

Aus dem Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Zeitliche Expression des Transkriptionsfaktors EGR-1 und der MAP-Kinasen
ERK-1/2 in murinen Modellen der viralen Myokarditis**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von
Bastian Maroski
aus Berlin

Datum der Promotion 09.09.2016

Inhaltsverzeichnis

1 Abstract	5
2 Einleitung	7
2.1 Myokarditis	7
2.2 Das Coxsackie-Virus	8
2.3 CVB 3 induzierte Myokarditis im Mausmodell	9
2.4 Early Growth Response 1	11
2.5 Fragestellung	14
3 Material und Methoden	15
3.1 Materialien	15
3.1.1 Chemikalien	15
3.1.2 Primer	16
3.1.3 Antikörper	17
3.1.3.1 Primär Antikörper für Western Blot	17
3.1.3.2 Sekundär Antikörper für Western Blot	17
3.1.4 Lösungen, Puffer und Kits	17
3.1.4.1 Lösungen/ Puffer	17
3.1.4.2 Kits	18
3.1.5 Verbrauchsmaterialien	18
3.1.6 Geräte	19
3.1.7 Software	19
3.1.8 Zelllinien zur Positivkontrolle	20
3.2 Tiermodell	20
3.2.1 Haltung der Versuchstiere	20
3.3 Methoden	20
3.3.1 Bestimmung der Proteinexpression	20
3.3.1.1 Proteinextraktion aus murinem Gewebe	20
3.3.1.2 Bestimmung der Proteinkonzentration	21
3.3.1.3 Gelelektrophorese	21
3.3.1.4 Western Blot	21
3.3.1.5 Blocken und Antikörperinkubation	22
3.3.1.6 Detektion der Chemolumineszenz	22
3.3.1.7 Stripping der Nitrozellulosemembranen	23

3.3.1.8 Beladung der Nitrozellulosemembranen	23
3.3.1.9 Auswertung der detektierten Signale	23
3.3.2 Bestimmung der mRNA Expression	24
3.3.2.1 RNA Isolierung	24
3.3.2.2 Reinheitskontrolle und Qualitätsanalysen	25
3.2.2.3 Reverse Transkription	25
3.2.2.4 Design der Primer	26
3.2.2.5 Erzeugung der Standardreihen für die Durchführung der quantitativen PCR	26
3.2.2.6 Quantitative Bestimmung der EGR-1 mRNA	27
3.2.2.7 SYBR Green basierte TaqMan Analyse	28
3.2.2.8 Statistische Auswertung der mRNA Expression	29
4 Ergebnisse	30
4.1 Proteinexpression	30
4.1.1 Aktivierung des MAP-Kinase Wegs	30
4.1.1.1 Proteinexpression von ERK-1/2 (p44/42)	30
4.1.1.1.1 Kardiale Proteinexpression von ERK-2 (p42) im permissiven Mausmodell A.BY/SnJ	31
4.1.1.1.2 Kardiale Proteinexpression von ERK-2 (p42) im resistenten Mausmodell C57Bl/6	31
4.1.1.1.3 Kardiale Proteinexpression von ERK-2 (p42) im Vergleich der beiden Mausmodelle	32
4.1.1.1.4 Kardiale Proteinexpression von ERK-1/2 (p44/42): Vergleich der Expression von ERK 1 und 2	33
4.1.1.2 Proteinexpression des phosphorylierten ERK-1/2(p44/42)	34
4.1.2 Proteinexpression von EGR-1 im Verlauf der CVB3 Infektion	36
4.1.2.1 Proteinexpression von EGR-1 im Verlauf der CVB3 Infektion im permissiven Mausmodell A.BY/SnJ	37
4.1.2.2 Proteinexpression von EGR-1 im Verlauf der CVB3 Infektion im resistenten Mausmodell C57Bl/6	38
4.1.2.3 Proteinexpression von EGR-1 im Verlauf der CVB3 Infektion im Vergleich beider Mausmodelle	39
4.2 Molekularbiologische Untersuchungen	42
4.2.1 Expression der kardialen mRNA des EGR-1 im Verlauf der Infektion	42
4.2.1.1 Real Time PCR Untersuchung – Erstellung der Standardreihe für EGR 1	42

4.2.1.2 Real-Time-PCR Untersuchung – Erstellung der Standardreihe und der Primer-Test für 18S	43
4.2.1.3 Expression der kardialen mRNA von EGR-1 im permissiven Mausmodell A.BY/SnJ	47
4.2.1.4 Expression der kardialen mRNA des EGR-1 im resistenten Mausmodell C57Bl/648	
4.2.1.5 Expression der kardialen mRNA des EGR-1 im Vergleich der beiden Mausmodelle	49
5 Diskussion	51
5.1 Übersicht	51
5.2 Proteinexpression von ERK-1/2 (p42/44)	52
5.2.1 Proteinexpression von ERK-1/2 (p42/44)	52
5.2.2 Proteinexpression des phosphorylierten ERK-1/2 (p-p42/44)	55
5.3 Das Expressionslevel des EGR-1 Transkriptionsfaktors im Verlauf der Virusinfektion	55
5.3.1 Grundlegende Stimuli der Expression und mögliche weitere Funktionen und Aufgaben des EGR-1	55
5.3.2 Das Expressionslevel des Early Growth Response-1 Transkriptionsfaktors auf mRNA-Ebene	56
5.3.3 Das Expressionslevel des Early Growth Response-1 Transkriptionsfaktors auf Protein-Ebene	58
5.3.4 Auswertung der absoluten Proteinexpression	60
5.3.5 Das Early Growth Response-1 Protein	61
5.4 Mögliche Induktion des EGR-1 durch den MAP-Kinase Signalweg und die mögliche Funktion des EGR-1 im Rahmen der infektiösen Myokarditis	62
6 Zusammenfassung	64
7 Literaturverzeichnis	65
8 Abbildungs- und Tabellen-Verzeichnis	71
9 Abkürzungsverzeichnis	73
10 Eidesstattliche Versicherung	75
11 Lebenslauf	76

1 Abstract

Introduction Viral myocarditis is a potential life threatening inflammatory disease of the myocardium which is even in the young frequently related to sudden cardiac death and could lead to an inflammatory dilated cardiomyopathy. The aim of the present study was to evaluate the expression of the transcription factor EGR-1, which is related to various myocardial damages and of the ERK 1/2 kinases in mice models with acute and chronic myocarditis.

Methods Coxsackie-Virus B 3 (CVB3) infected mice of the species C57Bl/6 eliminate the virus after the acute inflammation ("acute mouse model"), mice of the species A.BY/SnJ develop a chronic myocarditis under persistence of the virus ("chronic mouse model"). The cardiac protein expression of EGR-1 and ERK-1/2 and the mRNA expression of EGR-1 was quantified by Western Blot and RT-PCR for the post infectious days 4, 8, 12 and 28 and compared to non-infected controls.

Results In both "mouse models" the ERK-2 protein expression was significantly induced after day 8 (C57Bl/6 1,6-fold, A.BY/SnJ 2,6-fold). The protein expression in the "chronic mouse model" was much stronger induced and remained significantly higher until day 28, while the protein expression in the "acute mouse model" decreased and reached the non-infected level. The mRNA expression of EGR-1 was significantly induced in both "mouse models" after day 4 (C57Bl/6 3,6-fold, A.BY/SnJ 4,3,6-fold). In both "mouse models" there was a decrease of the mRNA expression (1,7-fold) on day 8. On day 28 the "chronic model" showed a non significant induced mean mRNA expression. In the "acute mouse model" there was a significant induced protein expression of EGR-1 on day 4 (2-fold), which decreased on day 8 to the level of non-infected mice. On day 28 the "chronic mouse model" showed a statistical significant higher induced protein expression of EGR-1 than the "acute mouse model".

Conclusion The present study showed that the protein expression of ERK-2 seems to be associated to the histopathological changes in myocarditis. After recovery of the acute myocarditis, a decrease of the protein expression was seen, while a constantly induced protein expression was found in the chronic disease. This could be related to the histopathological changes in the activity of myocarditis. EGR-1 expression is suggestive of an ambivalent role in viral myocarditis.

Einleitung Die virale Myokarditis ist eine potentiell lebensbedrohliche inflammatorische Erkrankung des Herzmuskelgewebes, welche häufig, auch in jungen Lebensjahren, in Zusammenhang mit dem plötzlichen Herztod steht und sich in eine inflammatorische dilatative Kardiomyopathie entwickeln kann. Ziel dieser Dissertation war es, die zeitliche Expression des Transkriptionsfaktors EGR-1, der bei verschiedenen myokardialen Schädigungen verstärkt exprimiert wird und der ERK 1/2 Kinasen in Mausstämmen mit akuter bzw. chronischer enteroviraler Myokarditis zu untersuchen.

Methoden Es wurden Coxsackie-Virus B3 (CVB3) infizierte Mäuse der Stämme C57Bl/6, die nach akuter Myokarditis das Virus eliminieren (resistentes Mausmodell) und A.BY/SnJ, die eine chronische Myokarditis unter Viruspersistenz entwickeln (chronisches Mausmodell) untersucht. Die kardiale Proteinexpression von EGR-1 und ERK-2 wurde mittels Western Blot und die mRNA-Expression von EGR-1 wurde mittels RT-PCR, jeweils an den Tagen 4, 8, 12 und 28 nach Infektion untersucht und mit nichtinfizierten Kontrollen verglichen.

Ergebnisse Für ERK-2 zeigte sich in beiden Mausmodellen ab Tag 8 ein statistisch signifikanter Anstieg der Proteinexpression (C57Bl/6 1,6-fach, A.BY/SnJ 2,6-fach). Im chronischen Mausmodell nahm die Proteinexpression im Vergleich zunächst deutlich stärker zu und blieb auch am 28. Tag signifikant erhöht, während die Expression im resistenten Mausmodell an Tag 28 wieder den Wert der nicht infizierten Kontrolltiere erreichte. Die EGR-1 mRNA-Expression zeigte an Tag 4 in beiden Mausmodellen eine signifikant erhöhte Expression (C57Bl/6 3,6-fach, A.BY/SnJ 4,3-fach), die ab Tag 8 in beiden Mausmodellen zurückging (etwa 1,7-fach erhöht), wobei im chronischen Mausmodell an Tag 28 Hinweise auf eine statistisch nicht signifikante Tendenz zur erhöhten Expression im Mittel bestanden. Auf Proteinebene zeigte sich lediglich im resistenten Mausmodell an Tag 4 eine signifikante, etwa 2-fach erhöhte Expression. Ab Tag 8 erreichte die Expression wieder die Werte der nicht infizierten Kontrolltiere. An Tag 28 zeigt das chronische Mausmodell, verglichen mit dem resistenten Mausmodell eine signifikant erhöhte Proteinexpression.

Schlussfolgerung Die Proteinexpression von ERK-2 scheint mit dem histopathologischen Verlauf der Myokarditis assoziiert zu sein, da sie im resistenten Mausmodell mit dem Ausheilen der Myokarditis zurückgeht, sich jedoch im chronischen Mausmodell anhaltend erhöht zeigt. Das für EGR-1 gezeigte Expressionsverhalten deutet auf eine ambivalente Rolle bei der viralen Myokarditis.

2 Einleitung

2.1 Myokarditis

Die Myokarditis ist eine Erkrankung des Herzmuskels, welche im Zusammenhang mit inflammatorischen Infiltraten, Zellschädigungen und Nekrosen auftritt, ohne dass ein ischämisches Ereignis beteiligt gewesen ist (1). Die Genese einer Myokarditis lässt sich grob in infektiös (Viren, Bakterien) und nicht infektiös einteilen (Noxen, idiopathisch) (1). Wobei weltweit, vor allem in Zentral- und Süd-Amerika, die häufigste Genese die Myokarditis durch *Trypanosoma cruzi* ist (2), ist die Myokarditis in Nordamerika und Europa besonders häufig viraler Genese (3). Als Erregerspektrum kommen vor allem Enteroviren, Adenoviren, Parvovirus B19, Influenza Viren, humanes Herpesvirus 6, Hepatitis C-Viren, Epstein-Barr-Viren und das Cytomegalie-Virus in Frage, wobei mehr als 20 Viren mit der infektiösen Myokarditis assoziiert sind (4,5). Insbesondere Coxsackie-Viren der Gruppe B 3 konnten in Verbindung mit der akuten Form der Myokarditis gebracht werden (3). Zudem liegt für diese Erreger das beste Verständnis hinsichtlich der ätiopathogenetischen Relevanz vor (4,6).

Die epidemiologische Bedeutung der Myokarditis lässt sich aufgrund der variablen Symptomatik nur schwer einschätzen, denn die klinische Manifestation reicht von leichten grippe-ähnlichen Symptomen bis zum schweren akuten Herzversagen und dem plötzlichen Herztod (7). In der Regel lassen sich die Symptome mit einer Herzinsuffizienz vergleichen (4). Es lässt sich daher von einer hohen Dunkelziffer ausgehen. Nichtsdestotrotz lässt sich bei ca. 44% der jungen Opfer des plötzlichen Herztodes histologisch eine Myokarditis nachweisen (4). Weiterhin zeigte sich eine 5-Jahres-Überlebensrate bei Patienten mit histologisch gesicherter akuter Myokarditis von 56%, beziehungsweise eine Mortalitätsrate von 20 % nach einem Jahr (8).

