur durchgeführt, wenn ein schweres Krankheitsbild vorliegt. Hierbei sind auch bei chronischen Verläufen Übergänge in eine dilatative Kardiomyopathie möglich (Gauntt et al., 2003) (Pauschinger et al., 1999). Die Mehrheit der Myokarditiden verlaufen jedoch meist mit geringen Symptomen oder symptomlos, die unerkant bleiben und meist folgenlos abheilen. Aufgrund dieser Tatsachen können genaue Angaben zur Prognose der Myokarditis nicht gemacht werden.

Schätzungsweise leiden etwa 10% aller Patienten mit unklarer Kardiopathie an einer chronischen Myokarditis (Alain et al., 2005).

Nach Angaben der deutschen Leitlinie der Gesellschaft für Pädiatrie liegt die Sterblichkeit für die Myokarditis im Kindesalter bei 25%.

1.1.3. Ätiologie

Die Ursachen der Myokarditis sind vielfältig. In mehr als 50% der Fälle ist die Erkrankung durch bestimmte Viren (Coxsackie-Viren, Adenoviren, Echoviren, Influenza-(Grippe-)Viren) verursacht, die insbesondere im Rahmen von zunächst harmlosen Erkältungskrankheiten den Herzmuskel schädigen können (Klingel et al., 1996) (Noutsias et al., 2003). Man nimmt an, dass in diesen Fällen das Immunsystem versehentlich Bestandteile des Herzmuskels angreift, die in ihrer Struktur den Viren ähneln (sog. Kreuzantigenität) (Poller et al., 2004). Ein ähnlicher Mechanismus (Schädigung körpereigener Strukturen durch das Immunsystem) liegt auch der Myokarditis im Rahmen des rheumatischen Fiebers, des systemischen Lupus erythematoses und anderer rheumatischer Erkrankungen zugrunde. Eine Myokarditis kann aber auch durch ein direktes Eindringen von Mikroorganismen in den Herzmuskel bedingt sein, z. B. bei Diphtherie, Borrelien, Trichinen oder der südamerikanischen Chagas-Krankheit.

Das best beschriebene Virus, das eine Myokarditis verursacht, ist das Coxsackievirus (Pauschinger et al., 1999). Bei diesen Coxsackieviren handelt es sich um eine Einzel (+)-Strang RNA. Systematisch findet man sie in der Gattung Enteroviren und der Picornavirusfamilie mit den Stämmen A (CVA) und B (CVB), die vor allem Erkältung (grippale Infekte), virale Meningitis und Myokarditis hervorrufen (Pauschinger et al., 1999) (Xiamoei et al., 1995). Diese Viren wurden nach dem Ort Coxsackie / New York benannt, wo sie 1948 erstmals identifiziert wurden.

Zu diesen Erregern gehören die Coxsackieviren A 1-22, 24 und die Coxsackie-Viren B 1-6. Der Mensch stellt für diese Viren ein Reservoir dar, an den die Erreger bereits stark angepasst sind. Deshalb zeigen die von den Erregern ausgelösten Erkrankungen bei nicht vorgeschädigten Menschen nur eine geringe Letalität.

Die Erreger kommen weltweit vor. So trat 1997 auch in Malaysia eine Epidemie mit dem Coxsackivirus auf, bei der in drei Monaten insgesamt 30 Kinder starben.

Diese Erreger hatten im April 2002 in Griechenland zur Schließung aller Schulen geführt. Wie die Aristoteles- Universität in Saloniki berichtete, hatten sich insgesamt 46 Kinder und Erwachsene infiziert, von denen drei starben. Bei diesen Erregern handelte es sich um den

sogenannten B- Stamm des Virus, das bei den Betroffenen unter anderem eine Myokarditis ausgelöst hatte.

Das Coxsackievirus kann außerdem die sogenannte Hand- Fuß- Mundkrankheit verursachen. Das ist eine epidemische Erkrankung mit Bläschenbildung und Ulcerationen. Die Inkubationszeit beträgt 4-8 Tage. Meist sind Kinder unter 10 Jahren betroffen. Die Bläschen sind meist an Händen und Füßen zu finden, teils finden sich ein knötchenförmiger Ausschlag am Oberschenkel und Apthen im Mund. Coxsackieviren können je nach Serotyp aber auch eine Meningitis, Enzephalitis, Prikarditis u.a. auslösen. Des Weiteren können Infektionen mit Coxsackie-Viren der Gruppe A und B, vor allem in den Sommermonaten zu akuten Durchfallerkrankungen (Sommerdiarrhoe) führen.

Menschen infizieren sich in der Regel über verunreinigte Nahrung und Wasser per Tröpfcheninfektion oder per Schmierinfektion.

1.1.4. Klinischer Verlauf

Der Verlauf der Myokarditis ist sehr unterschiedlich und im Einzelfall nicht vorhersehbar. Leichte Fälle heilen in der Regel folgenlos aus. Manchmal bleibt eine dauerhafte Herzrhythmusstörung zurück, die aber oft ohne Krankheitswert ist. Die Erkrankung kann aber auch einen chronischen Verlauf mit steigender Gefahr von Herzversagen nehmen. Selten führt die Herzmuskelschädigung akut (binnen Tagen bis Wochen) zu tödlichem Herzversagen.

1.1.5. Pathophysiologie

Bei der Entstehung der Myokarditis lassen sich zwei unterschiedliche pathogenetische Mechanismen unterscheiden. Einerseits die direkte virale Schädigung des Myokardgewebes, andererseits den indirekten immunvermittelnden Mechanismus. Zu Beginn der Infektion wird die Schädigung direkt auf die lytische Eigenschaft der Viren zurückgeführt, während in der chronischen Phase autoimmunologische Vorgänge für die fortschreitende Myokardschädigung verantwortlich gemacht werden. Die akute Phase ist anbei durch eine zytotoxisch verursachte oder durch Zytokinfreisetzung verstärkte Myozytendestruktion gekennzeichnet. Die chronische Phase dagegen geht mit einem kontinuierlichem, durch Autoimmunmechanismen getriggerten

Myozytenuntergang einher (Afanasyeva et al., 2002). Sie ist durch das Vorhandensein von myokardialen Antikörpern gekennzeichnet. Klassisch demonstrieren lässt sich der pathophysiologische Ablauf am Beispiel einer viralen Myokarditis (Abbildung 2), bei denen erst die virale RNA auf zellulärer Ebene durch die Anwendung hochsensitiver molekularbiologischer Techniken wie der in situ Hybridisierung mittels virusspezifischer cDNA, RNA Sonden oder quantitative PCR nachweisbar ist (Pauschinger et al., 1999) (Xiaomei et al., 2005).

Die kardiotropen Viren werden in einer ersten Phase durch Rezeptor vermittelte Endozytose in die Myozyten aufgenommen, danach kommt es durch Translation zur Produktion viraler Proteine. Die zweite Phase wird dominiert durch die Infiltration natürlicher Killerzellen und Makrophagen mit konsekutiver Freisetzung von Zytokinen. Durch Interleukin 2 aktivierte natürliche Killerzellen eliminieren die virusinfizierten Myozyten. Innerhalb eines Zeitraumes von ein bis zwei Wochen kommt es in der subakuten Phase zur Myokardinfiltration durch antigenspezifische T-Lymphozyten. Die zytotoxischen T-Zellen erkennen hierbei degradierende Virusproteinfragmente an der Myozyten-Membranoberfläche in Form des veränderten Major-Histokompatibilitäts-Komplex-Antigens, wobei es schließlich zur Lyse der virusinfizierten Kardiozyten kommt (Abbildung 2).

Bei Auftreten eines Ungleichgewichtes zwischen Virusbeseitigung und immunologischer Reaktion kann es im Verlauf eine persistierende Virusreplikation in den Myozyten mit chronischem Infekt oder die andauernde Aktivierung der T-Zellen kommen, die zu einer anhaltenden Myokardzerstörung mit möglichem Übergang in das Bild einer dilatativen Kardiomyopathie enden kann (Naegeli, 2004).

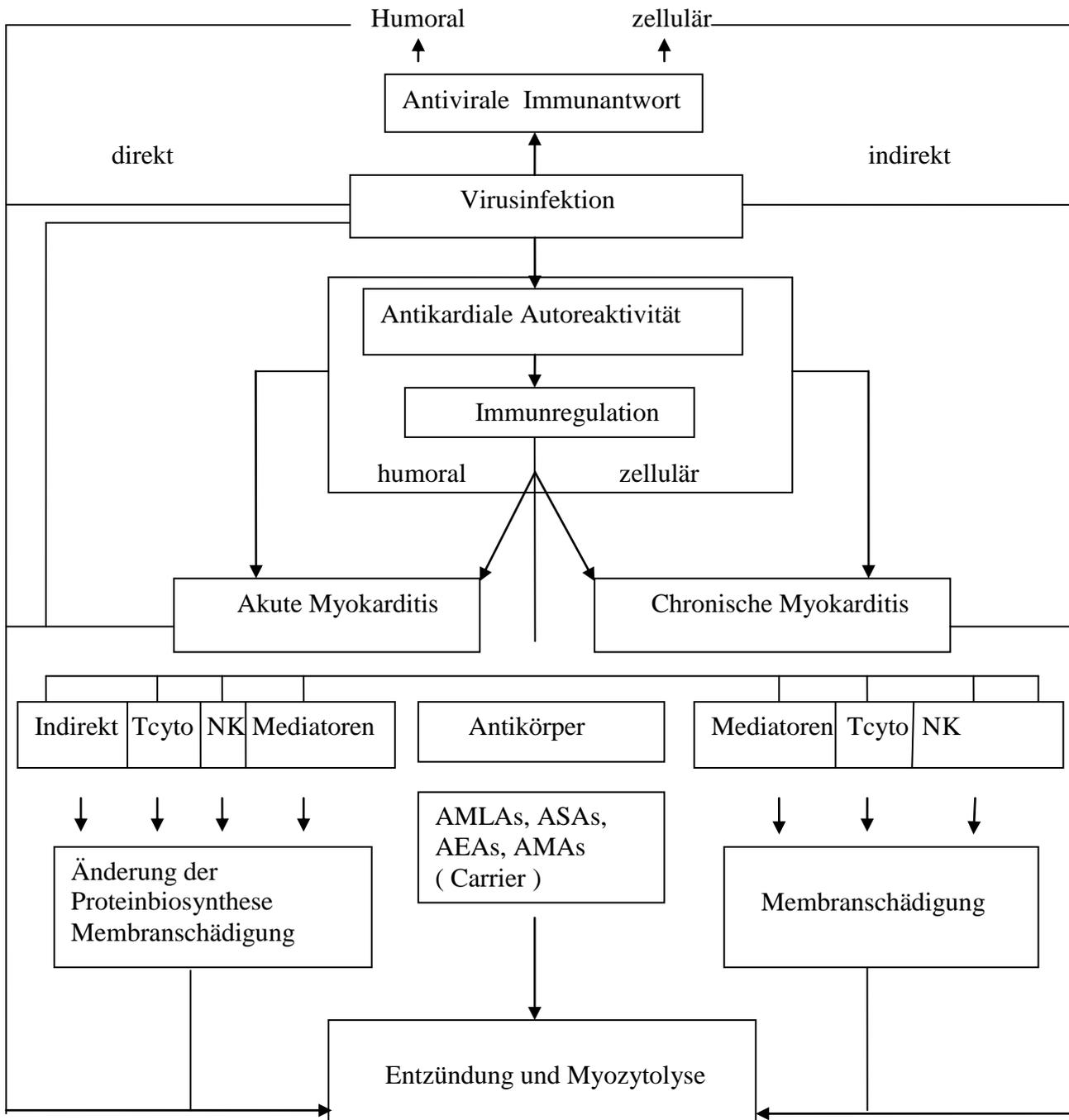


Abbildung 2: Pathogenese und Immunpathogenese der Myokarditis

1.2. Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor

Coxsackieviren und Adenoviren sind weltweitverbreitete Erreger viraler Herzmuskelerkrankungen. Bei der überwiegenden Zahl der Exponierten verursachen sie jedoch keine myokardiale Erkrankung, da sie nicht a priori kardiotrop sind. Die molekularen Grundlagen ihres ungewöhnlichen Tropismus bei Patienten, die eine virale Herzmuskelerkrankung entwickeln, waren bis vor kurzem unbekannt. Ein bedeutender Fortschritt wurde durch Klonierung eines Rezeptors erzielt, der die beiden strukturell unverwandten Viren bindet. Dieser Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptor (CAR) ist eine wesentliche Determinante für die zelluläre Aufnahme beider Viren und für die molekulare Pathogenese von Coxsackievirus- und Adenovirus- Infektionen (Orthopoulos et al., 2004) (Bergelson et al., 1997).

CAR ist ein 46 kDa großes integrales Membranprotein mit einer typischen Transmembrandomäne, einer langen zytoplasmatischen Domäne und einer extrazellulären Region, bestehend aus zwei Ig ähnlichen Domänen (Philipson L et al. 2004). Beide Viren (Adeno- und Coxsackieviren) interagieren mit der Ig-ähnlichen Domäne. Das murine und das menschliche Protein sind sich sehr ähnlich (91% Aminosäureidentität innerhalb der extrazellulären Domäne, 77% innerhalb der Transmembrandomäne und 95% Identität innerhalb der zytoplasmatischen Domäne).

Isoformen des CAR, die sich nur im C-Terminus unterscheiden und die aus alternativem Splicing resultieren, wurden in Mäusen und Menschen identifiziert.

In gesunden Donor-Herzen ist die CAR-Expression niedrig, beschränkt auf interstitielle Zellen und subendotheliale glatte Muskelzellen, während explantierte Herzen von Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie (DCM) eine hohe CAR-Expression im Myokard an den Kardiomyozyten aufweisen. CAR scheint im Immunsystem eine entscheidende Rolle zu spielen (He et al., 2001) (Carson et al., 2001).

CAR ist in Tight-Junctions und intercalated Discis vorhanden, wo es als ein hämophiles Adhäsionsprotein fungiert (Noutsias et al., 2001) (Honda et al., 2000) (Cohen et al., 2001).

Zell-zu-Zell-Interaktionen und die extrazelluläre Matrix spielen eine Schlüsselrolle im Zellwachstum, der Differenzierung und Migration während der Embryonalentwicklung (Tomko et al., 2000).

Der Coxsackie-Adenovirus Rezeptor spielt nicht nur eine bedeutende Rolle bei der Entstehung einer Myokarditis, sondern auch bei der Entwicklung des normalen Herzens

(Asher et al., 2005) (Dorner et al., 2005). Dorner et al. beobachteten bei 5 von 6 Embryopaaren, dass CAR-Mangel an Embryonen zur pathologischen Herzformationen mit verkleinertem Ventrikellumen, sowie zur Entwicklung nur eines Atrioventrikulärkanals führte. Im Vergleich dazu zeigten die Embryonen, die CAR besaßen zwei Atrioventrikulärkanäle. Der rechte Vorhof zum rechten Ventrikel führend und der linke Vorhof zum linken Ventrikel führend.