Neben einer akuten Verlaufsform der Myokarditis mit Ausheilung des betroffenen Myokards, existiert eine chronische persistierende Form, bei welcher es zu einer inflammatorischen Kardiomyopathie in Form einer inflammatorischen dilatativen Kardiomyopathie (DCM) kommt, welche wie die idiopathische DCM mit der Dilatation eines bzw. beider Ventrikel und der Reduktion des Schlagvolumens einhergeht und die Symptomatik einer Herzinsuffizienz hervorruft (8). Studien zeigten, dass in bis zu 21% der Fälle eine akute Myokarditis in eine DCM übergeht, welche ihrerseits eine 5-Jahres-Mortalität von 50 % hat (8).

Die Therapie der Myokarditis umfasst bislang standardmäßig lediglich die symptomatische Therapie der Herzinsuffizienz. Die Fachgesellschaften für Kardiologie haben bislang keine klare Empfehlung zur kausalen Behandlung einer (viralen) Myokarditis ausgesprochen. Jedoch

konnten in den letzten Jahren vielversprechende Therapieansätze in verschiedenen Studien gezeigt werden. Hier konnte gezeigt werden, dass bei Viruspersistenz eine deutliche Verbesserung der LV-Funktion durch eine Interferon beta (INF-b)- Therapie erzielt werden konnte. Eine immunsuppressive Therapie scheint im Rahmen der persistierenden Myokarditis ohne aktive Virusreplikation erfolgversprechend zu sein. In die Behandlungsleitlinien, haben diese Therapien jedoch bislang keinen Einzug gehalten (9).

2.2 Das Coxsackie-Virus

Das Coxsackie-Virus gehört zur Familie der Picornaviridae und zur Gattung der Enteroviridae. Es handelt sich um ein unbehülltes omnipräsentes RNA-Virus, welches auf dem fäkal oralen Weg übertragen wird und regelmäßig zu kleineren saisonalen Epidemien führt (10). Das Viruspartikel enthält eine 7,4 kB lange positive Einzelstrang-RNA, welche von einem ikosaedrischen Kapsid umschlossen wird (6).

Es werden zwei Subtypen der Coxsackie-Viren unterschieden: Subtyp A mit 23 bekannten Serotypen, welche vor allem gastrointestinale Infektionen verursachen und Subtyp B (CVB) mit 6 bekannten Serotypen, welche vor allem mit Herzerkrankungen, Pankreaserkrankungen und mit Erkrankungen des zentralen Nervensystems assoziiert sind (6). Der Serotyp CVB 3 wird immer wieder im Zusammenhang mit der Entstehung einer inflammatorischen Myokarditis beschrieben bzw. nachgewiesen, zudem konnte CVB 3 mit 20-40% der akuten Herzinsuffizienzen bzw. der inflammatorischen DCM in Verbindung gebracht werden (6).

Das Coxsackie-Virus nutzt zwei Rezeptoren um die Zellen zu infiltrieren. Zum einen decay-accelerating factor (DAF) und coxsackie-virus and adenovirus receptor (CAR). DAF ist ein 70 kDa schweres membranständiges Protein. CAR ist ein Transmembranprotein in den humanen Epithelzellen, wobei die Bindung des Coxsackie-Virus an CAR nur nach erfolgter Bindung an DAF möglich erscheint. Nach Bindung des Coxsackie-Virus-Partikels an den DAF/CAR Komplex erfolgt das "virale uncoating", sowie, mittels endozytotischer Vesikel, die Aufnahme in die Zelle. Der positive RNA-Strang dient nun im Zytoplasma als Vorlage zur Translation eines viralen Polyproteins, welches durch verschiedene Virusproteasen in mehrere Kapsidproteine, Proteasen und Polymerasen umgewandelt wird. Die Produkte dieses Polyproteins stören nun auf vielfältige Weise die Wirtszellfunktion, was zur Störung des zellulären Zytoskeletts, der Zellsekretion, der Proteinbiosynthese sowie zur Apoptose führen kann. Zudem wird mit Hilfe einer RNA-abhängigen RNA-Polymerase ein negativer komplementärer RNA-Strang der

ursprünglichen viralen RNA transkribiert, welcher als Template für die Synthese neuer positiver-RNA Stränge dient. Zusammen mit den Kapsidproteinen werden so weitere Viruspartikel erzeugt, die wiederum nach erfolgter Zytolyse weitere Zellen infizieren können. Der gesamte Vorgang dauert ca. neun Stunden (6). In den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen wurden CVB-3 Viren vom Nancy-Virustyp verwendet. Die Virulenz des Nancy-Virustyp ist etwas weniger stark ausgeprägt als die des z.B. Woodruff-Virustyps, welcher eine schwere Myokarditis mit ausgeprägten kardialen Läsionen und hoher und rascher Letalität verursacht (11).

2.3 CVB 3 induzierte Myokarditis im Mausmodell

Einen wichtigen Bestandteil zum Verständnis der infektiösen Myokarditis lieferte die Arbeit an einem geeigneten Mausmodell, wobei verschiedene Eigenschaften der Physiologie der Maus dieses Modell geeignet erschienen ließen. Vor allem die genetische Ähnlichkeit, die einfache Haltung, das Vorhandensein verschiedener genetischer Stämme sowie die Sensibilität gegenüber kardiotoxischer Viren zeichnen die murinen Modelle der infektiösen Myokarditis aus (6). Im murinen Modell der Myokarditis können Mausstämme unterschieden werden, welche genetisch determiniert postinfektiös einen chronischen Krankheitsverlauf mit Persistenz der viralen RNA erleiden, sog. permissive Mausstämme (in dieser Arbeit wird hierfür der Mausstamm A.BY/SnJ verwendet) sowie Mausstämme, die postinfektiös nach der akuten Krankheitsphase in der Regel eine Remission erleben, wobei es zu einer Elimination der viralen RNA kommt, sog. resistente Stämme (in dieser Arbeit wird hierzu der Mausstamm C57Bl/6 verwendet) (12,13,15). Bereits diese unterschiedlichen Krankheitsverläufe der unterschiedlichen Mausstämme zeigen die Relevanz der genetischen Veranlagung (14). Nach der Infektion kommt es bei geeigneten Mausstämmen zur Replikation des CVB3 in Herz, Milz, Gehirn und der Bauchspeicheldrüse und verursacht im Organismus der Maus ähnliche klinische Symptome wie sie auch beim Menschen vorkommen (6).

In der Regel werden im murinen Modell der infektiösen Myokarditis postinfektiös drei Phasen charakterisiert, welche sich immunologisch und pathologisch unterscheiden lassen. Es wird eine akute, eine subakute und eine chronische Phase nach erfolgter Infektion unterschieden (6). Die akute Phase erstreckt sich bis zum ca. fünften postinfektiösen Tag und ist von einer hohen Viruslast im Blut, Milz, Bauchspeicheldrüse und Herz geprägt. Diese erhöhte Viruslast sowie die verstärkte Virusreplikation führen zu früher Virus-induzierter Schädigung der Kardiomyozyten, apoptotische und nekrotische Schädigung der Myofibern, Vaculationen und Kalzifikationen,

ohne dass sich inflammatorische Infiltrate zeigen (16). Bevor es zur Infiltration mit Immunzellen kommt, werden als Reaktion auf die virale Infektion verschiedene Zytokine und Interferone freigesetzt, vor allem aus Kardiomyozyten, Endothelzellen, Fibroblasten und dendritischen Zellen (17,18). Außerdem kommt es um den vierten postinfektiösen Tag zum Auftreten von antigenspezifischen neutralisierenden Antikörpern, welche entscheidend für die Hemmung der weiteren Replikation des CVB3 sind (19). Zwischen dem vierten und achten postinfektiösen Tag, in der subakuten Phase der Infektion, kommt es schließlich, sowohl bei den permissiven wie resistenten Mausstämmen zum klinischen Bild einer Myokarditis. Diese subakute Phase ist von der Migration von Immunzellen in das Myokard geprägt, vor allem von Makrophagen, Natürlichen-Killerzellen (NK) sowie antigenspezifischer CD4 und CD8 positiver T-Lymphozyten (20). Mikroskopisch lassen sich in dieser Phase entzündliche Läsionen ausmachen, die virale Replikation, wie auch die B-Zell vermittelte Bildung von neutralisierenden Antikörpern erreicht ihr Maximum. Die resistenten Mausstämme erreichen bis zum ca. 14. postinfektiösen Tag die Elimination des Virus. Nach der subakuten Phase erfolgt, in der Regel nach Elimination des Virus, bei den resistenten Mausstämmen die Genesung. Bei den permissiven Mausstämmen erfolgt nun die chronische Phase mit Viruspersistenz (15. bis 90. postinfektiöser Tag) (21). Hier kommt es bei zunehmender kardialer Fibrose und Ventrikeldilatation zu einer eingeschränkten Ejektionsfraktion und somit zu einer chronischen Myokarditis ggf. auch zu einer chronischen infektiösen dilatativen Kardiomyopathie (15, 22, 23).

Pathophysiologisch lassen sich folgende Mechanismen der kardialen Schädigung ausmachen. Im Rahmen der Immunantwort aufgetretene myokardiale Schädigung, einmal ist hier die IL-2 aktivierte NK-Zell bedingte Schädigung anzuführen, wobei die initiale Rolle der NK-Zellen darin besteht, infizierte Kardiomyozyten abzutöten um die virale Replikation zu unterbinden (24). Die protektive Wirkung der NK-Zellen ließ sich auch mit NK Zell-defizienten Mäusen belegen (25), wobei eine über die akute Phase der Infektion andauernde Aktivierung der NK-Zellen eine vermehrte Freisetzung an zytotoxischen Molekülen wie z.B. Perforin bedingt und so die myokardialen Schäden verstärkt (6, 26). Zudem bedingt die prolongierte Freisetzung proinflammatorischer Zytokine die Infiltration von zytotoxischen antigen-spezifischen T-Lymphozyten, welche, ebenfalls vermittelt durch MHC I, infizierte Kardiomyozyten abbauen (13, 18, 27) und so einen kardialen Schaden verstärken können.

Kommt es also zu einer andauernden Bildung und Freisetzung proinflammatorischer Zytokine, gefolgt von einer verstärkten Migration von Immunzellen, ist von einer verstärkten Schädigung des Myokards, auch außerhalb der mikroskopisch sichtbaren inflammatorischen Läsionen,

auszugehen. Verschiedene experimentelle Arbeiten konnten im Mausmodell einen Vorteil bezüglich des kardialen inflammatorischen Infiltrats und der Mortalität zeigen, wenn es zu einer Reduktion der T-Zell Antwort gekommen war (28, 29, 30).

Des Weiteren ist von einer autoimmunen Schädigung des Herzen im Rahmen einer chronischen Infektion auszugehen, so sind Auto-Antikörper gegen kardiales Myosin, Laminin sowie den beta-1 Rezeptor bekannt (21, 6). Ferner sind Kreuzreaktivitäten zwischen viralen Epitopen und Antikörpern welche gegen sarkolemmale Strukturen gerichtet sind bekannt (31, 32, 33).

<i>0d</i>	<i>4d</i>	<i>8d</i>	<i>12d</i>	<i>28d</i>	<i>84d Tage p.i.</i>
Akute Phase:		Subakute Phase:			Chronische Phase:
-Virämie	-erhöhter Virustiter in den Myozyten	- akute Schädigung der Myozyten	- fokale Mikrokalzifikation	- Aktivierung der Makrophagen	- Viruselimination
		- Infiltration von Immunzellen	- Auftreten von natürlichen Killerzellen	-Proinflammatorische Zytokine	- Elimination des Virus
		- Aufkommen von neutralisierenden Antikörpern			- Persistenz der viralen RNA
					- myokardiale Fibrose
					- dilatative Kardiomyopathie
					- Herzversagen

Abbildung 1) Drei Phasen der viralen Myokarditis. Dargestellt sind die Phasen der viralen Myokarditis im zeitlichen Verlauf nach 6.

Die bereits erwähnte direkte virale Schädigung der Zellen ließ sich in mehreren Arbeiten nachweisen (16, 6) und beinhaltet die Induktion der Apoptose mittels Aktivierung einzelner Caspasen, die Störung der Proteinbiosynthese sowie die Beeinträchtigung des Zytoskeletts (34).

2.4 Early Growth Response 1

"Early Growth Response 1" (EGR-1) ist ein Transkriptionsfaktor. Eine erhöhte Expression des EGR-1 konnte in einigen Tiermodellen bei verschiedenen Herzkrankheiten gezeigt werden (35,36). Ein erhöhtes Expressionsniveau des EGR-1 auf mRNA-Ebene konnte im Rahmen einer intraoperativen kardialen Ischämiephase am Menschen gezeigt werden, im Tiermodell konnten unter Ischämiebedingungen und kardialen Schädigungen ebenfalls eine erhöhte Expression des EGR-1 auf Protein- wie mRNA-Ebene gezeigt werden (37, 38), wobei die weitere Funktion des EGR-1 im Rahmen der kardialen Schädigung nicht untersucht worden war. In früheren Arbeiten

konnte außerdem gezeigt werden, dass es in Ratten nach Stimulation mit Endothelin 1 (ET-1) zu einer signifikanten Zunahme der Expression des EGR-1 gekommen war (39).

Prinzipiell gehört EGR-1 zu der Gruppe der Zinkfingertranskriptionsfaktoren, welche eine homologe Zinkfinger-Motiv-Region besitzen, die als DNA-Bindungsdomäne fungiert. Diese Zinkfingerregion zeigt sich innerhalb dieser Gruppe als äußerst konservativ und fungiert als Bindungsdomäne an GC-reiche-DNA Regionen. Von den Early Growth Response Transkriptionsfaktoren sind bislang vier Unterformen bekannt (EGR-1, -2, -3 und -4).