1.3. Lösliche CAR-Isoformen

Der humane hCAR 1 wird von sieben Exons kodiert. Durch alternatives Spleißen zwischen Exon 7 und Exon 2, 3 bzw. 4 entstehen die verkürzten Isoformen CAR 2/7, CAR 3/7 und CAR 4/7. CAR 4/7 und CAR 3/7 beinhalten die volle Aminosäuresequenz der ersten Immunglobulindomäne (D1) des membranständigen CAR- Rezeptors und einen spezifischen C-Terminus von 23 Aminosäuren. CAR 4/7 ist um einen Teil der zweiten Immunglobulindomäne (D2) verlängert. Bei CAR 2/7 handelt es sich um ein Peptid von 89 Aminosäuren mit einem C-Terminus, der sich von allen übrigen unterscheidet. Durch alternatives Spleißen geht Exon 6 und somit die Aminosäuresequenz, die das Protein in der Membran verankert, verloren (Dörner et al., 2004) (Thoelen et al., 2001). Transfektionsversuche an HeLa Zellen erbrachten, dass die Spleißformen aus der Zelle ausgeschleust werden und es sich somit um „lösliche CAR- Rezeptoren“ handelt.

Die löslichen CAR- Rezeptoren interagieren sowohl mit dem membranständigen CAR- Rezeptor als auch mit Coxsackievirus B 3. Die Transfektion von HeLa Zellen mit dem löslichen CAR-Protein führt dadurch zu einer deutlichen Reduktion der Infizierbarkeit der Zellen mit dem Coxsackievirus B 3.

Verglichen mit anderen, bekannten löslichen CAR Proteinen, die durch Splicing produziert wurden, beinhaltet CAR 4/7 den größten Teil der extrazellulären Domäne des membranösen CAR's, interagiert mit den extrazellulären Domänen von CAR und CVB 3 und führt zur effizienten Hemmung der CVB 3 Infektion in vitro (Dörner et al., 2006).

Der zelluläre Rezeptor des CVB 3 ist der CAR und der decay-accelerating factor (DAF) (Shafren et al., 1995) (Bergelson et al., 1995) (Milstone et al., 2004) (Coyne et al., 2006). Die antivirale Kapazität des löslichen CAR wurde von Yanagawa gezeigt, die ein bivalentes Rezeptoranalogue verwendete, das aus der extrazellulären CAR Domäne gebunden an das Fc Fragment des Immunglobulins bestand (Yanagawa et al., 2004). Ähnliche Fc beinhaltende

Analoge und Fc Domänen haben gezeigt, dass sie effektiv bei der Hemmung der Infektion der verschiedenen Viren sind (Wetz et al., 1986) (Yanagawa et al., 2003).

Neben den antiviralen Effekten des löslichen CAR's wurde CAR verwendet, um das Epithel und Endothel permeabel für Ionen und adenovirale Partikel zu machen (Walters et al., 2001).

1.4. Fragestellung

Beim Coxsackievirus B 3 handelt es sich um eine Einzel (+)- Strang RNA der Gattung Enterovirus aus der Picornavirusfamilie. Der CVB 3 induziert virale Myokarditis in Menschen und Mäusen führt zur Entwicklung einer dilatativen Kardiomyopathie. Der Rezeptor hierfür ist der CAR, ein Protein, dem eine antivirale Kapazität und hemmende Wirkung von Virusinfektion nachgewiesen wurde.

Für die vorliegende Dissertation ergaben sich aufgrund der uns bekannten Daten somit folgende Fragestellungen:

Welche Wirkungen hat die Injektion von CAR 4/7 bei CVB 3 infizierten / nicht infizierten BALB / c Mäusen auf das unspezifische humorale Immunsystem? Und wie wirkt sich eine CAR 4/7 Behandlung auf CVB 3 induzierter Myokarditis aus? Gibt es eine CAR spezifische humorale Immunantwort? Detektiert sich auch immunhistologisch eine zelluläre Immunantwort im Herzmuskelgewebe? Wenn ja, zu welchen Schädigungen bzw. Folgen führt es im Herzmuskelgewebe? Lassen sich dabei Makrophageninfiltrationen quantifizieren ?

Um diese Fragen zu beantworten wurden 40 vier Wochen alte BALB c Mäuse zu je 10 Gruppen unterteilt und 20 davon täglich mit CAR 4/7 und Puffer behandelt. Am 3. Tag wurden je 5 der jeweiligen Gruppen mit dem CVB 3 Virus infiziert und entsprechend am 3. oder am 6. Tag nach Infektion zur Untersuchung der unterschiedlichen Parameter (Gesamt IgG, Anti-CAR- IgG, Makrophagen) getötet.

2. Materialien und Methoden

2.1. Studiendesign

Die unterschiedlichen Versuche zur Erforschung der Auswirkung von CAR 4/7 an CVB 3 infizierten Mäusen wurden an BALB / c Mäusen (H-2d) mit der Auftragsnummer: 0213/03 und dem Coxsackievirus B 3 aus dem Nancy Stamm, der amerikanischen Zelltypsammlung (ATTC) mit der Nummer VR-30 durchgeführt. Die Tierhaltung fand im Hell- Dunkelzyklus (14/10) zu je max. 6 Tieren pro Käfig mit einer Luftfeuchtigkeit von 50- 60% unter 21° C statt. Die Fütterung erfolgte mittels Pellets. Diese BALB / c Mäuse erhielten wir aus der Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin (FEM) in Berlin. Die Tierversuchsreihen wurden nach den deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt.

Hierfür wurden 40, 4 Wochen alte männliche Mäuse in Gruppen, zu jeweils 10 Tieren aufgeteilt. 20 davon wurden mit einer täglichen Dosis von 10 µg/g mit CAR 4/7 und Puffer in einem Endvolumen von 125 µl für 9 Tage injiziert (Dörner et al., 2006). Am 3. Tag der Behandlung wurden je 5 Tiere von den jeweiligen Gruppen mit dem CVB 3 Virus (10^3 pfu) infiziert (Abbildung 3). Am 3. und 6. Tag nach der Infektion wurden alle Tiere (jeweils 5 der Versuchsreihen), ob infiziert oder nicht infiziert für virologische und pathologische Studien getötet, wobei im Anschluss die Entnahme des Herzens erfolgte. Blut und Gewebe wurden hiervon entnommen, das Gewebe bei -80 °C, sowie das Blut nach Abzentrifugation bei 3000 rpm für 10 min bei -20 °C eingefroren.

Nr.	Versuchsgruppe der BALB / c Mäuse	Anzahl
1	1 x täglich Puffer	10
2	CVB 3 und 1 x täglich Puffer	10
3	CVB 3 und 1 x täglich CAR 4/7	10
4	1 x täglich CAR 4/7	10

Abbildung 3: Darstellung der Anzahl der unterschiedlichen Versuchsgruppen

Vor Verwendung des Coxsackievirus B 3 wurde diese in HeLa Zellen gezüchtet und bei - 80 °C bis zur Anwendung aufbewahrt.

2.2. Transformation

Für die Transformation wurden 100 µl kompetente BL (DE 3) pLys S- E. coli Bakterien mit 1 µl pRSET CAR 4/7 gemischt (Dörner et al., 2006). Nach einer 30 min Inkubationszeit auf Eis wurde die Lösung exakt 45 Sekunden bei 42 °C im Wasserbad inkubiert und anschließend für 2 Minuten auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 1 ml SOC Medium ließ man die Bakterien 45 Minuten bei 37 °C schüttelnd (größer 200 Cyclen / Minute) wachsen. Auf Chloramphenicol bestrichenen SOB- Platten wurden 100 µl der Lösung ausgestrichen und bei einer Temperatur von 37 °C über Nacht (12- 16 h) inkubiert.

2.3. Expression des CAR- Proteins

Die pRSET Vektoren (Abbildung 4) sind pUC abgeleitete Expressionsvektoren. Sie sind geeignet für Proteinexpressionen und Reinigung von geklonten Genen in E. coli.

Sie erlauben eine große Mengen an DNA Sequenzen (Proteine) mit Hilfe von T 7 Promotoren in E. coli Bakterien zu exprimieren. Die kodierende Sequenz des zu analysierenden Proteins wird hinter die Sequenz eines N- terminalen Fusionspeptides, einem Polyhistidin-Tag inseriert. Die metallbindende Domäne des Fusionspeptids erlaubt eine einfache Reinigung des rekombinanten Proteins durch immobilisierende Metall-Affinitätschromatographie.

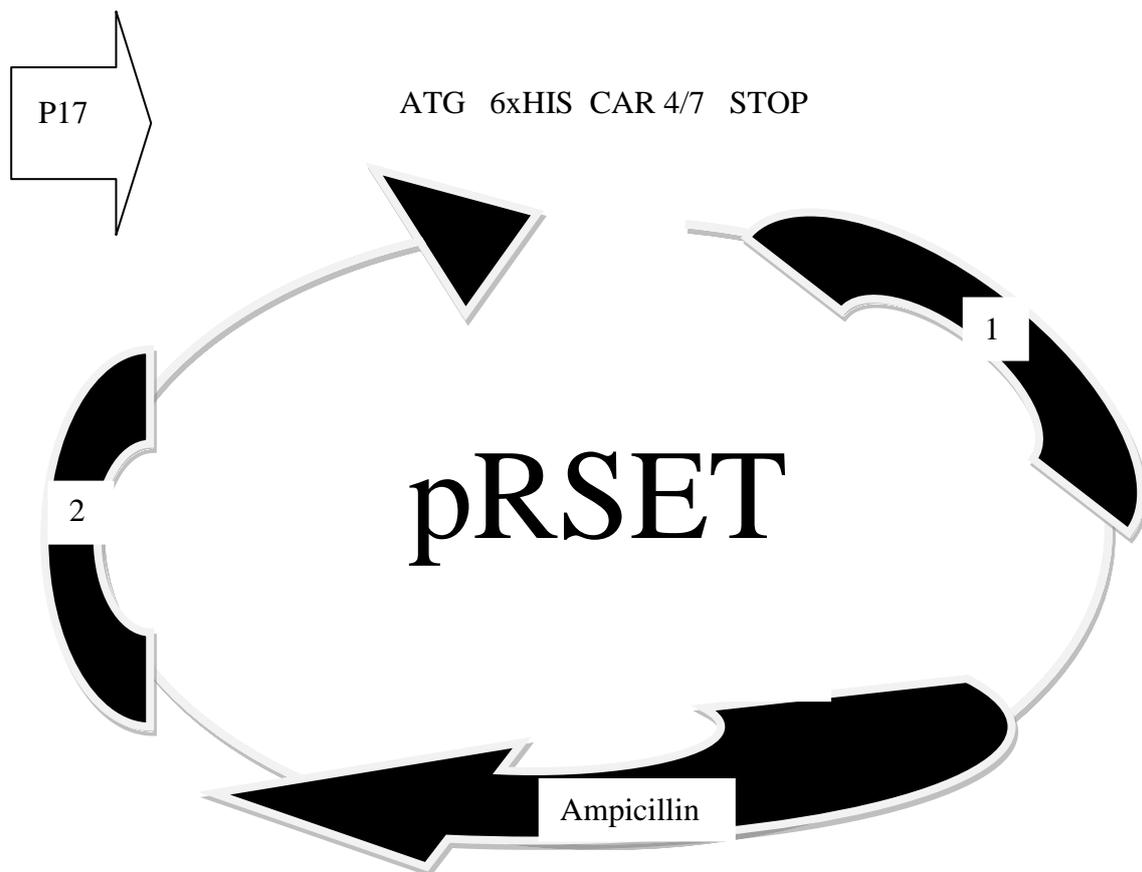


Abbildung 4: Map of pRSET aus Ampicillin, f 1 ori (1) und puc ori (2).

In unserem Experiment wurde als Expressionsvektor der oben genannte pRSET Vektor verwendet, welcher in *E. coli* Bakterien exprimiert wurde. Die Transformationslösung wurde zu 25 ml SOC Medium gegeben, die 25 µl Ampicillin und 25 µl Chloramphenicol beinhaltete und erneut über Nacht bei 30 °C inkubiert. Am nächsten Tag beimpfte man jeweils 300 ml SOB- Medium mit der Übernachtskultur bis eine OD_{600} von 0,1 erreicht war. Nach einer schüttelnden Inkubation bei 37 °C wurde bei einer OD_{600} von 0,4- 0,6 IPTG mit einer Endkonzentration von 1 mM hinzugegeben. Danach wurden stündlich für die Dauer von 4 - 6 h 1000 µl der Kultur für die OD_{600} Messung und 1000 µl für die nachfolgende Beurteilung, Überprüfung und Qualitätsbestimmung der Expression von CAR mittels SDS- Page und Western- Blot entnommen. Der Rest der Kultur wurde abzentrifugiert und für die CAR 4/7 Extraktion verwendet.

2.4. Extraktion der Proteine

Zur Proteinextraktion wurde das Bakterienpellet in 12,5 ml Z- Puffer gelöst. Im Anschluss wurden die Bakterien mit Ultraschallwellen 3 x für 15 s aufgeschlossen und bei 10.000 Umdrehungen pro Minute für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde zur Weiterverarbeitung abgenommen und sowohl mit 520 µl einer 20 mM Imidazolösung als auch mit 16 ml Ni-NTA-Gel gemischt. Das Ni- NTA- Gel wurde zuvor 3 x mit Z- Puffer gewaschen. Im Anschluss wurde das Gemisch in eine Säule übertragen und mit dem vierfachen Säulenvolumen mit Puffer Z/20mM Imidazolösung gewaschen. Das gebundene His-gelabelte CAR 4/7-Protein wurde mit einem 150 mM Imidazol / Puffer Z eluiert und in Tubes zu je 150 µl aufgefangen.

2.5. Proteinbestimmung (BCA-Methode)

Der Nachweis beruht darauf, dass Proteine mit Cu^{2+} in alkalischer Lösung einen Komplex bilden (Biuret-Reaktion). Die Cu^{2+} -Ionen dieses Komplexes werden zu Cu^{+} - Ionen reduziert, die mit Bicinchinon-Säure (BCA) einen violetten Farbkomplex bilden. Die Absorption dieses Farbkomplexes wird bei 562 nm gemessen. Die Reduktion erfolgt durch die Seitenketten von Cystein, Tyrosin, Tryptophan, und die Peptidbindung, wobei die Intensität der Farbstoffbildung (das Redoxverfahren der beteiligten Gruppen) u.a. von der Temperatur abhängt, sodass durch deren Variation die Sensitivität des Tests modifiziert werden kann.

Es wurde eine Standardreihe von verdünnten Albuminlösungen mit Konzentrationen von 1000 µg/ml, 750 µg/ml, 500 µg/ml, 250 µg/ml und 125 µg/ml angesetzt.