Für EGR-1 konnte auf Protein- wie auf mRNA-Ebene eine vermehrte Expression im ZNS, in der Lunge, im lymphatischen Gewebe und im Myokard nachgewiesen werden (40). Die Promotor-Region des EGR-1 induziert die Transkription nicht nur nach dem Kontakt mit Serumbestandteilen, auch eine Induktion der Transkription nach Kontakt mit Phorbol ester (41) konnte nachgewiesen werden, sowie die Expressionsmodulation durch verschiedene MAP-Kinasen (vor allem ERK-1/2) (42,43).

MAP-Kinasen (Mitogen activated protein kinases) sind bedeutende intrazelluläre signalvermittelnde Enzyme. Es konnte gezeigt werden, dass die CVB3-Infektion über eine G-Protein vermittelte Aktivierung des MAP-Kinase Signalwegs zu einer Aktivierung der ERK-1/2 (p42/44) führt, welche über Raf-1 und MEK jeweils vermittelt wird (44).

Die entscheidende Rolle des ERK-1/2 im Rahmen der Coxsackie-Virus-Infektion, auch im murinen Modell, konnte bereits in verschiedenen Arbeiten gezeigt werden (34,45). Wobei von einer verstärkten Expression, sowohl auf mRNA- wie Proteinebene ausgegangen werden kann.

Zudem scheint hierbei ein möglicher Zusammenhang mit der Chronifizierung bzw. Entstehung einer dilatativen Kardiomyopathie zu bestehen, dabei ist von einer verstärkten bzw. prolongierten Expression im Rahmen der akuten und chronischen Myokarditis auszugehen ist (45).

Unter Berücksichtigung der vermuteten Expressionsmodulation von EGR-1 durch ERK-1/2 ist also auch in diesem genutzten Modell der murinen Myokarditis von einer relevanten Expressionsänderung des ERK-1/2 Systems bzw. von EGR-1 auszugehen.

Für EGR-1 sind verschiedene Möglichkeiten sowohl einer posttranskriptionalen wie auch posttranslationalen Modifikation bekannt. Auf mRNA-Ebene ist vor allem differenzielle Polyadenylierung zu nennen, weshalb eine kurze mRNA Variante und eine lange mRNA Variante unterschieden werden kann. Die beiden verschiedenen Varianten der mRNA konnten in unterschiedlichen Konzentrationen abhängig vom jeweiligen Stimulus nachgewiesen werden (46). Auf Proteinebene bietet EGR-1 aufgrund zahlreicher Serin und Threonin-Reste die

Möglichkeit einer Phosphorylierung, während Glykosylierung ausgeschlossen werden konnte (47, 48).

EGR-1 wird mit der Modulation der Expression folgender Gene in Verbindung gebracht: Tumorsuppressorgen p53, TNF- α (Tumor Nekrose Faktor α), TGF- β (Transforming Growth Factor β), EGF (Epidermal Growth Factor) und EGR-1 selbst (49, 50, 51, 52).

Day beschrieb 1990, dass EGR-1 in zwei verschiedenen Molekulargewichten in der Zelle vorliegt, wobei die leichtere ca. 54 kDa schwere Form im Zytoplasma, die ca. 80 kDa schwere Form intranukleär vorliegt. Hieraus lässt sich die Vermutung ableiten, dass für die schnelle Reaktion auf externe Stimuli EGR-1 nicht jedes Mal *de-novo* synthetisiert werden muss bzw. transkribiert werden muss, sondern eine Vorstufe als Vorrat vorliegt, wobei die biologische Bedeutung bislang nicht eindeutig geklärt werden konnte (47).

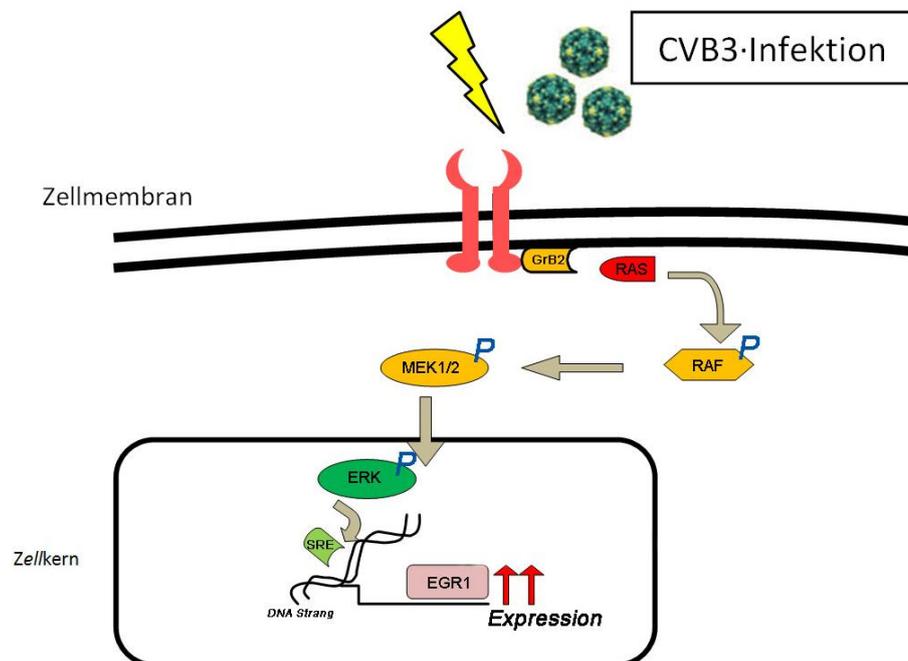


Abbildung 2) Pathway der EGR-1 Expressions Aktivierung (vereinfacht). Dargestellt ist der vereinfachte Pathway nach Infektion mit CVB3 der vermutlich zur verstärkten Expression von EGR-1 führt (modifiziert nach 6).

2.5 Fragestellung

Die MAP Kinasen ERK1/2 und der Transkriptionsfaktor EGR-1 konnten bereits in verschiedenen Arbeiten mit myokardialen Schädigungen in Verbindung gebracht werden, so dass auch eine Relevanz im Inflammationsprozess der murinen Myokarditis anzunehmen war.

Ziel dieser Arbeit waren Untersuchungen der Expressionslevel von ERK und EGR-1 in zwei murinen Modellen mit unterschiedlichen Verläufen der CVB3-Myokarditis. Es sollte geklärt werden, ob pathophysiologisch möglicherweise bedeutsame Unterschiede in der Expression von EGR-1 sowie von ERK1/2 zwischen einem permissiven (A.BY/SnJ) und einem resistenten Mausstamm (C57/Bl6) dargestellt werden können.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien

Agarose	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Amoniumpersulfat 100 mg/ml	Sigma-Aldrich Chemie, München, Deutschland
beta-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie, München, Deutschland
Borsäure	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bovines Serum Albumin A8577	Sigma-Aldrich Chemie, München, Deutschland
Bromphenolblau	Merck KGaA, Darmstadt Deutschland
Complete Protease Inhibitor	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA U.S.A.
dNTPs	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
EDTA	Sigma-Aldrich Chemie, München, Deutschland
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt Deutschland
Ethidiumbromid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
GeneAmp® 10X PCR Buffer	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Glycerin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycin MG 75.07	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hot Start-Taq-Polymerase	Qiagen, Hilden, Deutschland
HCL	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
IGEPAL NP- 40	Sigma-Aldrich Chemie, München, Deutschland
Isopropanol	Merck KGaA, Darmstadt Deutschland
Lämmli- Ladepuffer	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules CA, USA
MgCl ₂	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
NaCl	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Na- Deoxycholat	Sigma-Aldrich Chemie, München, Deutschland
NaF	Sigma-Aldrich Chemie, München, Deutschland
Na ₄ P ₂ O ₇	Sigma-Aldrich Chemie, München, Deutschland
Na ₃ VO ₄	Sigma-Aldrich Chemie, München, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Non fat dry Milk	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules CA, USA
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt Deutschland
Phorbol 12-myristate 13-acetate (TPA)	Sigma-Aldrich Chemie, München, Deutschland
Phosphat Buffer Saline	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules CA, USA

Ponceau S	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Prestained Dual Color Standard	Bio-Rad Laboratories, Hercules CA, USA
Rotiphorese Gel 30 % (Acrylamid/ Bisacrylamid (30:0,8))	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Roti free stripping buffer	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Super Signal® West Pico Chemiluminescent Substrate	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL USA
SuperScript II-Polymerase	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
SYBR® Green PCR Master Mix	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
TaqMan® Gene Expression Master Mix	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
TEMED (Tetramethylenediamine)	Sigma-Aldrich Chemie, München, Deutschland
Tris MG 121.14 g/ml	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris- HCL pH 7,4	Merck KGaA, Darmstadt Deutschland
Trizol	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Tween 20 100 ml	Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt Deutschland
100 bp DNA Marker	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland

3.1.2 Primer

EGR-1:

EGR-1 TaqMan Sonde 5'-TGAGCACCTGACCACAGAGTCCTTT-3'
 Assay Nummer: Mm00656724_m1
 Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland

Primer der Standardreihe:

EGR-1 fwd: 5'-ACC CCA AAC TGG AGG AGA TGA-3'
 EGR-1 bwd: 5'- GGC AGA GGA AGA CGA TGA AGC-3'

18S:

18s fwd: 5'- GGA GTA TGG TTG CAA AGC TGA AA- 3'
 18s bwd: 5'- CCG GAC ATC TAA GGG CAT CA- 3'

Primer der Standardreihe:

18s fwd: 5'- AGG AAT TGA CGG AAG GGC AC- 3'
 18s bwd: 5'- TCG TTA TCG GAA TTA ACC AGA CAA- 3'

Die genannten Primer stammen von der Firma TiBMolBiol, Berlin, Deutschland.
 random hexamer Primer zur reversen Transkription Roche, Mannheim, Deutschland

3.1.3 Antikörper

3.1.3.1 Primär Antikörper für Western Blot

Tabelle 1) Primär Antikörper

Protein:	Hersteller/Nummer:	Spezies:	Angewandte Verdünnung:
EGR-1	Santa Cruz/ sc-189	rabbit	1:200
p44/42 (Erk1/2)	Cell Signaling/ #9101	rabbit	1:1000
Phospho-p44/42 (Erk1/2)	Cell Signaling/ #9102	rabbit	1:1000
GAPDH	Pierce Antibodies /MA1-22670	mouse	1:4285

3.1.3.2 Sekundär Antikörper für Western Blot

Tabelle 2) Sekundär Antikörper

Reaktivität:	Spezies:	Hersteller:	Angewandte Verdünnung:
anti rabbit IgG	goat	Santa Cruz	1:3333
anti mouse IgG	goat	Santa Cruz	1:3333

3.1.4 Lösungen, Puffer und Kits

3.1.4.1 Lösungen/ Puffer

TBE 0,1M Tris-HCL, 0,1M Borsäure, 3mM EDTA, pH 8,0

Proteinlysepuffer (RIPA) Tris-HCL pH7,4, NaCl, NP-40(IGEPAL), Glycerol, Na₄P₂O₇, Na-Deoxycholat, SDS, NaF, Na₃VO₄, Complete, EDTA(1mM)

Puffer/Lösungen für Western Blot:

Transferpuffer für WB Tris (125mM), Glycin (750mM), H₂O dest, pH 8,3, Methanol

TBS 1 M Tris, 5 M NaCl, 1 M HCl, pH 7,5

TBS/T 1 M Tris, 5 M NaCl, 1 M HCl, pH 7,5, 0,1% Tween 20

Blocking- Buffer für WB 6% non fat dry Milk in TBS gelöst

Trenngelpuffer 10%	Rotiphorese Gel 30, 1,5M, Tris pH 8,8, APS, SDS, TEMED
Sammelgelpuffer 5%	Rotiphorese Gel 30, 0,5M Tris pH 6,8, SDS, TEMED
SDS-Probenladepuffer (2x)	Laemmli Sample Buffer, β -Mercaptoethanol
SDS- Laufpuffer (25x)	Tris (625 mM), Glycin (4802,5 mM), SDS (85,5 mM 2,5%), ad 1l aqua dest
Waschpuffer	TBS und TBS/T
Antikörperinkubationspuffer	TBS, 0,6% non fat dry milk

3.1.4.2 Kits

RNase free DNase Set	QIAGEN, Hilden, Deutschland
RNA 6000 Nano Kit	Agilent, Waldbronn, Deutschland
RNeasy Mini Kit	QIAGEN, Hilden, Deutschland
SuperScript II Reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
PCR Purification Kit	Quiagen, Hilden, Deutschland
QIAprep Miniprep	QIAGEN, Hilden, Deutschland
DC Protein Assay zur Konzentrationsmessung	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules CA, USA

3.1.5 Verbrauchsmaterialien

Reaktionsgefäße (2 ml, 1,5 ml, 0,5 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen (1000 μ l, 200 μ l, 10 μ l)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Falcon Tubes (15 ml, 50 ml)	BD Biosciences, San Jose, CA USA
Pipetten (1 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	BD Biosciences, San Jose, CA USA
96-Well Platte	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Blotting-Papier	Schleicher&Schüll, Dassel, Deutschland
Nitrocellulosefilter	Schleicher&Schüll, Dassel, Deutschland
Kanülen, Spritzen	Braun, Melsungen, Deutschland

3.1.6 Geräte

Photometer	Dynex Technologies Typ MRX, Chantilly, VA USA
NanoDrop Spectrophotometer ND 1000	Peqlab, Erlangen, Deutschland
PCR Thermocycler 9700	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
RTq-PCR-Cycler ABI 7000	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Chemoluminiszenzkammer Chemi Genius	Syngene, Cambridge, England
Chemoluminiszenzkammer Fusion FX 7	Vilber Lourmat, Torcy, Frankreich
Blottingkammer fast blot	Biometra, Goettingen, Deutschland
Gelelektrophoresekammer, Mini-PROTEAN II	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules CA, USA
Netzteil, Power Pac 300	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules CA, USA
Vortexer	Janke & Kunkel, Staufen, Deutschland
Zentrifuge	Heraeus, Hanau, Deutschland
Minizentrifuge	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Thermosublimationsdrucker UP-D890	Sony Corporation, Tokio, Japan
Ultra Turrax T8	IKA, Staufen, Deutschland
PH Meter	Schott, Mainz, Deutschland
Feinwaage	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Magnetrührer RCT basic	IKA, Staufen, Deutschland
Wasserband SW 20	Julabo, Saalbach, Deutschland
Rollenmixer SRT 9	Stuart, Staffordshire, Deutschland

3.1.7 Software

Primer Express V 2.0	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Fusion Ultimate 15.18	Vilber Lourmat, Torcy, Frankreich
Bio 1D Bioprofil 12.12	Vilber Lourmat, Torcy, Frankreich
Sequenz Detection V 1.2.3 TaqMan	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
ND 1000 3.7.0 NanoDrop	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Revelation G3.04 Photometer	Dynex Technologies, Chantilly, VA USA
Graph Pad Prisim V5	GraphPad Software, La Jolla, USA
Excel 2007	Microsoft, Redmond, USA

3.1.8 Zelllinien zur Positivkontrolle

Zur Erzeugung einer Proteinprobe, welche eine deutliche Aktivierung des MAPK Signalwegs zeigt, wurden immortalized human microvascular endothelial cells Typ 1 (HMEC-1) verwendet, welche mit einem Phorbol-Ester (TPA) für 1,5 h stimuliert worden sind, die Aktivierung des MAPK Signalwegs mit Phorbol-Ester ist eine gut etablierte Methode, die in verschiedenen Arbeiten genutzt worden ist u.a. durch Bovin 2012 (53).

3.2 Tiermodell

3.2.1 Haltung der Versuchstiere

Die verwendeten Versuchstiere wurden im Institut für molekulare Pathologie im Universitätsklinikum Tübingen gezüchtet und dort unter Standardbedingungen gehalten. Alle hier beschriebenen Versuche waren durch die Tierschutzbehörden genehmigt (Tiergenehmigungsnummer: PA 1/04, Regierungspräsidium Tübingen). Die verwendeten Mäuse entstammten den Stämmen A.BY/SnJ und C57Bl/6. Die Infektion der Versuchstiere erfolgte mit dem Cocksackie-Virus B3 vom Nancy Typ mit 5×10^4 PFU intra peritoneal.

Das Herz, die Nieren, das Pankreas und die Leber wurden entnommen und unverzüglich mit flüssigem Stickstoff gefroren und ununterbrochen bei -80°C gelagert. Es wurden jeweils nicht infizierte Versuchstiere (0d), Versuchstiere vier Tage nach der Infektion (4d), acht Tage nach der Infektion (8d), 12 Tage nach der Infektion (12d) und 28 Tage nach der Infektion (28d) getötet. Die Versuchstiere der genannten Mausstämmen wurden von der Arbeitsgruppe um Frau Prof. Dr. Klingel in verschiedenen Arbeiten genutzt bzw. hierfür gezüchtet (22, 54,55).

3.3 Methoden

3.3.1 Bestimmung der Proteinexpression

3.3.1.1 Proteinextraktion aus murinem Gewebe

Die entnommenen Mausherzen wurden halbiert und mit 500µl RIPA Puffer versetzt und mittels Ultra Turrax zerkleinert (ca. 30s), wobei die Proben auf Eis gelagert worden waren. Anschließend wurde das Gemisch per Douncer zerkleinert und zentrifugiert (12 000g für 30min). Am Schluss wurde das entstandene Pellet verworfen, der Überstand und die darin enthaltenen Proteine verwendet und bei -80°C eingefroren.

3.3.1.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der entstandenen Proteinkonzentration in der Probe erfolgte mittels des DC Protein Assay von Bio Rad. Hierzu wurden jeweils 5µl des Lysats in eine 96 Well Platte jeweils als Doppelwert pipettiert und mit den entsprechenden Lösungen (25µl Reagenz A, 200µl Reagenz B) des Assay versetzt. Nach 15 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde mittels Photometer die Extinktion bei 750nm bestimmt. Zur exakten Quantifizierung wurde eine definierte Standardreihe mit bekannter Konzentration aus bovinem Serum Albumin erzeugt.

3.3.1.3 Gelelektrophorese

Es wurden jeweils Proteinlösungen die 50µg Protein enthielten mit dem Probenladepuffer versetzt (jeweils 12,5µl) und H₂O ergänzt, so dass genau 25µl Lösung entstanden. Diese Lösungen wurden für 3min bei 95°C in einem Thermocycler denaturiert, währenddessen wurden die Elektrophorese-Kammern zusammengesetzt und mit dem Laufpuffer gefüllt.

Die 25µl Lösung wurden in die Ladetaschen des Sammelgels pipettiert. Zur Identifikation des jeweiligen Molekulargewichts ist der o.g. Molekulargewichtsmarker mitgeführt worden.

Tabelle 3) Elektrophoresegele

	Sammelgel (5% PAA)	Trenngel (10% PAA)
Rotiphorese Gel 30	0,835ml	5ml
1,5M Tris pH 8,8		3,75ml
0,5M Tris pH 6,8	1,25ml	
20%iges SDS	25µl	75µl
aqua dest.	2,89ml	6,175ml
10% APS (100 mg/ml)	50µl	150µl
TEMED	5µl	15µl

Zur elektrophoretischen Auftrennung wurde eine Spannung von 120V angelegt und eine Laufzeit von ca. 100min durchgeführt. Zusätzlich zu den murinen Proben wurden auf jeder Nitrozellulosemembran 5µg Gesamtprotein von HMEC-1 Zellen als Referenzprobe aufgetragen.

3.3.1.4 Western Blot

Nach dem Abschluss der elektrophoretischen Auftrennung, wobei darauf geachtet worden ist, dass die Lauffront weder aus dem Gel heraus gewandert ist, noch eine unzureichend weite Strecke zurückgelegt hat, wird die Elektrophorese-Kammer demontiert, das Sammelgel entfernt

und das Trenngel auf die Nitrozellulosemembran transferiert. Hierbei wurde darauf geachtet, dass 1. die Blotting-Papiere und Nitrozellulosemembranen gut in Transferpuffer getränkt sind und 2. das sowohl die Nitrozellulosemembran, wie auch das Trenngel luftblasenfrei aufgelegt werden. Der Aufbau der Blotting-Kammer gliederte sich wie folgt: es wurden 5 Stück Blotting-Papiert auf die Anode gelegt, darauf folgte die Nitrozellulosemembran, anschließend das Trenngel, erneut 5 Stück Blotting-Papier und die Kathode. Unerwünschte Luftblasen wurden mit Hilfe einer Glaspipette heraus gerollt. Die geschlossene Blotting-Kammer wurde mit einem Kilogramm Gewicht beschwert.

Das Blotten erfolgte mit ca. 10W über 60min. Im Anschluss erfolgte die Färbung der Nitrozellulosemembran mit Ponceau S. Stellte sich hierbei eine nicht gleichmäßige Bandenstärke oder eine nicht gradförmige Auftrennung dar, wurde die Membran verworfen und nicht weiter verwendet.

3.3.1.5 Blocken und Antikörperinkubation

Das Blocken der unspezifischen Proteinbindungsstellen erfolgte mittels 6% non fat dry Milk, welche in TBS gelöst worden war, über 60min unter ständiger leichter Bewegung der Membran bei Raumtemperatur. Hiernach wurde die Nitrozellulosemembran 30min in TBS bzw. TBS/T gewaschen.

Nun folgte die Inkubation des entsprechenden Primärantikörpers. Diese erfolgte bei Raumtemperatur über eine Stunde. Hierbei wurde die Nitrozellulosemembran ständig geringfügig bewegt. Nach einem erneuten Waschzyklus erfolgte die Inkubation des Sekundärantikörpers erneut über eine Stunde bei Raumtemperatur. Hieran schloss sich ein weiterer Waschzyklus an.

3.3.1.6 Detektion der Chemolumineszenz

Die Detektion der Proteine erfolgte mittels Chemolumineszenz. Hierzu wurden die Membranen mit dem Super Signal® West Pico Chemiluminescent Substrat benetzt und für 5min bei ständiger Bewegung inkubiert. Anschließend erfolgte die Detektion der Banden mithilfe des Vilber Lourmat Fusion FX 7 Advance Chemolumineszenz Systems. Die Belichtungszeit variierte je nach gewähltem Antikörper und wurde entsprechend angepasst. Hierbei wurde darauf geachtet, dass keine Sättigung des Signals auftrat. Nach Abschluss der Messung wurden die Membranen mit H₂O gereinigt und bei -20°C tiefgefroren.

3.3.1.7 Stripping der Nitrozellulosemembranen

Die Membranen wurden jeweils einmal zur erneuten Inkubation bzw. Detektion des Housekeeping-Proteins mit dem Stripping Buffer behandelt. Hierzu wurden die Membranen mit dem Stripping Buffer benetzt und für ca. 20min in einem 56°C warmen Wasserbad gewaschen. Hiernach erfolgten ein Waschzyklus und die Inkubation des primären und sekundären Antikörpers nach dem ursprünglichen Muster.

So wurde der ursprüngliche Primärantikörper abgelöst, so dass die Detektion des Housekeeping-Proteins an derselben Membran durchgeführt werden konnte. Es wurde darauf geachtet, dass das gewählte Housekeeping-Protein nicht dasselbe Molekulargewicht hatte, wie die vorher detektierten Proteine. Weiterhin wurde darauf geachtet, dass jede Nitrozellulosemembran nur wenige Male „gestrippt“ worden ist, um die Gefahr des Ablösens der gebundenen Proteine zu minimieren.

3.3.1.8 Beladung der Nitrozellulosemembranen

Es wurde für sämtliche Western Blot Versuche die selbe Beladung der Nitrozellulosemembranen gewählt. Es wurde jeweils eine Probe je eines Versuchstieres je postinfektösen Zeitpunkt auf dieselbe Nitrozellulosemembran geladen, wobei jede Nitrozellulosemembran einzig die Versuchstiere eines Mausstammes enthielt. So enthielt jede Nitrozellulosemembran je Mausstamm ein Versuchstier zu jedem vorhandenem postinfektösem Zeitpunkt. Zusätzlich wurden jeweils die identische HMEC-1 Kontrolle und ein Größenstandard mitgeführt.

3.3.1.9 Auswertung der detektierten Signale

Die Auswertung der detektierten Signale erfolgte in digitaler Form mit dem Programm Bio 1D Bioprofil V.12.12. Hierzu wurden die aufgenommenen Bilder digital übertragen.

Es wurde darauf geachtet, dass die von der Analysesoftware Bio 1D Bioprofil V.12.12 gewählten Einstellungen, bei den jeweiligen Nitrozellulosemembranen identisch gewesen sind, so dass eine gleichmäßige Messung gewährleistet werden konnte.

Zur Abschätzung des Molekulargewichtes erfolgte der direkte Vergleich mit dem mitgeführten Größenstandard. Zusätzlich konnte die zu erwartende „Höhe“ des zu bestimmenden Proteins anhand der Positivkontrolle abgeschätzt werden.

Die Auswertung der Signalbanden erfolgte im Vergleich des relativen Anstiegs im Verlauf der Infektion mit CVB3 innerhalb einer Nitrozellulosemembran, wobei das nicht infizierte

Versuchstier als Basalwert (1 bzw. 100%) herangezogen worden war. Diese gemessenen relativen Anstiege je Membran wurden gemittelt und zur statistischen Auswertung herangezogen. Alle ermittelten Messwerte wurden auf das Housekeeping-Protein bezogen.

Es wurde zudem ein Vergleich der absoluten basalen Expression von EGR-1 vom präinfektiösen Zeitpunkt angestellt. Hierfür wurde die Signalbande der HMEC-1 Positivkontrolle auf jeder einzelnen Nitrozellulosemembran ausgemessen, auf das Housekeeping-Protein bezogen und daraus ein entsprechender Vergleichsfaktor für jede einzelne Nitrozellulosemembran errechnet. Dieser Vergleichsfaktor wurde als technische Adjustierung genutzt, um die jeweiligen Messwerte der Versuchstiere in einem Intermembranvergleich auszuwerten.

Für die Bestimmung der Proteinexpression von EGR-1 wurde das in der wissenschaftlichen Literatur beschriebene Signal des biologisch aktiven EGR-1 mit einem Molekulargewicht um 80 kDa ausgewertet.

Zur Untersuchung des MAP-Kinase Wegs auf Proteinebene wurde die Expression von ERK-2 herangezogen, da die Signale für ERK-2 durchgehend deutlich stärker waren als die Signale für ERK-1 und damit technisch robustere Signalmessungen möglich waren.

Es erfolgte jeweils eine Standardisierung der detektierten Signale auf die für GAPDH als Housekeeping-Protein gemessenen Signale. Die so ermittelten Werte wurden in Excel übertragen, dort formatiert und statistisch aufgearbeitet. Die Graphen wurde mithilfe der Software GraphPad Prism Version 5 und Excel 2007 erstellt. Eine statistisch signifikante Abweichung zwischen den jeweils detektierten Signalbanden wurde ab einem p Wert von $\leq 0,05$ angenommen, wobei der Student-t-Test verwandt worden ist.