In einer Mikrotiterplatte wurden je 25 µl des Standards bzw. der Probe pipettiert und mit 200 µl einer Lösung aus Reagenz B / Reagenz A in einer 1:50 Verdünnung vermischt. Die Mikrotiterplatte wurde bei einer Temperatur von 37 °C für 30 min inkubiert. Die Absorptionsmessung erfolgte im ELISA-Reader bei 562 nm.

2.6. SDS - Polyacrylamidgelelektrophorese

Ziel der Gelelektrophorese ist die Auftrennung eines Proteingemisches nach der Größe, indem man das Gemisch im elektrischen Feld durch eine Gelmatrix aus Polyacrylamid („dreidimensionales Netz“) wandern lässt (Abbildung 5). Durch Zugabe von reduzierenden Thiolverbindungen wie Mercaptoethanol erreicht man eine Auflösung der Disulfidbrücken der Proteine. Das anionische Detergenz, wie SDS zerstört die 3D-Struktur, weil SDS-Moleküle durch hydrophobe Wechselwirkungen gleichmäßig überall in der Polypeptidkette binden, wodurch diese gleichmäßig mit negativen Ladungen überzogen wird und unabhängig von der Eigenladung des Proteins in die Richtung der Anode beschleunigt werden.

Die Proteinabgrenzung erfolgt aufgrund des Überschusses an Ladungsträgern im Sammelgel, die sich schnell in Richtung des Trenngels bewegen und dort getrennt werden.

Aufbau des Gels:

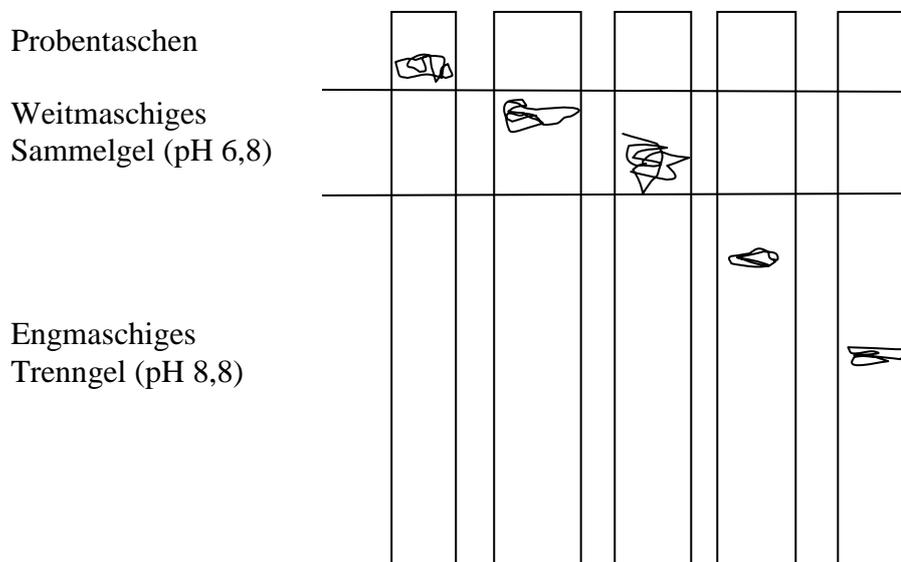


Abbildung 5: Aufbau eines Gels nach Auftrennung des Proteingemisches mittels der SDS- Gelelektrophorese

2.7. Western- Blot

Der Western Blot eignet sich spezifisch gut um Proteine mittels Antigen- Antikörperreaktionen sichtbar zu machen.

In unserem Experiment wurden hierfür die während der Expression stündlich entnommenen Proben bei einer mittleren Geschwindigkeit von 12.000 Umdrehungen pro Minute für eine Minute zentrifugiert. Nach Abpipetieren des Überstandes wurden die Pellets in Ladepuffer aufgelöst und im kochenden Wasser für 5 min mit nachfolgendem Kälteschock für die Dauer von einer Minute stehen gelassen und im Anschluss für ein paar Sekunden zentrifugiert. 15 µl Probe wurden in eine Tasche eines SDS-Polyacrylamidelektrophorese Gels (Bis-Tris-Gel; Invitrogen) aufgetragen und anfangs bei 100 V, nach 30 min bei 150 V für etwa 45 min getrennt. Um die Proteine auf eine Membran zu blotten, wurde eine PVDF- Membran in einer 100 % Methanollösung für 20 s inkubiert und anschließend in destilliertem Wasser gespült. Die Pats, die Filter und die Membran wurden während dessen mit Blot- Puffer getränkt.

Zum Schluss erfolgte der Aufbau des Blots in folgender Reihenfolge:

Reihenfolge der Zusammenlegung: Pat

Filter

Gel

Membran / Nitrozellulose

Filter

Pat

Der Transfer der Proteine vom Gel auf die Membran erfolgte bei 200-250 mA für etwa 1,5 h in Blot-Puffer.

Nach Ablauf der Zeit wurde die Membran in Blockierpuffer gelegt, um die Bindung der Antikörper an nicht proteinhaltigen Flächen zu verhindern. Die Membran wurde mit CAR- oder Histidin reaktiven Antikörpern in einer 1:500 Verdünnung in Blockierlösung für die Dauer von 1 Stunde inkubiert (Dörner et al., 2006). Danach folgten 3 Waschgänge mit TBST für jeweils 10 min. Als Zweitantikörper wurde ein Anti-Rabbit-IgG mit gekoppelter alkalischer Phosphatase in einer 1:5000 Verdünnung verwendet. Die Membran wurde mit TBST 3 x für 10 Minuten

gewaschen. Zum Abschluss wurde das CAR-Protein mit Hilfe des ECL-Färbesystems (Amersham) sichtbar gemacht.

2.8. Test der Mäuseseren auf CAR-Reaktivität

Nach erfolgter Auftrennung der Herzproteine einer weder behandelten, noch infizierten Maus und isoliertem CAR 4/7 anhand der SDS- Polyacrylamidgelelektrophorese wurde die Membran ca. für 1 h in Blot- Lösung belassen. Die Membran wurde teils mit 1:50 verdünnten Seren die nur mit CAR 4/7 behandelten, mit CVB 3 infiziert und behandelten Mäusen (4 µl mit 196 µl Blot-Puffer gemischt), sowie teils mit CAR-spezifischen Antikörpern mit einer 1:500 Verdünnung inkubiert. Das letztere als Kontrolle dienend. Danach wurden diese in 3 Waschvorgängen mit TBST für jeweils 10 min gewaschen und mit dem 2. Antikörper (Anti- Rabbit-Peroxidase 1:10000; Anti- Maus- Peroxidase 1:5000) beladen. Anschließend erfolgte erneut ein Waschvorgang mit TBST- Lösung 3 x für 10 min und Färbung der Schnitte Reagenz A (3 ml) zu B (75 ml) mit dem ECL- Färbesystem (Amersham).

2.9. Histologie

Zur Beurteilung der Entzündung der unterschiedlich behandelten Herzen wurden Gewebeschnitte mit der Hämatoxylin-Eosin-Färbung angefärbt. Dazu wurde Herzmuskelgewebe der infizierten / nicht infizierten, behandelten / nicht behandelten Tiere über Nacht in Formalin inkubiert, dehydriert und in Paraffin eingebettet. Danach wurden 5 µm dicke Gewebsschnitte mittels Xylol von Paraffin befreit und in einer absteigenden Konzentrationsreihe von Ethanol (90 %, 70 %, 30 %) rehydriert und dreimal bewässert. Zum Schluss wurden die Schnitte in der Hämalaunlösung für 30 s inkubiert.

2.10. Immunhistologie

Grundlegendes Ziel der Immunhistologie ist es, mittels Antigen– Antikörperreaktionen definierte Epitope auf/in Zellen oder Geweben differentialdiagnostisch zu identifizieren. Da „nur Antigen-Antikörper-Komplexe“ schwer in Zellsuspensionen oder Gewebeverbänden identifizierbar bzw. sichtbar sind, ist es notwendig eingesetzte Antikörper über eine Kopplung mit einem Enzym und anschließender Substratzugabe oder über eine direkte Fluorochrommarkierung sichtbar zu machen.

Bei der verwendeten Nachweismethode bindet ein erster, unmarkierter Antikörper mit einem Antigen. Anschließend wird dieser Antikörper über einen zweiten, markierten Antikörper nachgewiesen, welcher die eigentliche Nachweisreaktion bewirkt. Es wird also nicht das Antigen direkt, sondern der erste Antikörper nachgewiesen- und somit erfolgt ein indirekter Nachweis des Antigens. Aufgrund der einfachen Signalverstärkung ist eine höhere Sensitivität gegeben.

Ein Beispiel für die indirekte Nachweismethode ist die Verwendung des Avidin-Biotin-Komplexes. Diese Methode wurde in den 80er Jahren durch Hsu entwickelt und gilt auch heute noch als ein herausragendes indirektes Nachweisverfahren histologischer Antigene oder anderer Zellmarker. Sie ist ein Immuno-Peroxidaseverfahren und nutzt die starke Affinität von Avidin, ein aus Hühnereiweiß isoliertes Glykoprotein, zu Biotin. Diese Bindung besitzt eine der höchsten biologischen Bindungskonstanten. Sie ist 1.000.000 mal höher als die physiologische Antikörper-Antigen-Affinität und ist daher nahezu irreversibel. Nach Bindung des Primärantikörpers bindet ein biotinylierter Sekundärantikörper an das Fc-Fragment. Durch eine anschließende Zugabe von enzymmarkiertem Avidin entsteht ein Enzym- Substrat-Reaktion, die einen Farbnachweis erbringt. Avidin besitzt 4 Bindungsstellen für Biotin. Die für diese Methode verwendeten Sekundärantikörper wurden jeweils mit mehreren Biotinmolekülen konjugiert. Dadurch kommt es zur Bildung von Avidin-Biotin Komplexen von makromolekularem Ausmaß. Da auch das Gewebe Avidin enthält, muss im ersten Schritt der Färbung dieses endogene Avidin mit Hilfe eines Blocking-Kits geblockt werden. Dies garantiert, dass nur die spezifischen, biotinylierten Antikörper einen Ansatzpunkt für den Avidin-Biotin-Komplex bilden und damit eine hohe Spezifität für das exogen zugeführte Avidin.

Bevor es zu diesem Farbnachweis kommt, wurden die durch Paraffin haltbar gemachten Schnitte in folgender Reihenfolge mit Xylol und unterschiedlichen Ethanolkonzentrationen inkubiert:

1. 2x 10 min Xylol
2. 2x 2 min 100 % Ethanol
3. 1x 2 min 90 % Ethanol
4. 1x 2 min 70 % Ethanol
5. 1x 2 min 30 % Ethanol

Anschließend wurden diese Schnitte mit Aqua dest. gründlich ausgespült und in dest. Wasser 2 mal für 3 min zur Entfernung des Ethanols aus den Schnitten inkubiert. Die nachfolgende Pepsindemaskierung für 10 min bei 37 °C legte die Bindungsstellen frei, die durch Paraffin belegt waren. Nach zweimaliger Spülung mit Aqua dest. erfolgte erneut eine Inkubation der Schnitte mit 0,9% H₂O₂ in Aqua dest. für 15 min, das im Anschluss durch eine einmalige TBS Spülung und 2 x 5 minütige Waschung mit 1 x TBST entfernt wurde. Die Schnitte wurden in 10% Normalserum in 1 x TBS, 1% BSA und 4 Tropfen Biotin inkubiert. Als nächstes inkubierte man sie für 60 min mit dem 1. Antikörper (Mac 3 Antikörper) mit erneuter zweimaliger Waschung für jeweils 5 Minuten mit TBST. Der nachfolgende Biotin-gekoppelte 2. Antikörper (Mac Ak) wurde für 30 min auf den Schnitten belassen und danach für 2 x 5 Minuten mit TBS herausgewaschen. Zur Färbung wurde der Vektostain ABC Reagenz verwendet. Mit dem die Schnitte für 30 Minuten inkubiert wurden, dem ein Waschvorgang mit 1 x TBS 2 x für 5 min folgt. Darauffolgend wurden die Schnitte für 20 min mit Carbazol beschichtet, was als Substrat für die Peroxidase des 2. Antikörpers diente. Bevor eine Kernfärbung mit Hämalaun für 5 min erreicht werden konnte, wurden die Schnitte 2 x für 5 min mit TBS gewaschen und nach der Färbung mit Leitungswasser gereinigt. Mit der Glyceringelatine am Schluss wurde eine Haltbarmachung des Schnitts erreicht.

2.11. ELISA (= Enzymverbundene Immunosorbente Probe) zur Bestimmung von Gesamt IgG / Anti CAR 4/7- IgG

Der IgG / Anti CAR 4/7 ELISA ermöglicht eine quantitative Bestimmung der Mäuse IgG / Anti CAR 4/7 im Serum. Der ELISA ist ein Fünfschrittverfahren.

Zur Bestimmung von CAR 4/7- spezifischen Antikörpern wurde die Platte mit reinem isoliertem CAR 4/7 Protein beschichtet, die gegen IgG gerichtet sind. Hierfür wurde für jedes Well 1 µl des CAR 4/7 Proteins mit 100 µl Coating Buffer verdünnt und für 60 min inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte die Aspiration dieser und ein 3-facher Waschvorgang jedes Wells mit 200 µl Waschlösung. Der nachfolgende zweite Schritt ist die Blockierung. Dazu wurde jedes Well mit 200 µl Blockierlösung beschichtet und für 30 min inkubiert. Nach der Inkubation wurde diese entfernt und erneut dreimal mit 200 µl pro Well Waschlösung gewaschen. Der dritte Schritt bestand darin, die Platte mit den Mausseren in einer 1:1600 Verdünnung für 30 min zu beschichten und danach 5 x mit der Waschlösung zu je 200 µl pro Well zu waschen. Im vorletzten Schritt wurden die Wells mit 100 µl HRP- Detection Antibody in einer 1:50000 Verdünnung belegt und im Anschluss für 60 min erneut fünfmal mit der Waschlösung gewaschen. Im letzten Schritt fand die Enzym Substrat Reaktion statt. Hierzu wurde die Platte mit 100 µl pro Well mit Substratlösung für 30 min inkubiert und anschließend mit einer 0,5 M H₂SO₄ Stopplösung gemischt, um mit Hilfe eines Photometers (bei 450/490 nm) die Konzentration der Antikörper zu messen.

2.12. Materialienliste

2.12.1. Chemikalien

ABC- Komplex	Vektor, USA
Aceton	Sigma, Taufkirchen
Albumin	Sigma, Taufkirchen
Alkalische Phosphatase	Sigma, Taufkirchen
3- Amino- 9- Ethylcarbazol	Sigma, Taufkirchen
Ampicillin	Sigma, Taufkirchen
Anti-Rabbit Peroxidase	DAKO, Hamburg
Avidin	DAKO, Hamburg
BCA™- Reagent A	Pierce, USA
BCA™- Reagent B	Pierce, USA
Biotin	DAKO, Hamburg
1 % BSA	Sigma, Taufkirchen
Chloramphenicol	Sigma, Taufkirchen
Citratpuffer	Sigma, Taufkirchen
Coating-Buffer	Merck, Darmstadt
Coomassie- Färbelösung	Heidelberg
DTT (1 %)	Sigma, Taufkirchen
E. coli	Merck, Darmstadt
Essigsäure 0,2 M	Sigma, Taufkirchen
Ethanol	Sigma, Taufkirchen
Ethanolamin	Sigma, Taufkirchen
50 % Glucose	Merck, Darmstadt
Glyceringelatine	Sigma, Taufkirchen
Hämalaun	Merck, Darmstadt
Hepes	Sigma, Taufkirchen
Salzsäure (HCl)	Sigma, Taufkirchen
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄ 0,5 M)	Sigma, Taufkirchen
Imidazolösung (20 mM / 150 mM)	Sigma, Taufkirchen
IPTG	Sigma, Taufkirchen

Kaliumchlorid	Sigma, Taufkirchen
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck, Darmstadt
Methanol	Sigma, Taufkirchen
Milchpulver	Biorat
Natriumacetat	Sigma, Taufkirchen
Natriumcarbonat (pH 9,6) 0,05 M	Sigma, Taufkirchen
Natriumchlorid	Sigma, Taufkirchen
Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Sigma, Taufkirchen
Natronlauge (NaOH)	Sigma, Taufkirchen
Ni- NTA Superflow	Sigma, Taufkirchen
N, N- Dimethylamid	Sigma, Taufkirchen
10 % Normalserum	Sigma, Taufkirchen
Nu Page LDS Sample-Buffer (4X) (2 %)	Sigma, Taufkirchen
OPD	Sigma, Taufkirchen
Pepsin	DAKO, Hamburg
Plasmid DNA (pRSET- SCAR)	Merck, Darmstadt
Protease- Inhibitor	Sigma, Taufkirchen
sCAR- Human	Merck, Darmstadt
sCAR- Maus	Merck, Darmstadt
Start- Solution	Sigma, Taufkirchen
Steriles Wasser	Sigma, Taufkirchen
Transferpuffer	Invitrogen, UK
Tris	Sigma, Taufkirchen
Trizma Base	Sigma, Taufkirchen
Trizma HCl	Sigma, Taufkirchen
Tryptone	Sigma, Taufkirchen
Tween 0,005 %	Sigma, Taufkirchen
Urea	Sigma, Taufkirchen
Wasserstoffperoxid	Sigma, Taufkirchen
Xylol	Merck, Darmstadt
Yeast Extrakt	Sigma, Taufkirchen
Zitronensäure	Sigma, Taufkirchen

2.12.2. Antikörper

- Anti- Rabbitperoxidase DAKO, Hamburg
- 1. Antikörper: Seren der verschiedenen Tiergruppen Dörner, Berlin
- 2. Antikörper: Anti- CD 3 DAKO, Hamburg
- 2. Antikörper: Anti- Mac 3 DAKO, Hamburg
- Capture- Antibody DAKO, Hamburg
- HRP- Detection- Antibody DAKO, Hamburg

2.12.3. Lösungen und Puffer

Transformation / Impfung / Expression / Extraktion

- SOC- Medium
 - 29 g Tryptone
 - 5 g Yeast Extrakt
 - 0,5 g NaCl
 - 186 mg KCl
 - 10 ml 1M MgCl₂
 - 10 ml 50 % Glucose
 - ad 1 l steriles Wasser, einstellen auf pH 7
- Z - Puffer pH 8
 - 240,24 g 8 M Urea
 - 2,383 g 20 mM Hepes
 - 2,922 g 100 mM NaCl
 - ad 500 ml steriles Wasser

- Citrat- Puffer pH 5
5 g Zitronensäure
7 g Na₂HPO₄
ad 25 ml steriles Wasser

SDS- Polyacrylelektrophorese

- Probepuffer
500 µl Nu Page LDS Sample Buffer (4X) (2 %)
100 µl DTT (1 %)
400 µl steriles Wasser

Western- Blot

- Blot- Puffer
50 ml Transferpuffer
200 ml 100 % Methanol
ad 1 l destilliertes Wasser
- Blockierlösung
2,5 g Milchpulver
ad 50 ml TBST
- 10x TBS pH 7,6- 7,8
30,3 g Tris
40,3 g NaCl
1 g KCl
ad 1 l destilliertes Wasser

- TBST
100 ml 10 X TBS
500 µl 0,005% Tween
ad 1 l destilliertes Wasser

Immunhistologie

- Pepsin für die Demaskierung
80 ml Aqua dest.
20 ml 1 N HCL
0,4 g Pepsin
- 0,9 % H₂O₂ in Aqua dest.
6 ml 30 % H₂O₂
ad 200 ml Aqua dest.
- Carbazolfärbelösung
50 mg 3- Amino- 9- Ethylcarbazol
10 mg N, N- Dimethylamid
15 ml 0,2 M Essigsäure
35 ml 0,2 M Natriumacetat
100 µl H₂O₂
ad 200 ml steriles Wasser
- Stammlösung BSA
500 mg BS
5 ml 1x TBS

ELISA

- **ELISA- Substrat- Buffer**
25 ml Citratpuffer (pH 5)
10 mg OPD
8,3 µl 30 % H₂O₂

- **Start- Solution 10 x**
30,27 g 500 mM Tris (pH 8,0)
40,9 g 1,4 M NaCl
ad 500 ml steriles Wasser

- **Wash- Solution**
100 ml 1x Start- Solution
500 µl 0,05% Tween
ad 1 l steriles Wasser

- **Blocking- Solution**
25 ml 1x Start- Solution
2,5 g 1 % BSA
ad 250 ml steriles Wasser

- **Dilution- Buffer**
25 ml 1x Start- Solution
2,5 g 1 % BSA
125 µl 0,05 % Tween
ad 250 ml steriles Wasser

2.13. Statistik

Für die statistische Auswertung wird aus den Einzelwerten der jeweiligen Versuche für die entsprechende Versuchsgruppe der arithmetische Mittelwert gebildet und die Standardabweichung errechnet.

Damit die Arbeit mit anderen wissenschaftlichen kardiologischen Veröffentlichungen verglichen werden kann, wurde der Student-t-Test oder der Mann-Whitney-Test bei nicht normal verteilten Stichproben verwendet. In diesem Fall wird festgestellt, ob die Unterschiede zwischen der Versuchs- und Kontrollgruppe statistisch signifikant sind.

Irrtumswahrscheinlichkeiten von $p > 0,05$ wurden als nicht signifikant, von $p < 0,05$ als schwach signifikant, von $p < 0,01$ als signifikant und von $p < 0,001$ als hoch signifikant angesehen.

3. Ergebnisse

3.1. Expression von CAR 4/7 im bakteriellen System

Coxsackie- und Adenoviren sind Erreger viraler Herzmuskelerkrankungen, die beide an den Coxsackie-Adenovirus Rezeptor zur Zellintegration binden.

Inwieweit die nativen löslichen Formen des CAR-Rezeptors auf die CVB 3-Infektion und das Immunsystem wirken, ist bis heute nicht eindeutig bekannt. Wir untersuchten daher die Wirkung von CAR 4/7 auf die Entwicklung einer Coxsackievirus induzierten Myokarditis. Für diese Versuchsreihen wurde aufgereinigtes CAR 4/7-Protein verwendet, das im bakteriellen System überexprimiert wurde.

Zur Expression wurden E. coli Bakterien mit CAR 4/7 cDNA haltigen Plasmiden transformiert und kultiviert. Bei einer OD_{600} zwischen 0,4 - 0,6 wurde IPTG, ein Induktor der Transkription, hinzugefügt und die Expression gestartet (Abbildung 6). Die Inkubation wurde für 4 - 6 Stunden nach IPTG Gabe fortgesetzt.

Insgesamt ist das Wachstum der CAR 4/7 transformierten Bakterien stark verlangsamt, was auf eine Produktion des CAR 4/7-Proteins hindeutet. Im gesamten ist die Versuchsreihe nach 12 Stunden bei einer OD_{600} von 1,341 in der Steady-State-Phase abgebrochen worden.

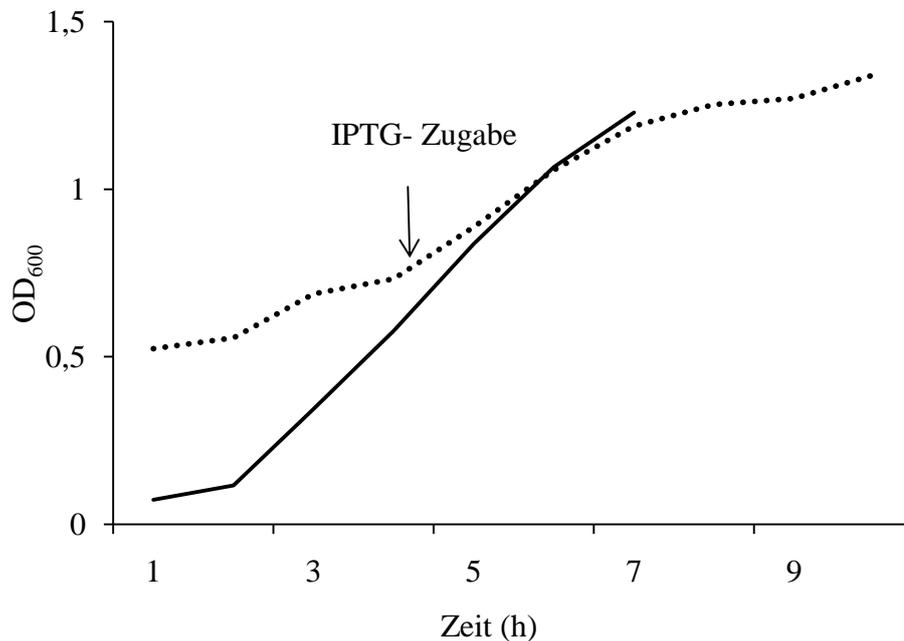


Abbildung 6: Exemplarische Wachstumskurve von CAR 4/7- exprimierenden (....) und nicht exprimierenden (—) E.coli-Bakterien bei einer Temperatur von 37 °C. Die Expression wurde bei einer OD₆₀₀ von 0,6-0,7 gestartet.

3.2. Reinigung des CAR 4/7-Proteins mittels Affinitätschromatographie

Die CAR 4/7-überexprimierenden Bakterien wurden aufgeschlossen und das His-gekoppelte CAR 4/7-Protein mittels der Ni-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt (siehe 2.4). Das an die Säule gebundene CAR 4/7 Protein wurde mit Hilfe von Imidazol haltigem Puffer von der Säule eluiert. Das Eluat wurde in Fraktionen aufgefangen und der Proteingehalt bestimmt.

Abbildung 7 zeigt exemplarisch den Verlauf des eluierten Proteins von der Affinitätschromatographiesäule. Den größten Anteil der Proteinmenge wurde in den ersten Fraktionen 3 bis 7 der Säule gewonnen, die vereinigt und weiterverwendet wurden. Die Proteinkonzentration der Peakfraktion betrug durchschnittlich 6 bis 8 µg/ml .

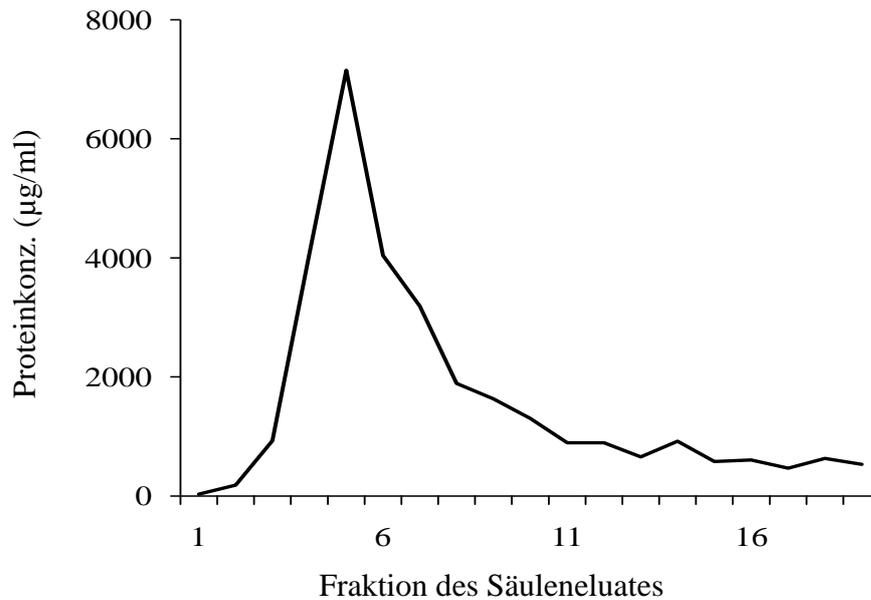


Abbildung 7: Proteinkonzentrationen der einzelnen Fraktionen nach Aufreinigung des CAR 4/7 Proteins über die Ni-NTA-Affinitätschromatographie.

3.2.1. Reinheitsgradanalyse des isolierten CAR 4/7-Proteins mittels SDS-Gelelektrophorese

Der Reinheitsgrad des isolierten CAR 4/7 Proteins nach Affinitätschromatographie wurde mittels SDS-Gelelektrophorese, wie in Abbildung 8 gezeigt, überprüft. Im Vergleich zum eingesetzten Bakterienextrakt und zu dem Säulendurchfluss befindet sich im Eluat der Affinitätschromatographie ein hoch reines Protein von 28 kDa, das der Größe von His-CAR 4/7 entspricht. CAR 4/7 ist bekannt Polymere zu bilden, die auch in der Peakfraktion nachweisbar sind.