3.3.2 Bestimmung der mRNA Expression

3.3.2.1 RNA Isolierung

Es wurden jeweils ca. 100mg murines Herzgewebe in ca. 1ml Trizol gegeben und per Ultra Turrax homogenisiert. Im Anschluss wurden die Proben zentrifugiert, das entstandene Pellet verworfen und 200µl Chloroform dazugegeben. Hieran wurden die Proben erneut zentrifugiert und der gewonnene klare Überstand in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und mit 500µl Isopropanol versetzt. Nach 10min Inkubationszeit wurde das Gemisch erneut zentrifugiert. Die RNA setzte sich nun als Pellet am Boden ab, der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 75% Ethanol gewaschen, luftgetrocknet, in H₂O gelöst und dann bei -80°C gelagert.

3.3.2.2 Reinheitskontrolle und Qualitätsanalysen

Die Reinheitskontrolle der isolierten RNA erfolgte mittels Extinktionsmessung per Photometer, wobei der Quotient der Absorptionsmaxima zwischen 260nm und 280nm zwischen 1,65 und 2,2 betragen musste, damit eine Verunreinigung mit Proteinen bzw. DNA ausgeschlossen und von einer hinreichenden Reinheit ausgegangen werden konnte.

Im Anschluss erfolgte die Kontrolle mittels des Spektralphotometers NanoDrops, wobei die Absorptionskurve bei 260nm bestimmt worden ist, um eine mögliche DNA Verunreinigung zu messen.

Die Qualitätsanalyse der RNA erfolgte mittels Gelelektrophorese und Bioanalyzer. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 90V mittels 2% Agarosegel (mit Ethidiumbromid versetzt) und TBE Laufpuffer. Die Integrität der RNA wurde mittels Gelelektrophorese und Darstellung der 18S und 28S RNA überprüft. Die Messungen mit Hilfe des Bioanalyzers wurden mit dem RNA 6000 Nano Kit (Agilent) nach Herstellerprotokoll durchgeführt.

Die gewonnen RNA Lösungen wurden, um potentielle Verunreinigungen mit DNA zu entfernen mit Hilfe des RNeasy Mini Kit und RNase free DNase Set (QIAGEN) aufgereinigt und ein „Dnase Dau“ nach Herstellerangaben durchgeführt.

Die Bestimmung der RNA Menge wurde mit Hilfe des Spektralphotometers NanoDrop den Herstellerspezifikationen entsprechend bestimmt.

3.2.2.3 Reverse Transkription

Die Synthese der cDNA erfolgte mit Hilfe des SuperScript II Reverse Transkriptase Kits (Invitrogen). Hierzu wurden 10µl RNA (bei einer Verdünnung von 40ng/µl) nach folgendem Schema verarbeitet:

Tabelle 4) cDNA Synthese

		Reaktionsbedingungen:
Annealing der Primer	dNTPs je 10 mM, 1 µl	65°C für 5min
	Random Hexamers 100 µM, 1 µl	25°C für 2min
	5x First Strand Buffer, 4 µl	
	DTT 0,1 M, 2 µl	
	RNAsin Plus 40 U/µl, 1 µl	
Reverse Transkription	Superskript II, 1 µl	42°C 50 Minuten
		70°C 10 Minuten
		4°C 5 Minuten

Die erzeugte cDNA wurde anschließend bei -20°C gelagert.

3.2.2.4 Design der Primer

Sämtliche verwendeten Primerpaare wurden anhand der Sequenz der entsprechenden mRNA-Sequenzen, ermittelt mithilfe der Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), spezifisch synthetisiert. Die Primer sollten eine Länge zwischen 19 bis 26 Nukleotiden haben und innerhalb eines Paares eine ähnliche Annealing- Temperatur aufweisen.

Zusätzlich wurde das Programm Primer Express (Applied Biosystems) zur Unterstützung eingesetzt. Am Ende durchliefen die Primer zur Überprüfung der Spezifität den Algorithmus BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

3.2.2.5 Erzeugung der Standardreihen für die Durchführung der quantitativen PCR

Um die nötige Vergleichbarkeit und eine absolute Quantifizierung der einzelnen TaqMan-Messwerte zu ermöglichen, wurde mittels cDNA Amplikons eine Standardreihe mit bekannter Konzentration erzeugt. Dazu wurden Primer nach dem in 4.2.6 genannten Schema entworfen, welche außerhalb der zu amplifizierenden Sequenz liegen und ein geringfügig größeres Amplikon erzeugen.

Nach folgendem Ablauf wurde mit den synthetisierten o.g. Primern eine PCR durchgeführt:

Tabelle 5) Standardreihen PCR

Reagenzien:	Reaktionsbedingungen:
EGR-1 Standardreihe	
10x PCR Buffer	95°C 2min
MgCl ₂ 50 mM	35 Zyklen
dNTP 10 mM	95°C 30s
EGR-1 fwd 10µM	64°C 30s
EGR-1 bwd 10µM	72°C 1min
Rapidozym Taq	72°C 10min
	4°C 5min
18s Standardreihe	
10x PCR Buffer	95°C 2min
MgCl ₂ 50 mM	35 Zyklen
dNTP 10 mM	95°C 30s
18s Standardreihe fwd 10µM	64°C 30s
18s Standardreihe bwd 10µM	72°C 1min
Rapidozym Taq	72°C 10min
	4°C 5min

Die erzeugten PCR Produkte wurden mittels Gelelektrophorese (1,5% Agarose, 90V) aufgetrennt und mittels Größenmarker qualitativ analysiert.

Die jeweiligen PCR Produkte wurde anschließend mittels des PCR Purification Kit (Quiagen) aufgereinigt und die Konzentration mittels NanoDrop bestimmt.

Abschließend wurde eine Verdünnungsreihe im Bereich von 0,1ng/µl – 0,1 fg/µl erzeugt.

3.2.2.6 Quantitative Bestimmung der EGR-1 mRNA

Die Expression der EGR-1 mRNA wurde mittels sondenbasierter TaqMan Analyse gemessen. Hierzu wurde das Assay Mm00656724_m1 (Applied Biosystems) verwendet. Das Assay verfügte über eine FAM und Quencher Sonde. Es wurden jeweils Triplets pipettiert, eine Negativkontrolle, in welcher die cDNA durch Wasser ersetzt worden war, mitgeführt und eine jeweils identische Standardreihe mit bekannter Konzentration verwendet. Die Tabelle 6 zeigt das Pipettierschema und die Reaktionsbedingungen.

Tabelle 6) TaqMan PCR

Reagenzien (Volumen je Probe):

Universal Master Mix 10µl

Assay 0,5µl

cDNA 1µl

H₂O ad 25µl

Reaktionsbedingungen:

50°C 2min

95°C 10min

40 Zyklen

95°C 15s

60°C 1min

Die Quantifizierung erfolgte mithilfe der delta Ct-Werte (56), die jeweils den Punkt bzw. den Replikations-Zyklus darstellen, an dem die gemessene Fluoreszenz der TaqMan-Sonden bzw. des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR Green (siehe 4.2.9) erstmals über die Hintergrundfluoreszenz anstiegen (Ct-Wert: englisch für Cycle Threshold). Die Ct-Werte wurden dann mithilfe der Standardreihe auf die jeweilige Proben-Konzentration umgerechnet. Jeder Messwert wurde auf den zugehörigen Wert der Expression des Housekeeping-Gens GAPDH bezogen.

3.2.2.7 SYBR Green basierte TaqMan Analyse

Die Expression des gewählten Housekeeping-Gens 18S erfolgte mittels der Fluoreszenz-Farbstoff basierten SYBR Green PCR. Die benötigten Primer wurden hierzu nach dem in 4.2.6 Schema erzeugt und synthetisiert. Ebenfalls erfolgte die unter 4.2.7 genannte Kontrolle der Primer mittels Gelelektrophorese.

Es wurden Triplets pipettiert, eine Negativkontrolle mitgeführt, in welcher die cDNA durch Wasser ersetzt worden war und eine jeweils identische Standardreihe mit bekannter Konzentration verwendet. Die Tabelle zeigt das Pipettierschema und die Reaktionsbedingungen.

Tabelle 7) SYBR Green PCR

Reagenzien (Volumen je Probe):

SYBR Green Master Mix 10µl

18s Primer fwd 10µM 0,5µl

18s Primer bwd 10µM 0,5µl

cDNA 1µl

H₂O ad 20µl

Reaktionsbedingungen:

50°C 2min

95°C 10min

40 Zyklen

95°C 15s

60°C 1min

Die Analyse erfolgte ebenfalls mithilfe der delta Ct-Werte.

3.2.2.8 Statistische Auswertung der mRNA Expression

Die Ergebnisse der TaqMan Messungen wurden mit Hilfe von Excel 2007 formatiert und statistisch ausgewertet. Die Graphen wurde mithilfe der Software GraphPad Prism Version 5 und Excel 2007 erstellt. Eine statistische Signifikanz zwischen zwei Proben bzw. Probengruppen wurde ab einem p Wert von $\leq 0,05$ angenommen, von einer hohen statistischen Signifikanz wurde ab einem p Wert von $\leq 0,01$ ausgegangen. Verwandt worden ist der Student-t-Test.

4 Ergebnisse

4.1 Proteinexpression

4.1.1 Aktivierung des MAP-Kinase Wegs

4.1.1.1 Proteinexpression von ERK-1/2 (p44/42)

Die Western Blots ergaben zwei Signalbanden, die der erwarteten Höhe von ca. 44 bzw. 42 kDa entsprachen, dies wurde zudem durch die Signale stimulierter HMEC-1 Zellen (Positivkontrolle, nicht gezeigt) bestätigt.

Die Auswertung der Änderung der Proteinexpression im Verlauf der Infektion erfolgte jeweils Bezogen auf einen relativen Wert, der als 1 bzw. 100% gesetzt worden ist. Dieser Wert war jeweils der Basalwert der Expression von ERK-2 (p42) im nicht infizierten Kontrolltier, siehe Abbildung 3.

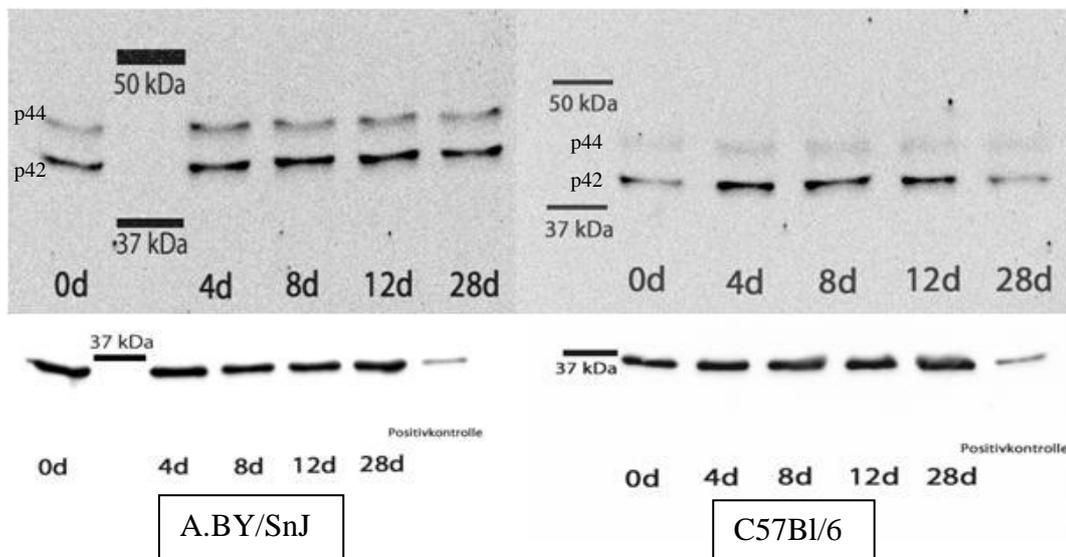


Abbildung 3) Western Blot der kardialen Proteinexpression von ERK-1/2, sowie der korrespondierenden GAPDH Kontrollen im Verlauf der Infektion. Links ist beispielhaft ein Western Blot mit Proteinen des A.BY/SnJ Mausstamms dargestellt, rechts ein Western Blot des Mausstamms C57Bl/6.

4.1.1.1.1 Kardiale Proteinexpression von ERK-2 (p42) im permissiven Mausmodell A.BY/SnJ

Die kardiale Proteinexpression von ERK-2 im permissiven Mausmodell A.BY/SnJ ist in Abbildung 4 als Einzelwertdarstellung gezeigt. Hierbei zeigt sich eine deutliche Steigerung der Proteinexpression, die zum achten postinfektiösen Tag ihr Maximum erreicht (2,6-fach im Vergleich zum Wert der nicht infizierten Kontrolltiere, $p < 0,05$) und bis zum 28. postinfektiösen Tag (2,2-fach im Vergleich zum Wert der nicht infizierten Kontrolltiere, $p < 0,05$) erhalten bleibt. Wobei sich zum 28. postinfektiösen Tag ein geringer Rückgang andeutet.