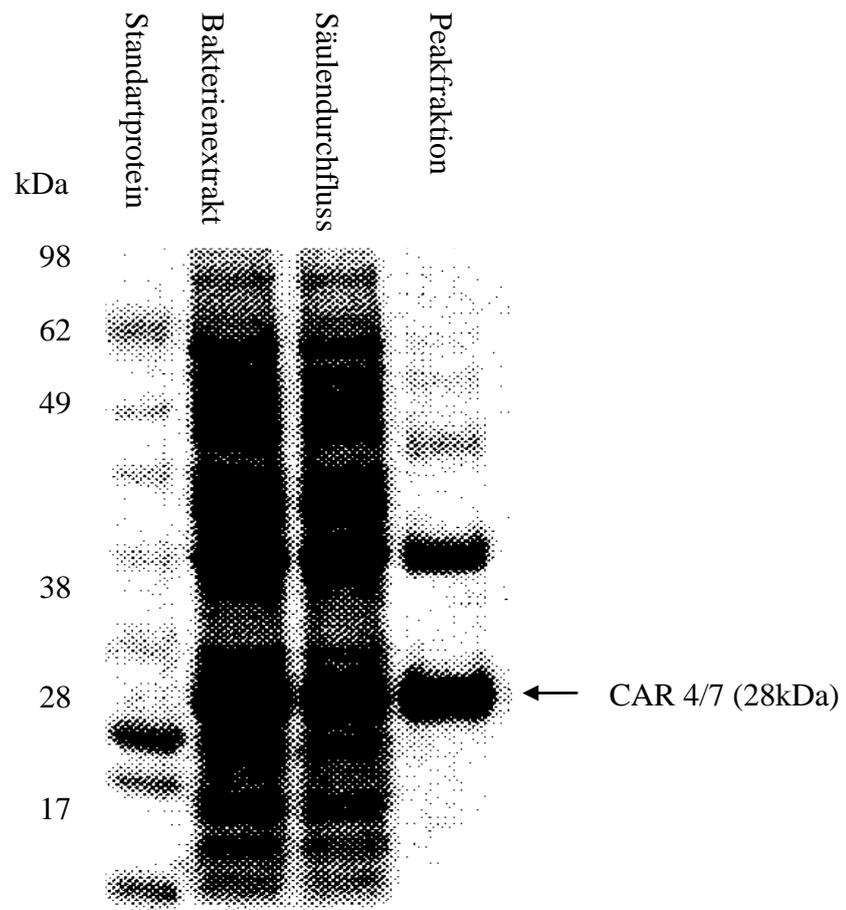


Abbildung 8 : SDS-Gelchromatographie von CAR 4/7 haltigem Bakterienextrakt, Säulendurchlauf und Eluates der Affinitätschromatographie.

3.2.2 Nachweis der Spezifität des isolierten CAR 4/7-Proteins

Unter Einsatz eines CAR spezifischen Antikörpers wurde die Spezifität des isolierten Proteins überprüft. Abbildung 9 zeigt ein deutliches CAR spezifisches Signal bei 28 kDa (Knowlton, 2008). Darüber hinaus werden Banden mit größerem Molekulargewicht sichtbar. CAR 4/7 ist bekannt Polymere zu bilden.

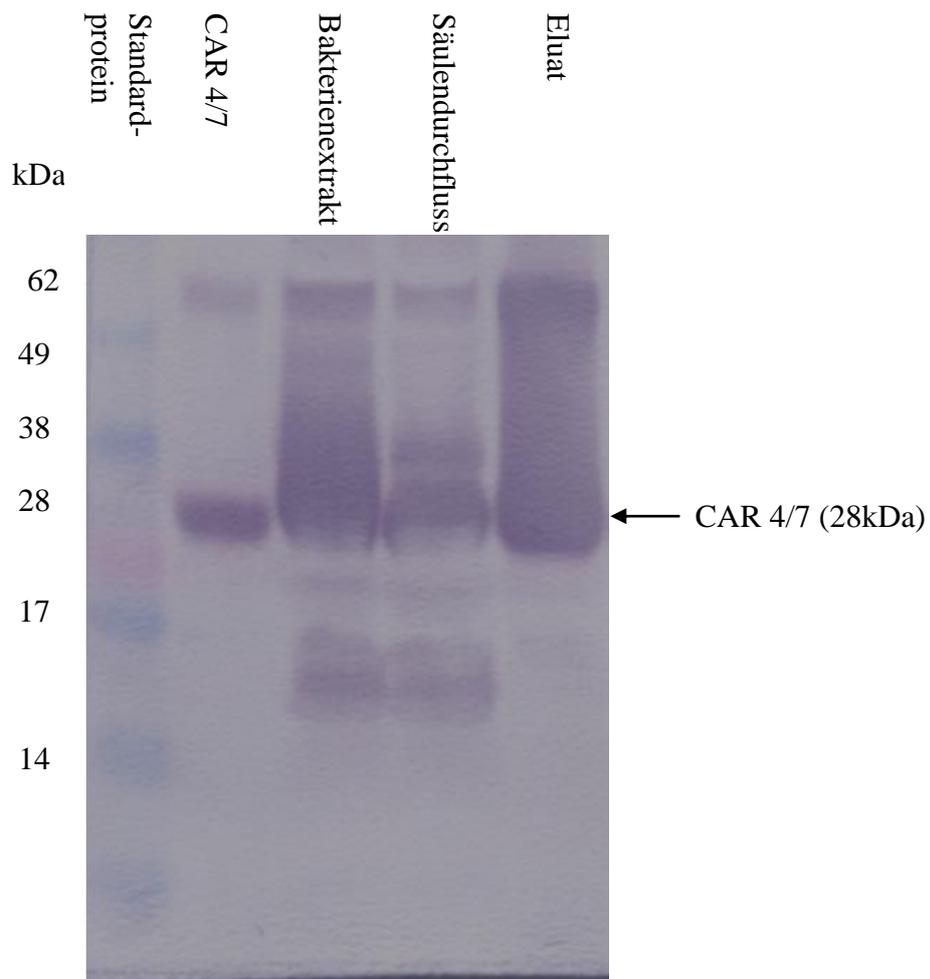


Abbildung 9: Western Blot Analyse zum Nachweis der CAR 4/7 Spezifität des extrahierten Proteins aus dem Bakterienextrakt, Säulendurchfluss und Eluats. Verwendet wurde ein CAR spezifischer AK (Dörner et al., 2006)

3.3 Wirkung von CAR 4/7 auf die CVB 3 induzierte Myokarditis in BALB / c Mäusen

3.3.1.1 Analyse der unspezifischen humoralen Immunreaktion

In einer Versuchsreihe wurden 4 Wochen alte BALB / c Mäuse über 7 Tage mit dem CAR 4/7-Protein bzw. Puffer (als Kontrolle) behandelt. Am 3. Tag der Behandlung wurden jeweils die Hälfte der Tiere mit dem CVB 3 Virus infiziert. Nach 3 und 6 Tagen nach der Infektion wurden diese Tiere zur Untersuchung getötet, sowie Blut und Herz entnommen.

Zur Untersuchung der unspezifischen humoralen Immunreaktion wurde der Gesamt IgG Gehalt im Serum der Tiere quantifiziert.

In Abbildung 10 A wird deutlich, dass die CAR 4/7 Behandlung 3 Tage nach Infektion unabhängig von der CVB 3 Infektion zum Anstieg des IgG's führt. Auch die CVB 3 Infektion resultiert in einer gesteigerten humoralen Immunreaktion. Die Behandlung von CVB 3 infizierten Mäusen mit CAR 4/7 induziert einen zusätzlichen Anstieg des Serum IgG's.

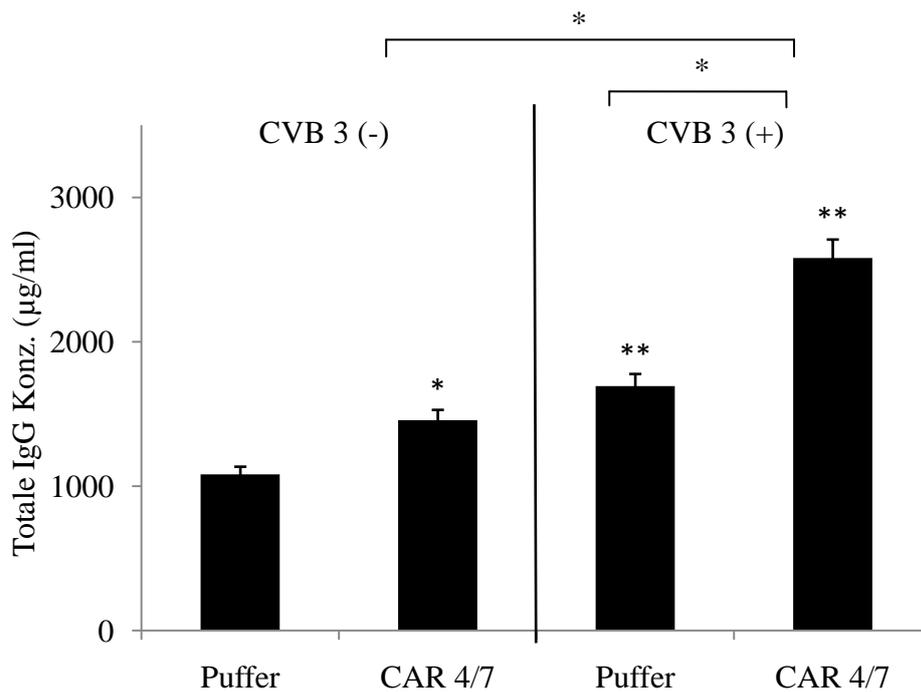


Abbildung 10 A: IgG Gesamtkonzentration der mit Puffer oder mit CAR 4/7 behandelten nicht infizierten (CVB 3 (-)) bzw. infizierten (CVB 3 (+)) Tieren 3 Tage nach Infektion. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

6 Tage nach der Infektion hat der virale Infekt keinen Einfluss auf die Konzentration des Gesamt IgG's im Serum der infizierten Tiere. Hingegen bewirkt eine Behandlung der Tiere mit dem CAR 4/7-Protein sowohl in den infizierten als auch in den nicht infizierten eine signifikante Aktivierung des humoralen Immunsystems.

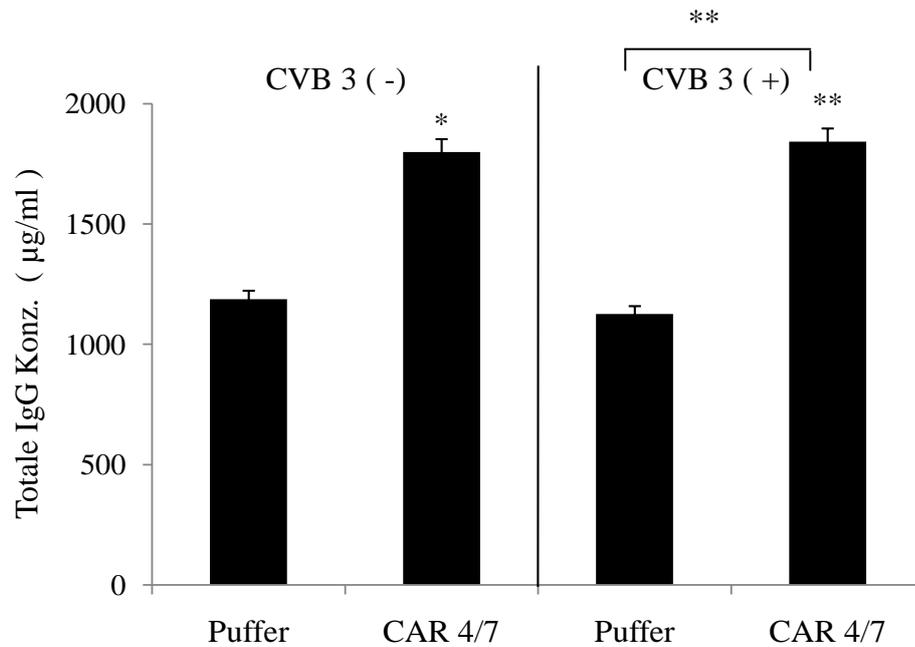


Abbildung 10 B: IgG Gesamtkonzentration der mit Puffer oder mit CAR 4/7 behandelten nicht infizierten (CVB 3 (-)) bzw. infizierten (CVB 3 (+)) Tieren 6 Tage nach Infektion. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

3.2.1.2 Analyse der CAR spezifischen humoralen Immunreaktion

Mit Hilfe eines CAR 4/7 spezifischen ELISA's wurde die Konzentration von CAR 4/7 spezifischen Antikörpern im Serum der Tieren bestimmt.

Die CAR 4/7 Behandlung resultiert in einer deutlichen Bildung von CAR 4/7 spezifischen Antikörpern sowohl in infizierten (CVB 3 (+)) als auch in den nicht infizierten (CVB 3 (-)) Tieren (Abbildung 11 A).

Bei denen mit Puffer behandelten Tieren war eine Bildung von CAR 4/7 spezifischen Antikörpern nicht nachweisbar. Auch die CVB 3 Infektion zeigt keinen Einfluss auf die Produktion von CAR 4/7 Antikörpern. Das gleiche Bild zeigt sich 6 Tage nach Infektion (Abbildung 11 B).

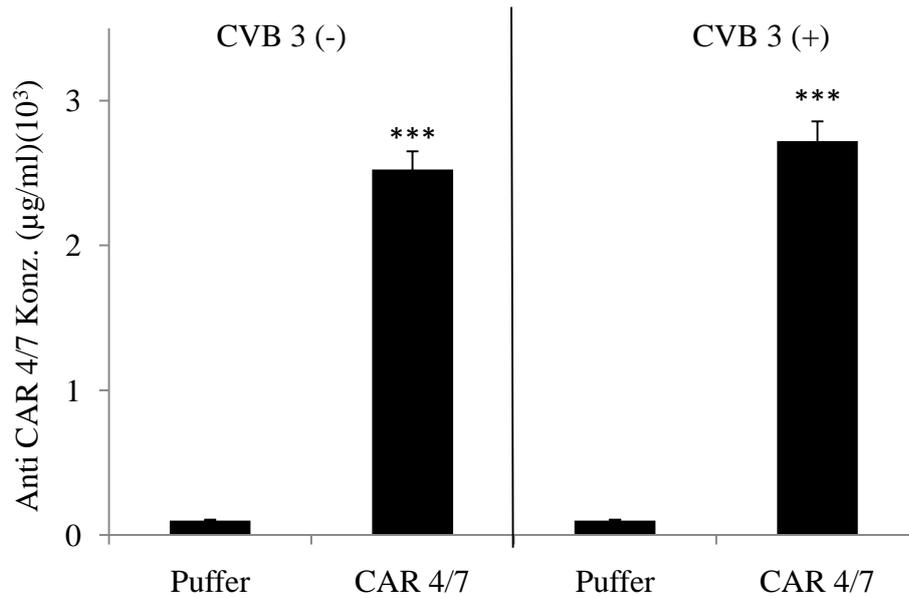


Abbildung 11 A: Gesamtkonzentration der CAR 4/7 spezifischen Antikörper der mit Puffer oder mit CAR 4/7 behandelten nicht infizierten (CVB 3 (-)) bzw. infizierten (CVB 3 (+)) Tieren 3 Tage nach Infektion. *p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

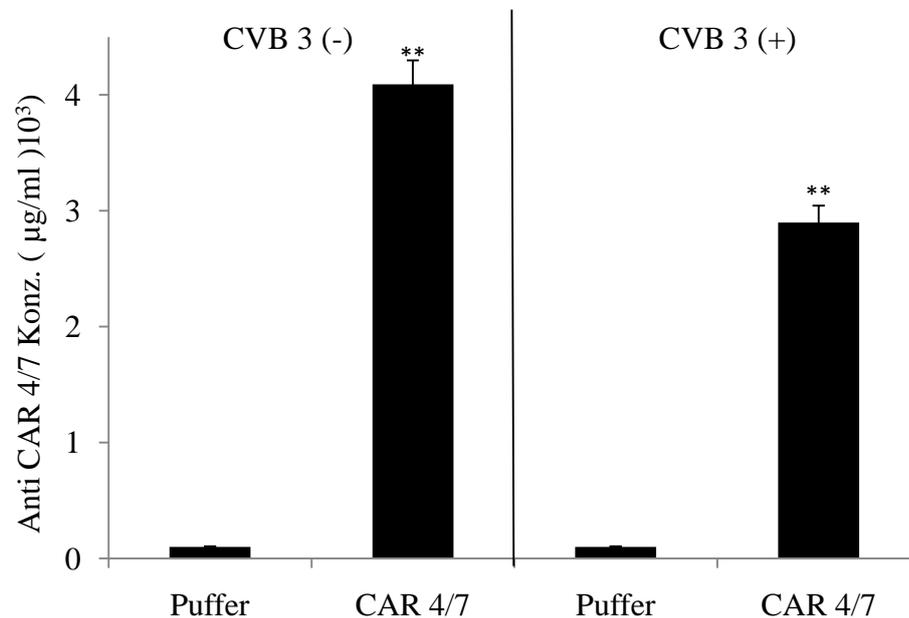


Abbildung 11 B: Gesamtkonzentration der CAR 4/7 spezifischen Antikörper der mit Puffer oder mit CAR 4/7 behandelten nicht infizierten (CVB 3 (-)) bzw. infizierten (CVB 3 (+)) Tieren 6 Tage nach Infektion. *p < 0,05, ** p < 0,01.