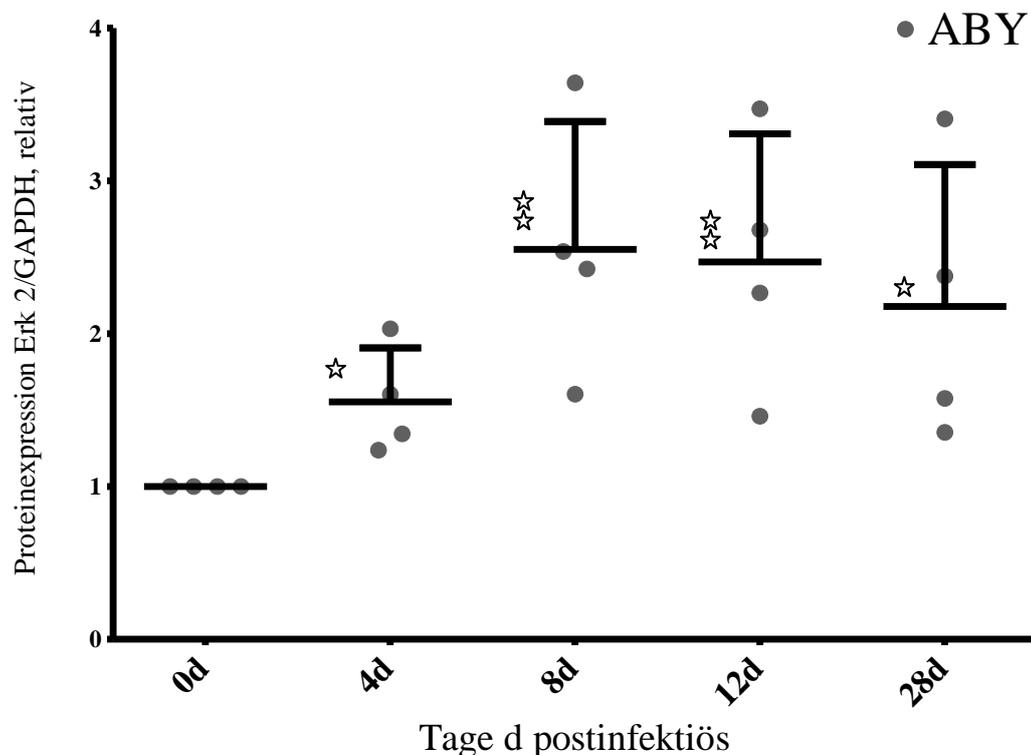


Abbildung 4) Proteinexpression von ERK-2 im Verlauf der CVB3-Infektion im permissiven Mausmodell A.BY/SnJ. Die Daten werden als Einzelwerte und MW \pm SD der relativen Expression dargestellt. Pro Zeitpunkt lagen 4 verschiedene Versuchstiere je Mausstamm vor. * = $p < 0,05$ ** = $p < 0,01$, jeweils bezogen auf den Anstieg von der jeweiligen nicht infizierten Kontrolle.

4.1.1.1.2 Kardiale Proteinexpression von ERK-2 (p42) im resistenten Mausmodell C57Bl/6

Die kardiale Proteinexpression von ERK-2 im resistenten Mausmodell C57Bl/6 ist in Abbildung 5 als Einzelwertdarstellung gezeigt. Hierbei zeigt sich eine deutliche Steigerung der Proteinexpression, die zum achten postinfektiösen Tag ihr Maximum erreicht (1,6-fach im Vergleich zum Wert der nicht infizierten Kontrolltiere, $p < 0,05$). Im Verlauf der Infektion zeigt

sich ab dem zwölften postinfektiösen Tag ein Rückgang der Proteinexpression (1,4-fach im Vergleich zum Wert der nicht infizierten Kontrolltiere, $p < 0,05$), am 28. postinfektiösen Tag ließ sich keine erhöhte Expression im Vergleich zum Wert der nicht infizierten Kontrolltiere mehr feststellen.

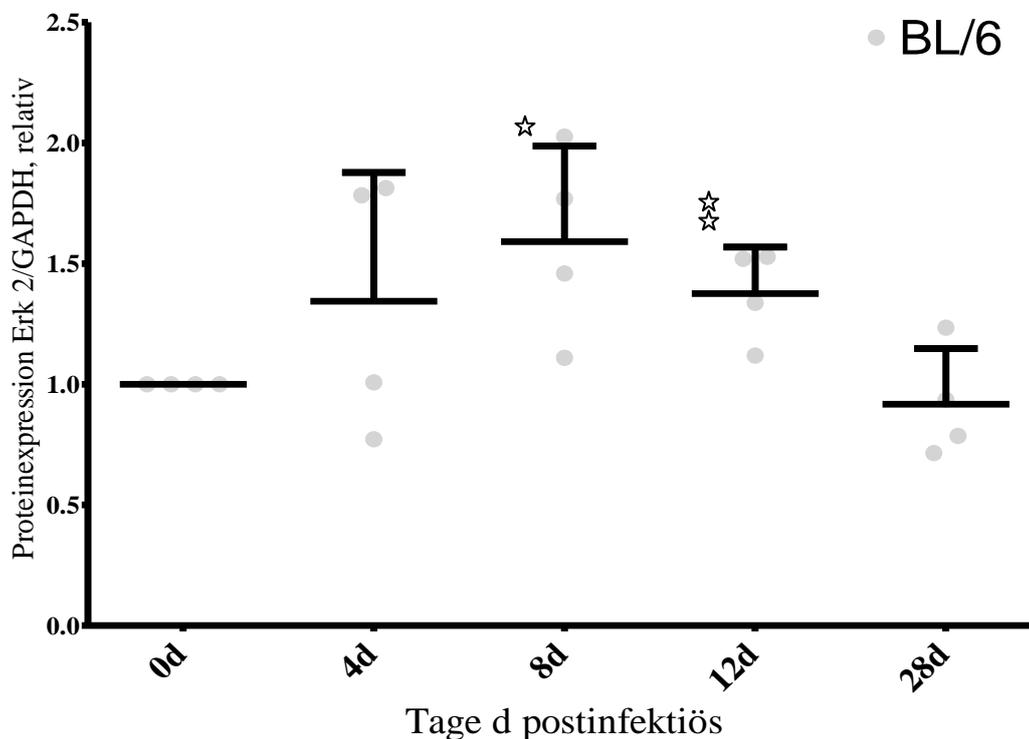


Abbildung 5) Proteinexpression von ERK-2 im Verlauf der Infektion im resistenten Mausmodell C57Bl/6. Die Daten werden als Einzelwerte und $MW \pm SD$ der relativen Expression dargestellt. Pro Zeitpunkt lagen 4 verschiedene Versuchstiere je Mausstamm vor. *= $p < 0,05$ **= $p < 0,01$, jeweils bezogen auf den Anstieg von der jeweiligen nicht infizierten Kontrolle.

4.1.1.1.3 Kardiale Proteinexpression von ERK-2 (p42) im Vergleich der beiden Mausmodelle

Abbildung 6 zeigt den gemessenen relativen Proteinexpressionslevel von ERK-2 im Verlauf der Infektion bei beiden Mausmodellen. Der permissive Mausstamm A.BY/SnJ zeigte zu jedem gemessenem Zeitpunkt, ausgehend vom Wert der nicht infizierten Kontrolltiere, eine signifikante Expressionszunahme mit einer persistierenden Erhöhung bis zum Tag 28 p.i. Die Tiere des resistenten Stammes C57Bl/6 zeigten hingegen erst zum Tag 8 p.i. eine bis zum Tag 12 p.i. persistierende signifikante Zunahme des Expressionslevels. Am Tag 28 p.i. erreichte das

Expressionsniveau wieder den Ausgangswert der nicht infizierten Kontrolle, wobei eine geringe statistisch nicht signifikante Unterschreitung der basalen Expression gemessen worden war.

Es zeigte sich also für jeden der beiden Mausstämme eine charakteristische Änderung der Proteinexpression. Es konnte gezeigt werden, dass ein signifikant höherer relativer Anstieg der Proteinexpression an den Tagen p.i. 12 und 28 bei den Tieren des permissiven A.BY/SnJ Maustamms gegenüber des resistenten C57Bl/6 Maustamms bestand.

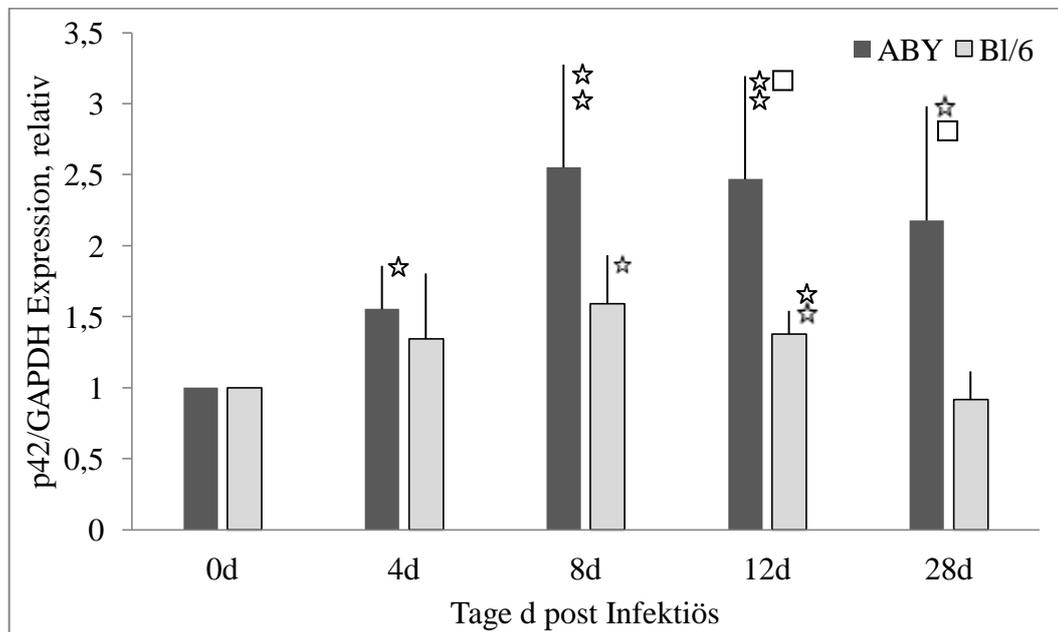


Abbildung 6) Proteinexpression von ERK-2 im Verlauf der CVB3-Infektion für A.BY/SnJ und C57Bl/6 Tiere. Die Daten werden als $MW \pm SD$ der relativen Expression, bezogen auf die jeweiligen nicht infizierten Tiere dargestellt. Pro Zeitpunkt lagen 4 verschiedene Versuchstiere je Mausstamm vor. * = $p < 0,05$ ** = $p < 0,01$, jeweils bezogen auf den Anstieg der jeweiligen nicht infizierten Kontrolle. □ $p < 0,05$, Bezogen auf einen Unterschied im Expressionslevel von C57Bl/6 zu A.BY/SnJ.

4.1.1.1.4 Kardiale Proteinexpression von ERK-1/2 (p44/42): Vergleich der Expression von ERK 1 und 2

Die Expression von ERK-1 und -2 wurde näher untersucht, um den offensichtlichen Unterschied in der Expression genauer zu bestimmen. Hierzu wurden die Messwerte von ERK-1 und von ERK-2 der nicht infizierten Kontrolltiere verglichen und ein entsprechender Quotient gebildet. Diese wurden dann mit den korrespondierenden Messwerten und Quotienten der Versuchstiere von Tag 8 p.i. verglichen. So war ein Vergleich des Expressionsverhältnisses von ERK-1/2 bei

einem nicht durch die Infektion aktivierten MAP-Kinase Weg (am Tag 0 bzw. präinfektiös) und bei einem besonders stark aktivierten MAP-Kinase Weg möglich (Tag 8 p.i.). Jedoch war technisch lediglich der Vergleich dieser Zeitpunkte möglich, da lediglich hier die gemessenen Signale von ERK-1 ausreichend intensiv für die robuste Auswertung erschienen.

Die Expression von ERK-2 (p42) zeigte sich durchweg hoch signifikant stärker (siehe Abbildung 7) als die Expression von ERK-1 (p44). Wobei jedoch bei ERK-2 (p42) wie ERK-1 (p44) ein Anstieg der Expression festgestellt werden konnte, wobei sich die jeweiligen Quotienten im Verlauf der Infektion nicht signifikant unterschieden. Es kann also von einer gleichartigen Expressionssteigerung ausgegangen werden.

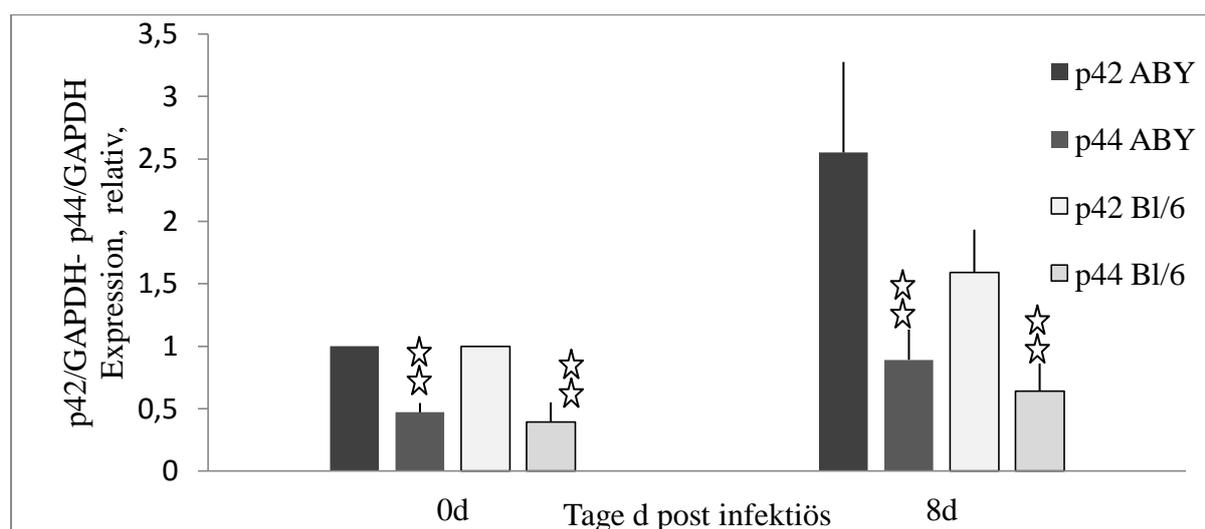


Abbildung 7) Proteinexpression von ERK-2 (p42)/GAPDH und ERK-1 (p44)/GAPDH. Die Daten werden als $MW \pm SD$ der relativen Expression, bezogen auf die p42/GAPDH Expression der jeweiligen nicht infizierten Tiere dargestellt. Pro Zeitpunkt lagen 4 verschiedene Versuchstiere je Mausstamm vor. * = $p < 0,05$ ** = $p < 0,01$, bezogen auf den Unterschied der p42 p44 Expression.