3.3.1.3 Spezifischer Nachweis der CAR 4/7 Antikörper mittels Western Blot

Zur weiteren Charakterisierung der His-CAR 4/7 reaktiven Antikörper wurden Western- Blot-Analysen durchgeführt. Dazu wurde gereinigtes CAR 4/7 als auch extrahiertes Herzprotein einer weder infizierten noch behandelten Maus gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Membran übertragen. Die Membran wurde mit den Seren von CAR 4/7 infizierten (CVB 3 (+)) und nicht infizierten (CVB 3 (-)), sowie mit Puffer behandelten nicht infizierten Mäusen inkubiert (Abbildung 12).

Die Western Blots bestätigen die CAR spezifische Reaktivität der Seren CAR 4/7 behandelte Mäuse. Sie detektieren sowohl das denaturierte CAR 4/7-Protein als auch den membranständigen CAR im Herzgewebe. Natives CAR 4/7 konnte im Mausherz nicht identifiziert werden (Abbildung 13).

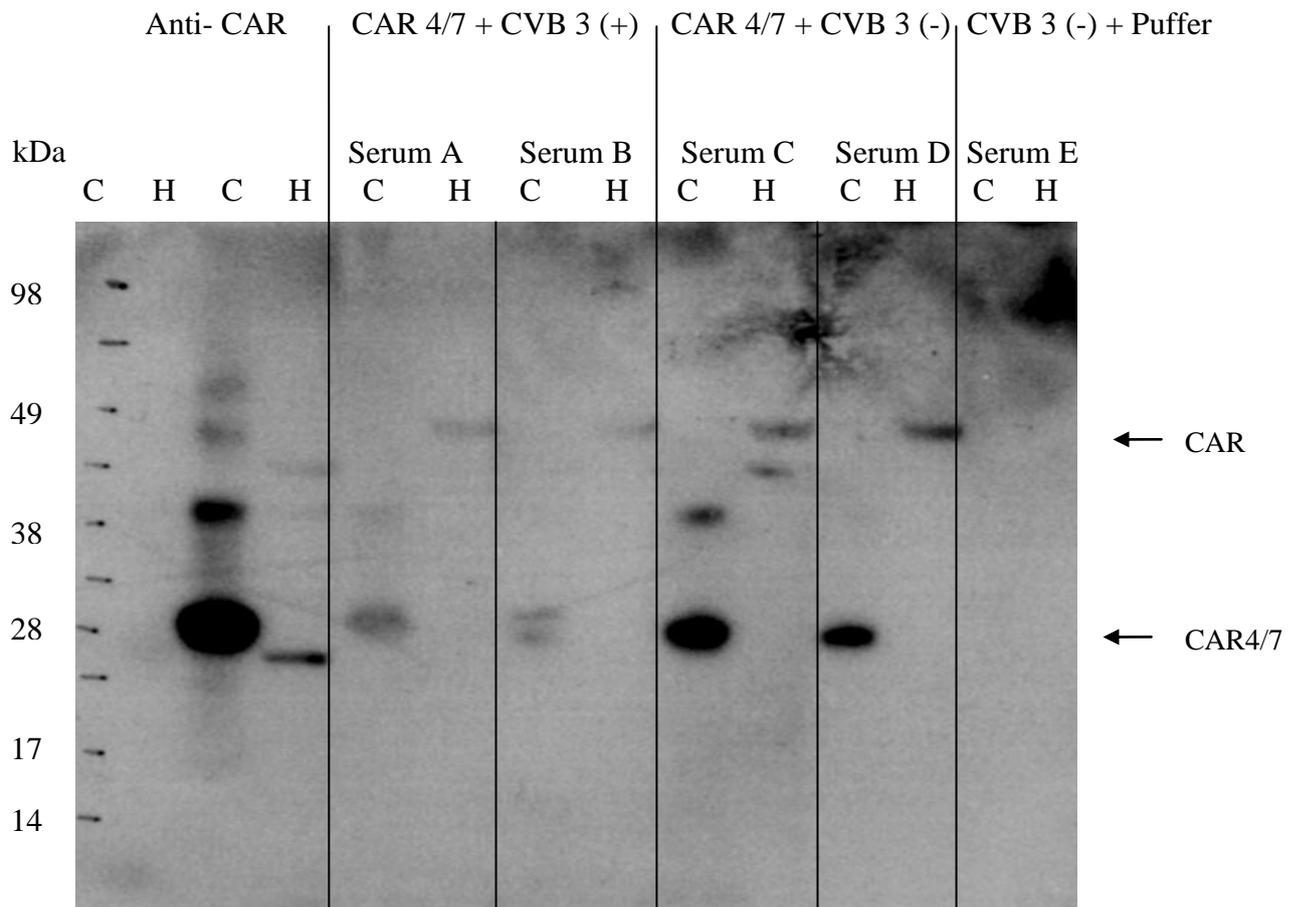


Abbildung 12: Spezifischer Nachweis der CAR 4/7 Antikörper der mit Puffer oder mit CAR 4/7 behandelten nicht infizierten (CVB 3 (-)) bzw. infizierten (CVB 3 (+)) Tieren.

3.3.2.1 Analyse der zellulären Immunantwort im Myokard der behandelten Mäuse nach Induktion der Myokarditis

In den vorhergehenden Untersuchungen wurde gezeigt, dass CAR 4/7 Behandlungen zur Aktivierung des humoralen Immunsystems führt. In wieweit das myokardiale Gewebe von der CAR 4/7 Behandlung und der CVB 3 Infektion betroffen ist, wurde histologisch nach Infektion analysiert (Abbildung 13).

3 Tage nach der Infektion konnten noch keine zellulären Infiltrationen nachgewiesen werden. Im Vergleich zu Puffer behandelten nicht infizierten Herzgewebe (Bild A) führt die alleinige CAR

4/7 Behandlung 6 Tage nach der Infektion zu keinen histologisch nachweisbaren Gewebsveränderungen (Bild B). Die Analyse der Herzgewebsstruktur zeigt keine Myozytolyse, die Muskelfaserzüge sind intakt (Bild A und B).

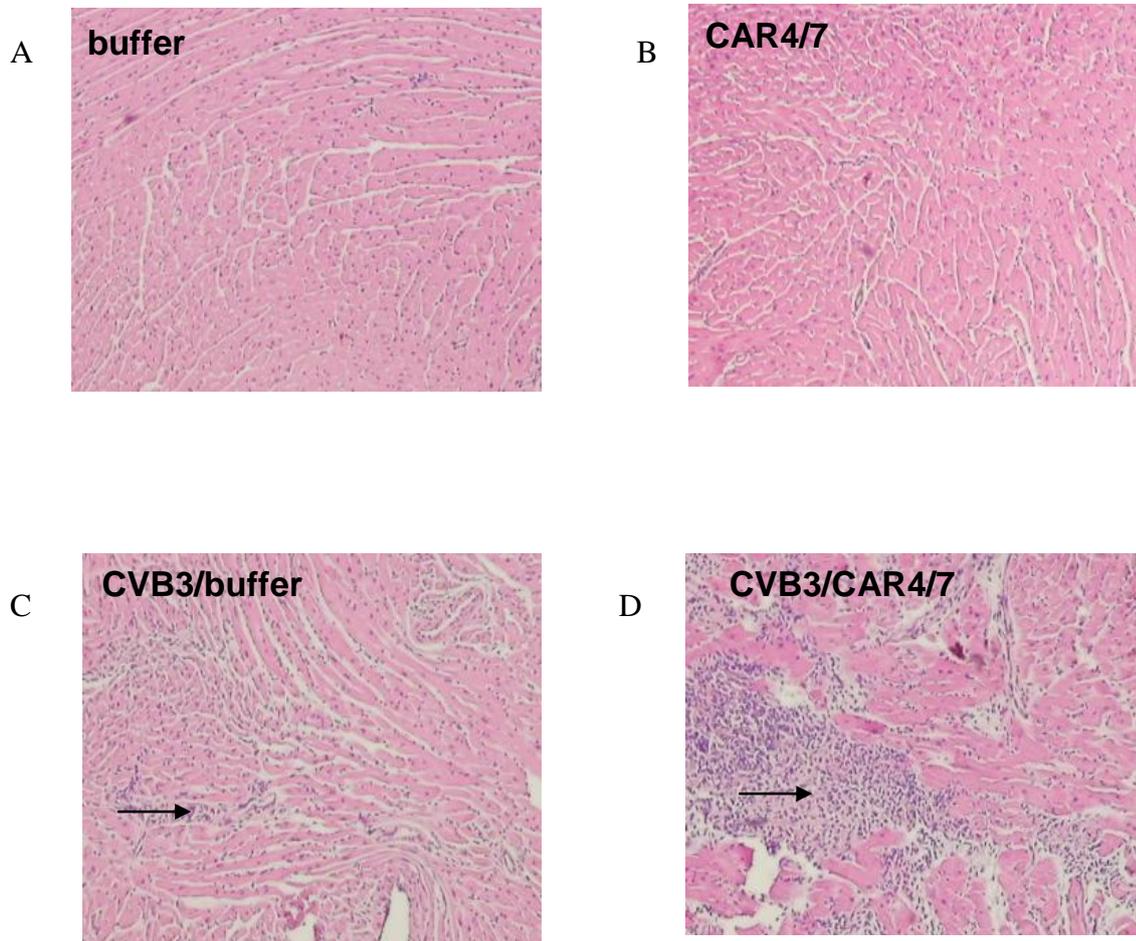


Abbildung 13: Quantifizierung der immunhistologisch nachgewiesenen myokardialen Entzündung und Gewebsschäden im Herzen von Puffer, CAR 4/7 behandelten (CVB 3 (+)) und nicht behandelten (CVB 3 (-)) Mäusen.

Deutliche zelluläre Infiltrate und Myozytolyse lassen sich im Herzgewebe von CVB 3 infizierten, Puffer behandelten Mäusen beobachten (Bild C). Die zusätzliche Behandlung der CVB 3 infizierten Mäuse mit CAR 4/7 führt zu einer massiven Erhöhung der zellulären Immunantwort in den infizierten Herzen. Die Gewebe weisen großflächige Läsionen und starke intrazelluläre Infiltrationen mit immunkompetenten Zellen auf (Bild D).

3.3.2.2 Makrophageninfiltration im Herzen der behandelten Tiere

Mittels immunhistologischer Färbung wurden die Makrophagen im Herzen der behandelten Tiere quantifiziert.

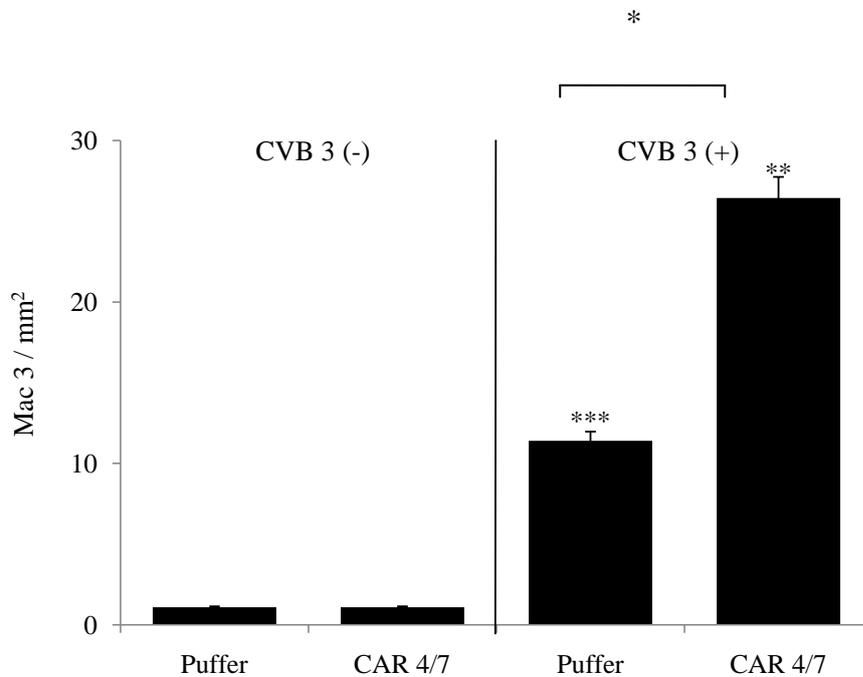


Abbildung 14: Quantifizierung der immunhistologisch nachgewiesenen Makrophagen im Herzgewebe von

Puffer, CAR 4/7 behandelten infizierten (CVB 3(+)) und nicht infizierten (CVB 3(-)) Mäusen.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Wie aus der histologischen Analyse erwartet führt eine alleinige CAR 4/7 Behandlung zu keiner signifikanten Erhöhung der Makrophageninfiltration im Herzen nicht infizierter Tiere (CVB 3(-)).

Im Vergleich dazu kommt es zu einer deutlichen Zunahme der Makrophagen in mit Puffer behandelten, infizierten Mäusen (CVB 3(+)). Die Makrophageninfiltration wird durch eine vorherige CAR 4/7 Behandlung in infizierten Mäusen (CVB 3(+)) gesteigert.