4.1.1.2 Proteinexpression des phosphorylierten ERK-1/2(p44/42)

Die Bestimmung der Aktivierung des MAP Kinase Wegs erfolgte mittels Untersuchung der Expression des phosphorylierten ERK-1/2. Die Analyse des phosphorylierten ERK-1/2 erfolgte mittels Western Blot. In Abbildung 8 sind die Nitrozellulosemembranen und die jeweiligen Signalbanden dargestellt. Es zeigten sich die erwarteten Signale für p42 und p44.

Es zeigten sich bereits innerhalb eines Mausstammes, sowohl im permissiven A.BY/SnJ wie auch im resistenten Modell C57Bl/6, hoch variable und uneinheitliche Signalintensitäten (Abb. 8). Zusätzlich fiel bei einigen Tieren bereits prä infectionem eine deutliche Phosphorylierung und damit Aktivierung auf. So zeigte sich im permissiven Mausmodell A.BY/SnJ bereits bei zwei nicht infizierten Versuchstieren eine deutliche Signalbande, während bei den anderen nicht infizierten Versuchstieren keine signifikante Signalbande zu erkennen war. Auch zeigen die Signalbanden der postinfektiösen Tage 4, 8 und 12 im permissiven Mausmodell A.BY/SnJ eine eher willkürliche Verteilung der Signalintensität auf. So zeigten erneut zwei Versuchstiere am achten postinfektiösen Tag eine deutliche Signalbande, wohingegen zwei Versuchstieren keine signifikante Signalbande zeigten. Auch im resistenten Mausmodell C57Bl/6 zeigten sich am 12. postinfektiösen Tag unter den Versuchstieren deutlich wechselnde Signalintensitäten.

All dies deutet auf starke Störfaktoren hin, die einen Einfluss auf die jeweilige Signalstärke bzw. die Expression nehmen und eine verlässliche statistische Auswertung verhindern.

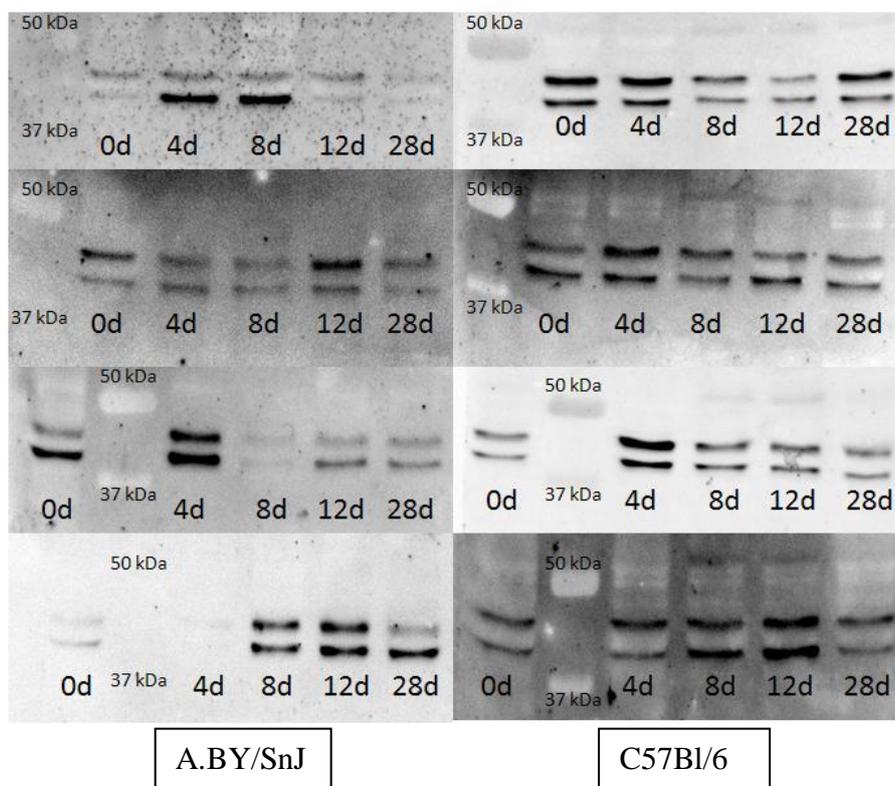


Abbildung 8) Proteinexpression von p-p44/p42 im Verlauf der Infektion. Links sind die Tiere des resistenten Mausstammes C57Bl/6 dargestellt, rechts des permissiven Mausstammes A.BY/SnJ.

4.1.2 Proteinexpression von EGR-1 im Verlauf der CVB3 Infektion

Die Proteinexpression von EGR-1 im Verlauf der Infektion mit CVB3 wurde mittels Western Blot Versuchen untersucht. Die Auswertung der Nitrozellulosemembranen ergab das unter Abbildung 9 exemplarisch dargestellte Bild.

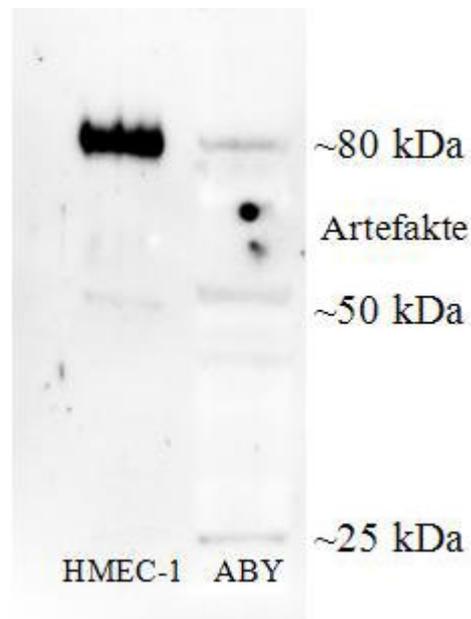


Abbildung 9) Western Blot, vollständige Spur. Links ist die stimulierte HMEC-1 Zelllinie aufgetragen, rechts ein Kontrolltier des A.BY/SnJ Stamms.

Der Western Blot zeigte für EGR-1 bei den Versuchstieren eine Signalbande im Bereich des erwarteten Molekulargewichts von ca. 80 kDa. Zusätzlich zeigte sich schwächer die in der Literatur beschriebene schwächere Signalbande bei ca. 55 kDa.

Die Abbildung 10 zeigt exemplarisch die Expression von EGR-1 innerhalb der beiden Mausstämme.

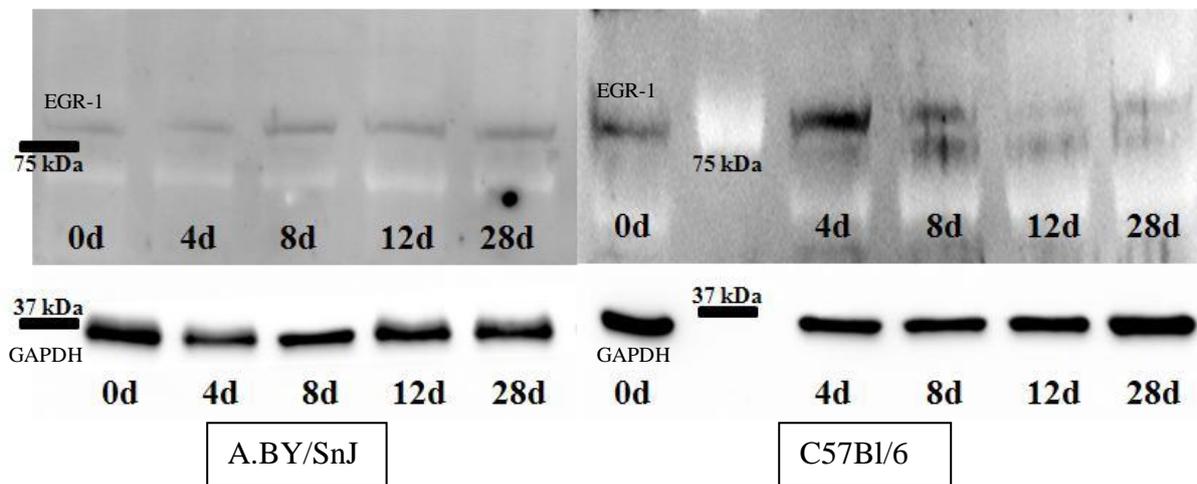


Abbildung 10) Zwei exemplarische Western Blots. Links des Mausstamms A.BY/SnJ und rechts des Mausstamms C57Bl/6. Dargestellt ist die Signalbande des EGR-1 und des Housekeeping-Proteins GAPDH.

4.1.2.1 Proteinexpression von EGR-1 im Verlauf der CVB3 Infektion im permissiven Mausmodell A.BY/SnJ

In der Abbildung 11 ist der zeitliche Verlauf der Proteinexpression von EGR-1 im permissiven Mausmodell A.BY/SnJ, im Verlauf der Infektion als Einzelwertdarstellung gezeigt. Lediglich am Tag 28 zeigt sich ein Anstieg, der aber insgesamt statistisch nicht signifikant war. Die Mittelwerte zeigen für die Tage 4, 8, und 12 p.i. lediglich eine geringe Veränderung der Expression, wobei aufgrund der hohen Standardabweichung eine Steigerung der Expression nicht statistisch signifikant gezeigt werden konnte.

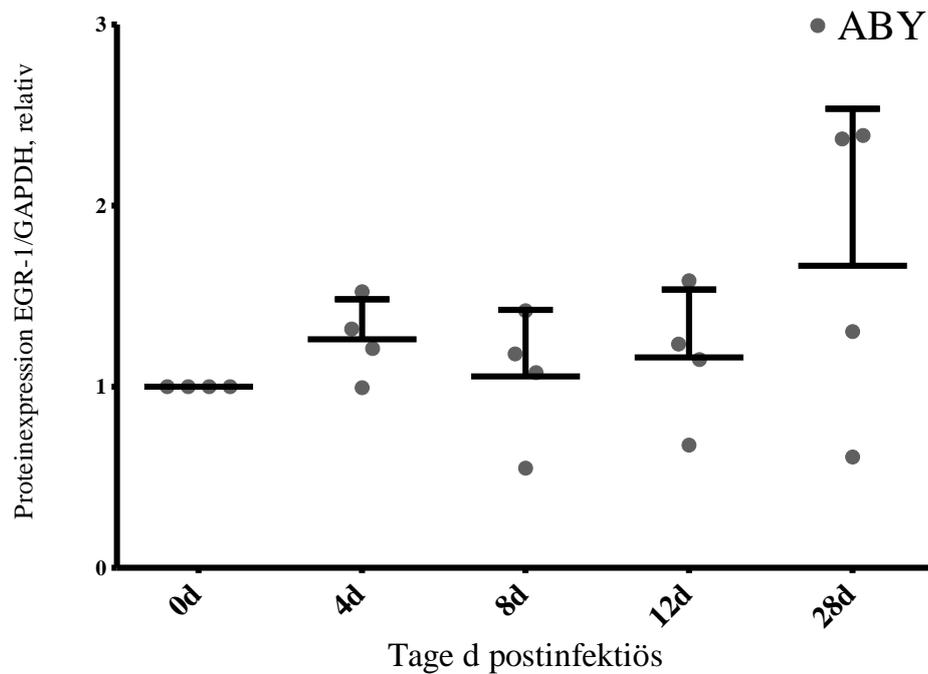


Abbildung 11) Proteinexpression von EGR-1 im Verlauf der Infektion im permissiven Mausmodell A.BY/SnJ als Einzelwertdarstellung. Die Daten werden als MW \pm SD der relativen Expression, bezogen auf die jeweiligen nicht infizierten Tiere dargestellt. Pro Zeitpunkt lagen 4 verschiedene Versuchstiere je Mausstamm vor.

4.1.2.2 Proteinexpression von EGR-1 im Verlauf der CVB3 Infektion im resistenten Mausmodell C57Bl/6

Die Proteinexpression von EGR-1 im resistenten Mausmodell C57Bl/6 ist über den Verlauf der Infektion als Einzelwertdarstellung in Abbildung 12 gezeigt.

Die Versuchstiere des resistenten Mausstamms C57Bl/6 zeigten bereits zum vierten postinfektiösen Tag einen statistisch hoch signifikanten 1,8-fachen Anstieg in der Proteinexpression ($p < 0,01$). Im Anschluss zeigte sich bereits am Tag 8 p.i. ein Rückgang der Proteinexpression fast auf das Ausgangsniveau der nicht infizierten Kontrolltiere. An Tag 28 p.i. zeigte sich im Vergleich zum Wert nicht infizierter Kontrollen ein geringer, aber hoch signifikanter Abfall der Proteinexpression ($p < 0,01$).