4. Diskussion

CAR gehört der Immunglobulin-Superfamilie an. Mitglieder dieser Proteingruppe sind in die embryonische Entwicklung, Immunreaktion und den Zell-Zell-Kontakt involviert (Cohen et al., 2001). Mehrere dieser Proteine wie z.B. ICAM und CAR wirken auch als Virusrezeptoren (Bergelson et al., 1997) (He et al., 2001). Eine der Eigenschaften der Immunglobuline ist, dass viele der Gene lösliche Rezeptoren produzieren, bei denen der transmembrane und der zytosolische Teil des Rezeptors fehlt. Die löslichen Rezeptoren werden durch proteolytische Spaltung des ursprünglichen Rezeptors oder durch alternatives Splicing erzeugt. Lösliche Rezeptoren können wie z.B. der lösliche Rezeptor von TNF-alpha Rezeptors als Antagonist wirken, indem sie die Ligandenbindungsstelle des membranständigen Rezeptors besetzen und sie für den Liganden blockieren (Seckinger et al., 1990). Andererseits können Sie auch als Agonist wirksam sein und die Ligandenbindung wie beim Interleukin-6 Rezeptor verstärken (Harmegnies et al., 2003). So sind die löslichen Rezeptoren an der Regulation der biologischen Tätigkeit des Rezeptors und ihrer Liganden beteiligt.

Es konnten vier gespaltene Isoformen von CAR: CAR 2/7, CAR 3/7, CAR 3'/7 und CAR 4/7, identifiziert und analysiert werden, bei denen der transmembranöse Teil fehlt und sie als lösliche CAR-Proteine aus der Zelle entlassen werden (Dörner et al., 2004) (Thoelen et al., 2001). CAR dient somit nicht nur als Rezeptor für das Virus, sondern lösliches CAR spielt bei der Virusreduktion *in vitro* eine Rolle (Dörner et al., 2004). Die Behandlung von CVB 3 infizierten Hela-Zellen mit CAR 4/7 und CAR 3/7 führte zu einer signifikanten Senkung des Virustiters. Weiterhin senkte die Behandlung von CVB 3 infizierten Mäusen mit CAR 4/7 die myokardiale Viruslast um ca. 60% (Dörner et al., 2006). Im Rahmen dieser Promotionsarbeit sollte geklärt werden, welchen Einfluss die CAR 4/7 Behandlung auf das Immunsystem dieser Tiere nimmt.

Erste Ergebnisse gewannen wir durch die Analyse der humoralen Immunantwort mittels ELISA und Western Blot. Anhand des ELISA´s konnten wir nachweisen, dass es bei CAR 4/7 behandelten Mäusen 3 Tage nach der Infektion unabhängig von der CVB 3 Infektion zu einem deutlichen Anstieg des Gesamt IgG- Gehaltes im Serum kommt. Die Behandlung von CVB 3 infizierten Mäusen mit CAR 4/7 induzierte einen zusätzlichen Anstieg des Serum IgG`s. 6 Tage nach der Infektion hatte der virale Infekt keinen Einfluss mehr auf die Konzentration des Gesamt IgG´s im Serum der infizierten Tiere.

Dies bedeutet, dass sowohl die CVB 3 Infektion, als auch die CAR 4/7 Behandlung die Aktivierung des Immunsystems induziert. Die Spezifität der humoralen Immunantwort auf

CAR 4/7 konnte durch die Verwendung von CAR 4/7 spezifischen ELISA`s und Western- Blot`s gezeigt werden. Die produzierten Antikörper waren sowohl gegen den membranständigen als auch gegen den löslichen CAR 4/7 reaktiv. Es entstanden Autoantikörper.

Mittels histologischer Techniken wurde eine deutliche Zunahmen der zellulären Infiltrate und Myozytolysen im Herzgewebe von CVB 3 infizierten Mäusen beobachtet. Die Behandlung der CVB 3 infizierten Mäuse mit CAR 4/7 führte zusätzlich zu einer massiven Erhöhung der zellulären Immunantwort in den infizierten Herzen. Der Makrophagengehalt war in den infizierten Herzen deutlich erhöht und wurde durch die CAR 4/7-Behandlung gesteigert.

Bei den nicht infizierten, CAR 4/7 behandelten Tiere zeigten sich jedoch keine zellulären Infiltrationen oder Gewebsschädigungen. Somit führt eine CAR 4/7 Behandlung einerseits zu einer deutlichen Senkung der Viruslast, andererseits zu einer Steigerung der zellulären und humoralen Immunität.

Frühere Studien ergaben, dass lösliches CAR 4/7 Protein sowohl an das Coxsackievirus als auch an CAR bindet (Dörner et al., 2004). Daraus ergeben sich zwei Möglichkeiten der Virusblockierung nach CAR 4/7 Behandlung der CVB 3 infizierten Mäuse. Einerseits konkurriert CAR 4/7 mit dem membranständigen CAR um das Virus und / oder CAR 4/7 bindet an membranständiges CAR. In beiden Fällen wird die Bindung von CVB 3 an den membranständigen CAR blockiert und die Infektion der Zelle verhindert. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die Bindung von CVB 3 an die extrazelluläre Domäne des CAR zur Formation von A- Partikeln führt, die durch den Mangel an VP 4 Protein und den Verlust ihrer Infektiosität charakterisiert sind (Goodfellow et al., 2005). Da CAR 4/7 den größten Teil der extrazellulären Domäne besitzt, ist die Produktion von nicht infizierten A- Partikeln durch CAR 4/7 denkbar.

Die Ergebnisse zeigen, dass die CAR 4/7 Behandlung zur Produktion von CAR spezifischen Antikörpern führt. Diese Antikörper reagieren sowohl mit membranständigem CAR, als auch mit der löslichen CAR 4/7 Isoform. Des Weiteren waren die Antikörper reaktiv gegen nicht-infiziertes Herzgewebe und CAR transfizierte Zellen (Dörner et al., 2006). Bergelson et al. zeigten das sich eine CVB 3 Infektion *in vitro* mit CAR spezifischen Antikörpern blockieren ließ (Bergelson et al., 1995). Die Produktion von CAR spezifischen Antikörpern kann somit zur Senkung der Viruslast in den Herzen der CVB 3 infizierten Tieren beigetragen haben.

Trotz reduzierter kardialer Viruslast beobachteten wir eine Zunahme der Infiltration des Herzens mit immunkompetenten Zellen und eine gesteigerte Myozytolyse. Die Detektion von Autoantikörpern wie z.B. Myosin und die Adenin Nukleotid Translokase bei CVB 3 induzierter Myokarditis wies auf autoimmunologische Prozesse bei der myokardialen Entzündung und

Herzschädigung hin (Dörner et al., 2005) (Tomko et al., 2000). Neu und Schulze zeigten in ihren Studien, dass herzreaktive Antikörper einen schädigenden Einfluss auf das Myokardgewebe haben. Die Immunisierung mit myokardialem Myosin oder mit der Adenin Nukleotid Translokase führten zu kardialen Entzündungsreaktionen und zur Autoimmunmyokarditis (Neu et al., 1987) (Schulze et al., 1989). Außerdem resultierte der Transfer von spezifischen Autoantikörpern gegen den Adenin Nukleotid Translocator und den β 1 adrenergen Rezeptor Troponin I in Nagetieren in Herzschädigung und Kardiomyopathie (Jahns et al., 2004) (Okazaki et al., 2003) (Schwimbeck et al., 1994). CAR- spezifische Antikörper mit autoreaktiver Kapazität gegen myokardiales Gewebe könnten demnach durchaus zur Steigerung der Immunreaktion im virusgeschädigten Herzgewebe beitragen. Der virale Trigger scheint in unserem Modell signifikant zu sein, da die Behandlung mit CAR 4/7 allein keine Autoimmunmyokarditis im getesteten Zeitrahmen verursacht. Es wäre allerdings zu klären, ob die Behandlung mit CAR 4/7 über einen längeren Zeitraum durch die Produktion von Autoantikörpern gegen CAR eine Myokarditis unabhängig von der CVB 3 Infektion induziert und ob diese zum Repertoire der Autoantikörpers, welcher Herzschäden verursacht, hinzugefügt werden kann.

Yanagawa et al. beschrieben in CVB 3 infizierten Mäusen den effizienten antiviralen und anti-entzündlichen Effekt von löslichem CAR Protein, das aus zwei komplementen humanen extrazellulären CAR Domäne bestand, die sie mit einem Fc-Fragment fusioniert hatten (Yanagawa et al., 2004). Im Gegensatz zu unserem Ergebnis könnte die Unterdrückung der myokardialen Entzündung durch die Fc-Domäne, die allein einen antiviralen Effekt und immunsuppressive Funktion hat, erklärt werden. Eine Immunglobulintherapie wurde erfolgreich angewendet bei Myokarditiden, die durch CVB verursacht worden (Takada et al., 1995).

Die Behandlung mit löslichem CAR 4/7 ohne die autoimmunsuppressive Wirkung der Fc Domäne unterstützte jedoch den progressiven Verlauf der viralen Myokarditis. Parallel zu dieser Studie waren wir bemüht, die Expression löslicher CAR Proteine bei der Maus nachzuweisen (Kulanoglu, 2008). Erstaunlicherweise ließ sich eine solche Expression wie sie beim Menschen auftritt trotz hoher Homologie der Gene im murinen Organismus nicht detektieren. Somit mag CAR 4/7 vom murinen Organismus als Fremdprotein erkannt worden sein und zur Produktion der Autoantikörper geführt haben.

Bei weiteren Untersuchungen zur CVB 3 Reduktion im Myokardium infizierter Mäuse zeigte sich, dass CAR 4/7 behandelte Mäuse, die 3 anstatt 6 Tagen nach der Infektion getötet wurden, noch keine signifikante Infiltration mit immunkompetenten Zellen oder Gewebsschädigungen

aufwiesen, jedoch eine Reduktion des myokardialen Virustiter zeigten (Dörner et al., 2006). Daraus lässt sich schließen, dass das Vorhandensein einer hohen zellulären Immunreaktion im Herzen der CAR 4/7 behandelten, CVB 3 infizierten Mäuse nicht verantwortlich ist für die myokardiale Virusreduktion.

Zusammengefasst wurde gezeigt, dass CAR 4/7 die kardiale Viruslast unabhängig vom zellulären Immunsystem schon im Frühstadium der Erkrankung senkt, jedoch in seiner monovalenten Form zur Produktion von Autoantikörpern führt, die zur Senkung der kardialen CVB 3 Infektion beitragen können. Allerdings induziert die CAR 4/7 Behandlung durch autoimmunologische Reaktionen eine Verstärkung der zellulären Immunantwort in den Herzen der CVB 3 infizierten Tieren, was herzscheidend wirkt. Für einen therapeutischen Ansatz müssten weitere Anstrengungen unternommen werden, die Autoantigenität des löslichen CAR-Proteins zu unterdrücken.

4.1. Zusammenfassung

Der Coxsackie- Adenovirus Rezeptor (CAR) ist ein Protein, welches der Immunglobulin Superfamilie angehört. CAR spielt eine Rolle bei der embryonalen Entwicklung, Immunreaktion und beim Zell-Zell-Kontakt. Daneben dient er dem Coxsackievirus B3 und Adenovirus als Virusrezeptor. CAR bildet durch Proteolyse und alternatives Splicing lösliche Rezeptoren, die wie für andere lösliche Rezeptoren gezeigt wurde antagonistische und/oder agonistische Wirkung auf den membranständigen Rezeptor ausüben könnten. Lösliches CAR zeigte *in vitro* antivirale Effekte, und wurde von uns erfolgreich zur myokardialen Virusreduktion CVB 3 infizierter Mäuse eingesetzt. In dieser Studie sollte spezifisch geklärt werden, welchen Einfluss die Behandlung mit löslichem CAR 4/7 auf das Immunsystem dieser CVB 3 infizierten Mäusen ausübt.

Die humorale Immunantwort wurde mittels ELISA und Western Blot analysiert. Zur Beschreibung der zellulären Immunantwort im Myokard wurden histologische und immunhistologische Analysen am Myokard CAR 4/7 behandelten, CVB 3 infizierten Mäuse im Vergleich zu nicht-infizierten und unbehandelten Tieren durchgeführt.

Sowohl die Behandlung mit CAR 4/7 als auch die CVB 3 Infektion induzierte unabhängig voneinander eine Erhöhung des Gesamt IgG- Gehaltes im Serum der Tiere. Die Behandlung von CVB 3 infizierten Mäusen mit CAR 4/7 führte zu einem additiven Effekt. Die Gabe von CAR 4/7 verursachte die Produktion von CAR spezifischen Antikörpern, die mit membranständigen und löslichen CAR interagierten. Es entstanden Autoantikörper.

Mittels histologischer Analysen wurde eine myokardiale Infiltration mit immunkompetenten Zellen und Myozytolyse im Herzgewebe von CVB 3 infizierten Mäusen beobachtet. Die Behandlung der CVB 3 infizierten Mäusen mit CAR 4/7 führte zudem zu einer massiven Erhöhung der zellulären Immunantwort in den infizierten Herzen; die Makrophageninfiltration nahm deutlich zu. Bei den nicht infizierten, CAR 4/7 behandelten Tieren zeigten sich jedoch keine zellulären Infiltrationen oder Gewebsschädigungen.

Die Reduktion der Viruslast mag zum einen durch die direkte Interaktion von CAR 4/7 mit dem Virus herrühren, die zur Blockierung der Bindung von CVB 3 an den membranständigen CAR und zur Senkung der Zellinfektion führt. Die Produktion von CAR spezifischen Antikörpern, die die Bindungsstelle an den Rezeptor für das Virus blockieren, scheint den antiviralen Effekt zu verstärken. Eine Senkung der Viruslast durch das zelluläre Immunsystem im Herzen kann jedoch ausgeschlossen werden, da eine Reduktion des myokardialen Virustiters schon vor der Aktivierung der myokardialen Infiltration mit immunkompetenten Zellen erfolgte.

Somit eignet sich eine CAR 4/7 Behandlung zur Senkung der myokardialen Viruslast, führt jedoch zu autoimmunologischen Reaktionen und zur Steigerung der zellulären und humoralen Immunität im Herzen.

5. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
BCA	Bichinon Säure
°C	Grad Celsius
CAR	Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor
cDNA	c- Desoxyribonukleinsäure
CVA	Coxsackievirus A
CVB	Coxsackievirus B
Cu	Kupfer
DAF	Decay- accelerating factor
dest.	destilliert
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EKG	Elektrokardiogramm
ELISA	Enzyme- linked Immunosorbent Assay
FEM	Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin
HCl	Salzsäure
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HRP	Detection - Antibody
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IPTG	Isopropyl β - D - Thiogalactosidase
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
lac	Laktose
mA	Milliampere
min	Minuten
ml	Milliliter

mm	Millimeter
MW	Megawatt
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	Natriumhydrogenphosphat
NaOH	Natronlauge
nm	Nanometer
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
RNA- Polymerase	Ribonukleinsäure- Polymerase
s	Sekunden
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SOB	Nährstoffmedium
SOC	Nährstoffmedium mit Glucose
TBS	Tris- Buffered Saline
TBST	Tris- Buffered Saline Tween
Tris	Tris (hydroxymethyl)- aminomethan / Trometamol
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
V	Volt

6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	HE (Hämatoxilin-Eosin)-Färbung eines normalen Myokardiums und einer interstitiellen Myokarditis	S 6
Abbildung 2:	Pathogenese und Immunpathogenese der Myokarditis	S 11
Abbildung 3:	Darstellung der Anzahl der unterschiedlichen Versuchsgruppen	S 15
Abbildung 4:	Map of pRSET aus Ampicillin, f 1 ori und puc ori.	S 17
Abbildung 5:	Aufbau eines Gels nach Auftrennung des Proteingemisches mittels der SDS- Gelelektrophorese	S 19
Abbildung 6:	Exemplarische Wachstumskurve von CAR 4/7-exprimierenden und nicht exprimierenden E. coli-Bakterien bei einer Temperatur von 37 °C. Die Expression wurde bei einer OD ₆₀₀ von 0,6-0,7 gestartet.	S 33
Abbildung 7:	Proteinkonzentration der einzelnen Fraktionen nach Aufreinigung des CAR 4/7 Proteins über die Ni- NTA Affinitätschromatographie.	S 34
Abbildung 8:	SDS-Gelchromatographie von CAR 4/7 haltigem Bakterienextrakt, Säulendurchlauf und Eluates der Affinitätschromatographie.	S 35
Abbildung 9:	Western Blot Analyse zum Nachweis der CAR 4/7 Spezifität des extrahierten Proteins aus dem Bakterienextrakt, Säulendurchfluss und Eluates. Verwendet wurde ein CAR spezifischer Antikörper.	S 36
Abbildung 10 A:	IgG Gesamtkonzentration der mit Puffer oder mit CAR 4/7 behandelten nicht infizierten (CVB 3 (-)) bzw. infizierten (CVB 3 (+)) Tieren 3 Tage nach Infektion.	S 37

Abbildung 10 B:	IgG Gesamtkonzentration der mit Puffer oder mit CAR 4/7 behandelten nicht infizierten (CVB 3 (-)) bzw. infizierten (CVB 3 (+)) Tieren 6 Tage nach Infektion.	S 38
Abbildung 11 A:	Gesamtkonzentration der CAR 4/7 spezifischen Antikörper der mit Puffer oder mit CAR 4/7 behandelten nicht infizierten (CVB 3 (-)) bzw. infizierten (CVB 3 (+)) Tieren 3 Tage nach Infektion.	S 39
Abbildung 11 B:	Gesamtkonzentration der CAR 4/7 spezifischen Antikörper der mit Puffer oder mit CAR 4/7 behandelten nicht infizierten (CVB 3 (-)) bzw. infizierten (CVB 3 (+)) Tieren 6 Tage nach Infektion.	S 39
Abbildung 12 :	Spezifischer Nachweis der CAR 4/7 Antikörper der mit Puffer oder mit CAR 4/7 behandelten nicht infizierten (CVB 3 (-)) bzw. infizierten (CVB 3 (+)) Tieren.	S 41
Abbildung 13:	Quantifizierung der immunhistologisch nachgewiesenen myokardialen Entzündung und Gewebsschäden im Herzen von Puffer, CAR 4/7 behandelten (CVB 3 (+)) und nicht behandelten (CVB 3 (-)) Mäusen.	S 42
Abbildung 14:	Quantifizierung der immunhistologisch nachgewiesenen Makrophagen im Herzgewebe von Puffer, CAR 4/7 behandelten infizierten (CVB 3 (+)) und nicht infizierten (CVB 3(-)) Mäusen.	S 43

7. Literaturverzeichnis

Afanasyeva M, Rose NR. Immunmediators in inflammatory heart disease: insights from a mouse model. Baltimore: Oxford Journal 2002; pp 131-136.

Alain R, Vogt P, Follath F. Myokarditis. Schweiz Med Forum 2005; 5:845-850.

Asher DR, Cerny AM, Weiler SR, et al. Coxsackievirus and adenovirus receptor is essential for cardiomyocyte development. Genesis 2005; 42(2):77-85.

Bergelson JM, Cunningham JA, Droguett G, et al. Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and Adenoviruses 2 and 5. Science 1997; 275:1320-1323.

Bergelson JM, Mohanty JG, Crowell RL, et al. Coxsackievirus B 3 adapted to growth in RD cells binds to decay-accelerating factor (CD 55). J Virol 1995; 69:1903-1906.

Carson SD, Chapman NM. Coxsackie and adenovirus receptor (CAR) binds immunoglobulins. Biochemistry 2001; 40:14324-14329.

Carson SD, Hobbs JT, Tracy SM, et al. 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.

Cohen CJ, Shieh JT, Pickles RJ, et al. The Coxsackievirus and Adenovirus Receptor is a transmembrane component of the tight junction. Proc Natl Acad Sci USA 2001; 98:15191-15196

Coyne CB, Bergelson JM. Virus-induced Abl and Fyn kinase signals permit coxsackievirus entry epithelial tight junctions. CELL 2006; 124:119-131.

Damke H, Derk DB, Hideho U, Schmid SL, Takeshi B. Dynamin GTPase mutants block endocytic vesicle formation at morphologically distinct stages. Vol 12, Issue 9 2001; 2578-2589.

Dörner A, Grunert HP, Lindig V, et al. Treatment of coxsackievirus-B3-infected BALB / c mice with the soluble coxsackie adenovirus receptor CAR 4/7 aggravates cardiac injury. *J Mol Med* 2006; 842-851.

Dörner A, Kallwellis- Opara A, Pauschinger M, Kühl M, Schultheiss HP. Cardiac autoantibodies in viral myokarditis. Saunders, Philadelphia 2005; pp 333-343.

Dörner A, Xiong D, Couch K, Yajima T, Knowlton KU. Alternatively Spliced Soluble Coxsackie- adenovirus Receptors Inhibit Coxsackievirus Infektion. *J Biol Chem* 2004; 279:18497-18503.

Dörner AA, Wegmann F, Butz S, et al. Coxsackie- adenovirus- receptor (CAR) is essential for early embryonic cardiac development. *J Cell Sci* 2005; 118(15):3509-3521.

Fechner H, Wang X, Wang H, et al. Transcomplementation of vector replication versus coxsackievirus receptor overexpression to improve transgene expression in poorly permissive cancer cells. *Gene Ther* 2000; 1954-1968.

Gauntt C, Huber S. Coxsackievirus experimental heart diseases. *Front Biosci* 2003; 8:e23-e35.

Goodfellow IG, Evans DJ, Blom AM, et al. Inhibition of Coxsackie B Virus Infektion by soluble forms of its receptor: binding affinities, altered particle formation and competition with cellular receptors. *J Virol* 2005; 79:12016-12024.

Harmegnies D, Wang XM, Vandenbussche P, et al. Characterization of a potent Human Interleukin- 11 Agonist. *Biochem J* 2003; 375:23-32.

He Y, Chipman PR, Howitt J, et al. Interaction of coxsackievirus B 3 with full length coxsackievirus- adenovirus receptor. *Nat Struct Biol* 2001; 8:874-878.

Honda T, Saitoh H, Masuko M, et al. The Coxsackievirus- adenovirus receptor protein is an adhesion molecule in the developing mouse brain. *Brain Res Mol* 2000; 77:19-28.

Jahns R, Boivin V, Hein L, et al. Direct evidence for a beta 1- adrenergic receptordirected autoimmune attack as a cause of idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Clin Invest* 2004; 113:1419-1429.

Klingel K, Kandolf R. Molecular in situ Lokalisation techniques in diagnosis and pathogenicity studies of enteroviral heart disease. *Clinical und Diagnostic Virology* 1996; 5(2-3):157-66.

Knowlton KU. CVB infection and mechanisms of viral cardiomyopathy. *Biomedizin & Life Science* 2008; 323:315-35

Kulanoglu E. Der Coxsackie- Adenovirus- Rezeptor und seine löslichen Isoformen. *Bibliothek Zürich* 2008.

Lawson CM. Evidence of mimicry by viral antigens in animal models of autoimmune disease including myokarditis. *Cell Mol Life Sci* 2000; 57:552-560.

Milstone AM, Petrella JE, Sanchez MD, et al. Interaction with Coxsackievirus and adenovirus receptor, but Not with Decay- Accelerating Factor (DAF), Induces A- Particle Formation in a DAF- Binding Coxsackievirus B 3 Isolate. *Journal of Virology* 2005; p 655-660.

Naegeli B. Myokarditis: Diagnostik und Verlauf. *Kardiovaskuläre Medizin* 2004; 7:248-257.

Nemerow GR. Cell Receptors Involved in Adenovirus Entry. *Virology* 2000; p 1-4.

Neu N, Rose NR, Beisel KW, et al. Cardiac myosin induces myokarditis in genetically predisposed mice. *J Immunol* 1987; 139:3630-3636.

Noutsias M, Fechner H, de Jonge H, et al. Human coxsackie- adenovirus receptor is colocalized with integrins alpha(v)beta(3) and alpha(v)beta(5) on the cardiomyocyte sarcolemme and upregulated in dilated cardiomyopathie; implications for cardiotropic viral infection. *Circulation* 2001; 104:275-280.

Noutsias M, Puschinger M, Poller WC, et al. Current insights into the pathogenesis, diagnosis and therapy of inflammatory cardiomyopathy. *Heart Fail Monit* 2003; 3:127-135.

Okazaki T, Tanaka Y, Nishio R, et al. Autoantibodies against cardiac troponin I are responsible for dilated cardiomyopathy in PD-I- deficient mice. *Nat Med* 2003; 9:1477-1483.

Orthopoulos G, Triantafilou K, Triantafilou M. Coxsackie B viruses use multiple receptors to infect human cardiac cells. *Med Virol* 2004; 291-299.

Puschinger M, Bowles NE, Fuentes- Garcia J, et al. Detection of adenoviral genome in the myocardium of adult patients with idiopathic left ventricular dysfunction. *Circulation* 1999; 99(10):1348-54.

Puschinger M, Doerner A, Kuehl U, et al. Enteroviral RNA Replication in the Myocardium of Patients with Left Ventricular Dysfunction and Clinically Suspected Myocarditis. *Circulation* 1999; 99:889-895.

Philipson L, Petterson RF. The coxsackievirus- adenovirus receptor- a new receptor in the immunoglobulin family involved in cell adhesion. *Curr Top Microbiol Immunol* 2004; 273:87-111.

Poller W, Fechner H, Noutsias M, et al. Highly variable expression of Virus Receptor in the human cardiovascular system. *Zeitschrift für Kardiologie* 2002; 91:978-991.

Seckinger P, Zhang JH, Hauptmann B, Dayer JM. Characterization of a tumor necrosis alpha (TNF-alpha) inhibitor: evidence of immunological cross-reactivity with the TNF receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87(13):5188-5192.

Schulze K, Becker BF, Schultheiss HP. Antibodies to the ADP/ATP carrier, an autoantigen in myocarditis and dilated cardiomyopathy, penetrate into myocardial cells and disturb energy metabolism in vivo. *Circ Res* 1989; 64:179-192.

Schwimmbeck PL, Badorff C, Schultheiss HP, Strauer BE. Transfer of myocarditis into severe combined immunodeficiency mice. *Circulation Research* 1994; 75:156-64.

Seidman MA, Hogan SM, Wendland RL, et al. Variation in adenovirus expression and adenovirus vector- mediated transgene expression at defined stages of the cell cycle. *Molecular Therapy* 2001; 4(1):13-21.

Shafren DR, Bates RC, Agrez MV, et al. Coxsackieviruses B1, B3, B5 use decay accelerating factor as a receptor for cell attachment. *J Virol* 1995; 69:3873-3877.

Takada H, Kishimoto C, Hiraoka Y. Therapy with immunoglobulin suppresses myocarditis in a murine coxsackievirus B 3 model. Antiviral and anti- inflammatory effects. *Circulation* 1995; 92:1604-1611.

Takai, T. Roles of Fc receptors in autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 2002; 2:580-592.

Testani JM, Kolansky DM, Litt H, Gerstenfeld P. Focal myocarditis mimicking acute ST- elevation myocardial infarction: diagnosis using cardiac magnetic resonance imaging. *Tex Heart Inst J* 2006; 33(2):256-9.

Thoelen I, Magnusson C, Tagerud S, et al. Identifikation of alternative splice products encoded by the human coxsackie- adenovirus receptor gene. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 287:216-222.

Tomko RP, Johansson CB, Totrov M, et al. Expression of the Adenovirus receptor and its interaction with the fiber knob. *Exp Cell Res* 2000; 255:47-55.

Walters RW, Freimuth P, Moninger TO, et al. Adenovirus fiber disrupts CAR- mediated intercellular adhesion allowing virus escape. *Cell* 2001; 110(6):789-799.

Wetz K, Willingmann P, Zeichhardt H, Habermehl KO. Neutralization of poliovirus by polyclonal antibodies requires binding of a single IgG molecule per virion. *Cell* 1986; 91:207-220.

Xiaomei Q, Zhang H, Bayston TA, Archard LC. Detection of Coxsackievirus B 3 RNA in mouse myocarditis by nested polymerase chain reaction. *Clinical and Diagnostic Virology* 1995; 233-245.

Yanagawa B, Spiller OB, Choy J, et al. Coxsackievirus B 3- associated myocardial pathology and viral load reduced by recombinant soluble human decay- accelerating factor in mice. *Lab invest* 2003; 83:75-85.

Yanagawa B, Spiller OB, Proctor DG, et al. Soluble Recombinant Coxsackievirus and Adenovirus receptor Abrogates Coxsackievirus B 3- Mediated Pancreatitis and Myokarditis in Mice. *J Infect Dis* 2004; 189:1431-1439.

Zen K, Liu Y, McCall IC, et al. Neutrophil migration across tight junction 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.

8. Anhang

8.1. Danksagung

Hiermit möchte ich mich ganz herzlich bei allen Helfern bedanken, die mich auf dem Weg zur Erlangung meiner Dissertation begleitet und unterstützt haben.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Heinz- Peter Schulltheiss und Frau Dr. Andrea Dörner für die Überlassung des interessanten Dissertationsthemas, die mich mit Ihrer guten Einarbeitung und Betreuung jederzeit unterstützt haben.

Neben der fachlichen Unterstützung im Labor danke ich besonders meiner Mutter, die zu jeder Zeit für mich dagewesen ist. Die mir in vielen Sonderschichten, auch Nachts, motivierende Worte, besonders über die Ferne zugeflüstert hat.

8.2. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

8.3. Wissenschaftliche Publikation

A. Dörner, H.- P. Grunert, V. Lindig, K. Chandrasekharan, H. Fechner, K.U. Knowlton, A. Isik, M. Pauschinger, H. Zeichhardt, H.-P. Schultheiss. Treatment of coxsackievirus B 3 - infected BALB / c mice with the soluble coxsackie adenovirus receptor CAR 4/7 aggravates cardiac injury; Journal of Molecular Medicine 2006; 842-851.

8.4. Eidesstattliche Erklärung

„ Ich, Ayse Isik, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Auswirkung des Coxsackievirus- Rezeptorproteins, CAR 4/7 auf CVB 3 induzierte Myokarditis in BALB / c Mäusen selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Homburg, den 19.08.2009

Ayse Isik