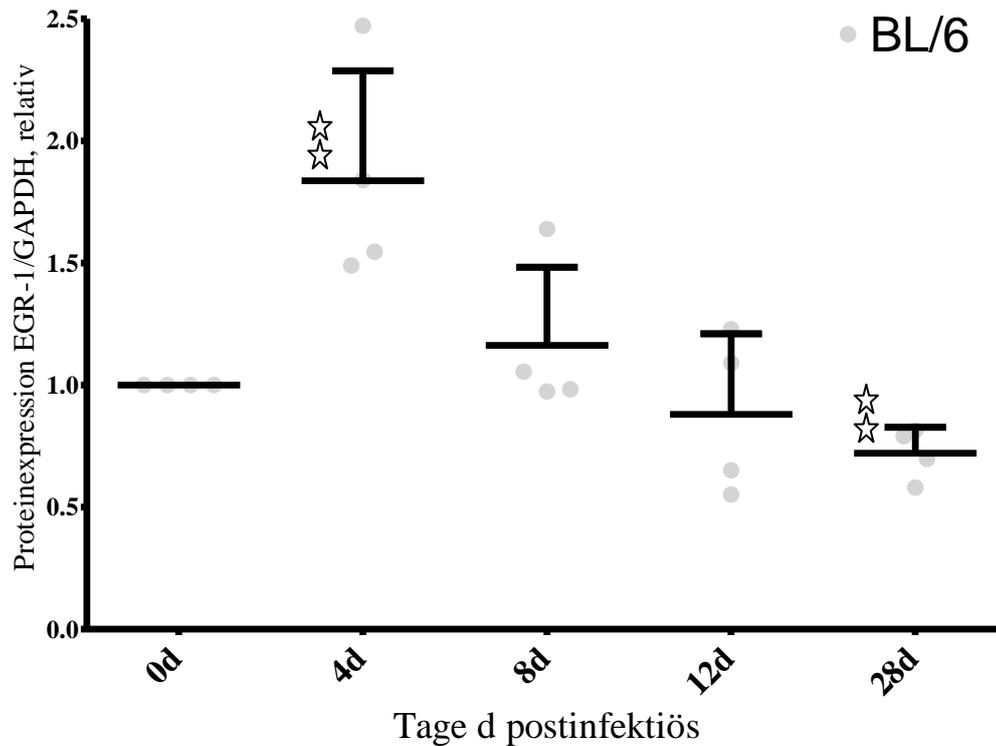


Abbildung 12) Proteinexpression von EGR-1 im Verlauf der Infektion im resistenten Mausmodell C57Bl/6 als Einzelwertdarstellung. Die Daten werden als MW \pm SD der relativen Expression, bezogen auf die jeweiligen nicht infizierten Tiere, dargestellt. Pro Zeitpunkt lagen 4 verschiedene Versuchstiere je Mausstamm vor. * = $p < 0,05$ ** = $p < 0,01$, jeweils bezogen auf den Anstieg der jeweiligen nicht infizierten Kontrolle.

4.1.2.3 Proteinexpression von EGR-1 im Verlauf der CVB3 Infektion im Vergleich beider Mausmodelle

Bei der Betrachtung der Unterschiede der relativen Proteinexpression zwischen beiden Mausmodellen fällt die Tendenz des im Mittelwert ansteigendem bzw. konstant erhöhtem Proteinexpressionslevel im permissiven Mausstamm A.BY/SnJ auf, während im resistenten Mausstamm C57Bl/6 der signifikante Abfall der relativen Proteinexpression an Tag 28 auftrat. Es zeigte sich im Vergleich zwischen den beiden Mausmodellen eine signifikant erhöhte relative Proteinexpression am 28. postinfektiösen Tag im Mausstamm A.BY/SnJ verglichen mit der relativen Proteinexpression des Mausstamms C57BL/6. In Abbildung 13 ist die relative Proteinexpression beider Mausstämme im Verlauf der Infektion dargestellt.

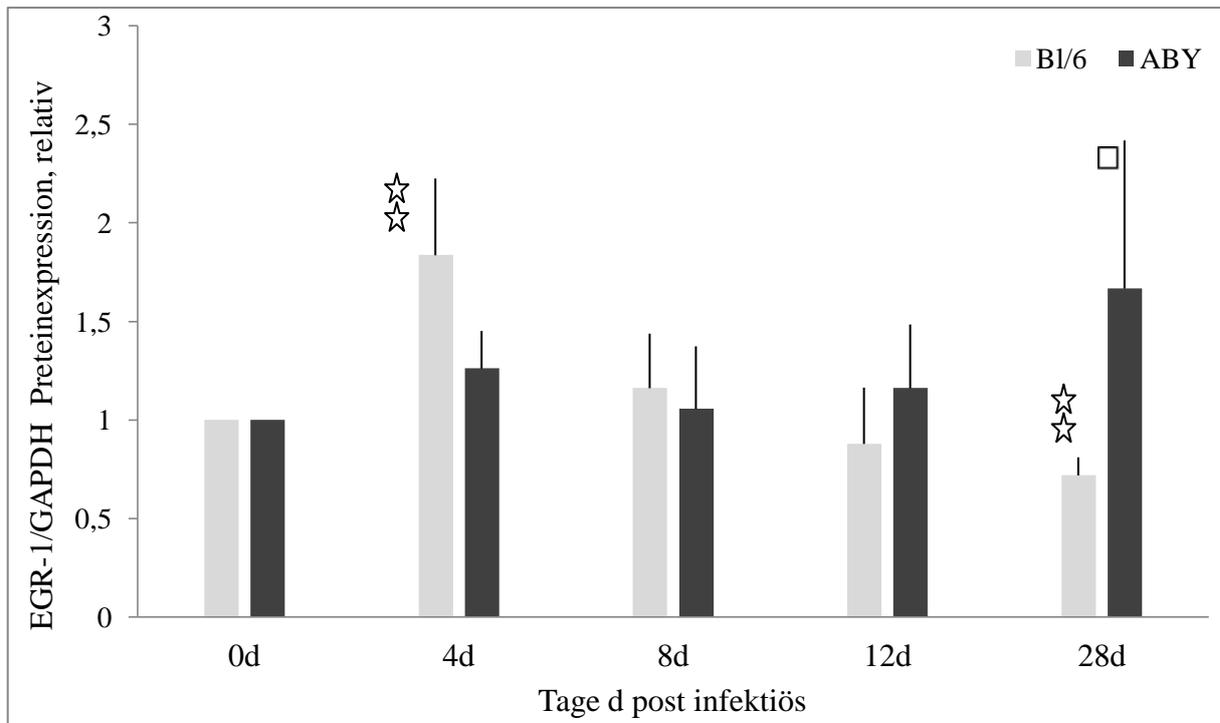


Abbildung 13) Proteinexpression von EGR-1 im Verlauf der CVB3-Infektion. Die Daten werden als $MW \pm SD$ der relativen Expression, bezogen auf die jeweiligen nicht infizierten Tiere dargestellt. Pro Zeitpunkt lagen 4 verschiedene Versuchstiere je Mausstamm vor. * = $p < 0,05$ ** = $p < 0,01$, jeweils bezogen auf den Anstieg der jeweiligen nicht infizierten Kontrolle. □ = $p < 0,05$, Unterschied zwischen der relativen Proteinexpression von A.BY/SnJ und C57Bl/6.

Um die Proteinexpression der nicht infizierten Kontrolltiere zu ermitteln und ggf. einen Mausstamm-spezifischen Unterschied zu ermitteln, wurde der Vergleich der absoluten Proteinexpression mittels Vergleich der HMEC-1 Positivkontrolle angestellt. Abbildung 14 zeigt die entsprechenden Messwerte.

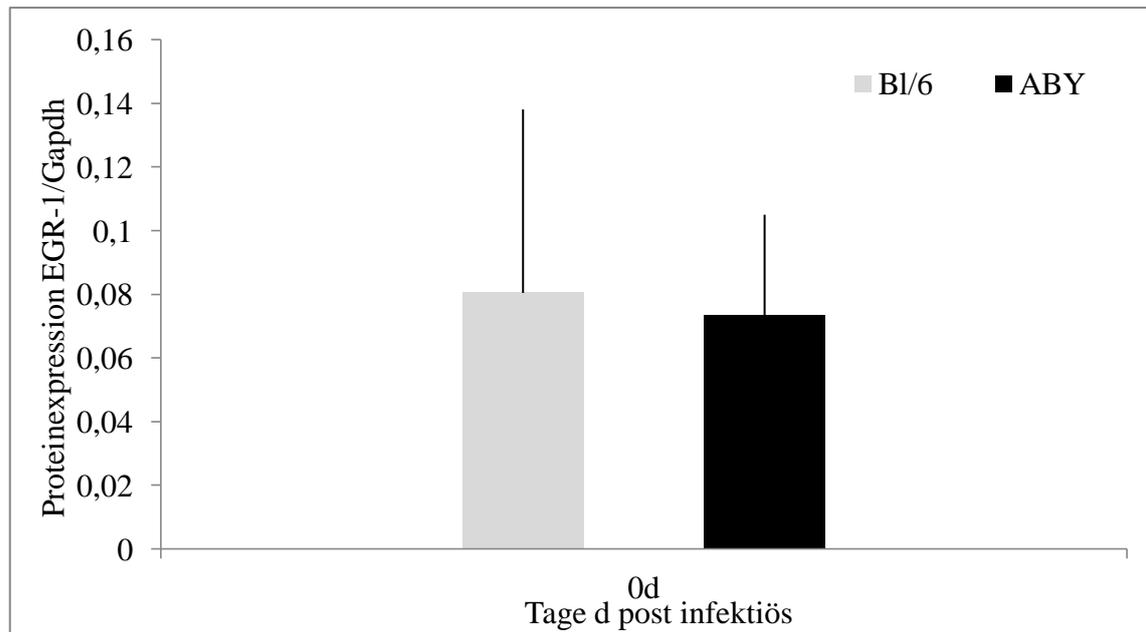


Abbildung 14) Proteinexpression von EGR-1/GAPDH der nicht infizierten Versuchstiere. Die Daten werden als $MW \pm SD$ der absoluten Expression dargestellt. Pro Zeitpunkt lagen 4 verschiedene Versuchstiere je Mausstamm vor ($n=4$).

Die Messung der absoluten Proteinexpression zeigte im Mittel zwischen dem permissiven A.BY/SnJ und dem resistenten Mausstamm C57Bl/6 keinen Unterschied.

4.2 Molekularbiologische Untersuchungen

4.2.1 Expression der kardialen mRNA des EGR-1 im Verlauf der Infektion

4.2.1.1 Real Time PCR Untersuchung – Erstellung der Standardreihe für EGR 1

Zur quantitativen Bestimmung der absoluten Expression der mRNA Expression ist eine Standardreihe mit bekannter cDNA-Konzentration erstellt worden. In Abbildung 15 ist der die Primer-Sequenzen betreffende Bereich der EGR-1 mRNA abgebildet. Zur Übersicht ist die Sequenz der Sonde des Applied Biosystem Assay eingezeichnet, diese wird von den designten Primern eingeschlossen. Das erzeugte Amplikon entsprach der erwarteten Größe von 452 bp (Abb.16).

```

1-
121 ggccgcggt accgccagcc tgggggccc cctacactcc ccgcagtgtg ccctgcacc
181 ccgcatgtaa cccggccaac cccggcgag tgtgccctca gtacttcgg cccggggtg
241 cggccaccac ccaacatcag ttctccagct cgctggtccg ggatggcagc ggccaaggcc
301 gagatgcaat tgatgtctcc gctgcagatc tctgacctg tggctcctt tctcactca
      EGR-1 Standardreihe fwd →
361 ccacatgg acaactacccaaactggaggagatgatgtgctgagcaa cggggtccc
421 cagttcctcg gtgctgccgg aacccagag ggcagcggcg gtaatagcag cagcagcacc
481 agcagcgggg gcggtgtgg gggcggcagc aacagcggca gcagcgcctt caatcctca
      EGR-1 TaqMan Sonde
541 ggggagccga gcaacaacc ctatgagcacctgaccacagagtcctttc tgacatcgct
601 ctgaataatg agaaggcagat ggtggagacg agttatccca gccaaacgac tgggtgcct
661 cccatcacct atactggcgg cttctcctg gagcccgcac ccaacagtgg caaacctttg
721 tggcctgaac cccctttcag cctagtcagt ggctctgtga gcatgaccaa tctcggacc
      EGR-1 Standardreihe bwd ←
781 tcttcatcct cggegccttc tccagctgcttcctccttgcctc ceagagcccg
841 ccctgagct gtccgtgcc gtccaacgac agcagtccea tctactggc tgcgccacc
901 tttctactc ccaacactga cattttct gagecccaaa gccaggcctt tctggctcg
-3061

```

Abbildung 15) mRNA Sequenz des murinen EGR-1 Gens. Eingezeichnet ist die Sonde des TaqMan Assays und die jeweiligen korrespondierenden Sequenzen der Primer der Standardreihe. Die erwartete Größe des Amplikons beträgt 452 bp.

In Abbildung 16 ist ein exemplarisches Ergebnis der qualitativen PCR zur Kontrolle der Standardreihenprimer dargestellt. Die Banden zeigten sich dabei bei der erwarteten Höhe, es zeigten sich keinerlei Doppelbanden, die Banden waren scharf begrenzt und zeigten ein deutliches Signal. Es wurden sowohl Tiere des resistenten C57Bl/6 wie permissiven Mausstamms A.BY/SnJ getestet. Dies bestätigte die hinreichende Qualität der designten Standardreihenprimer.

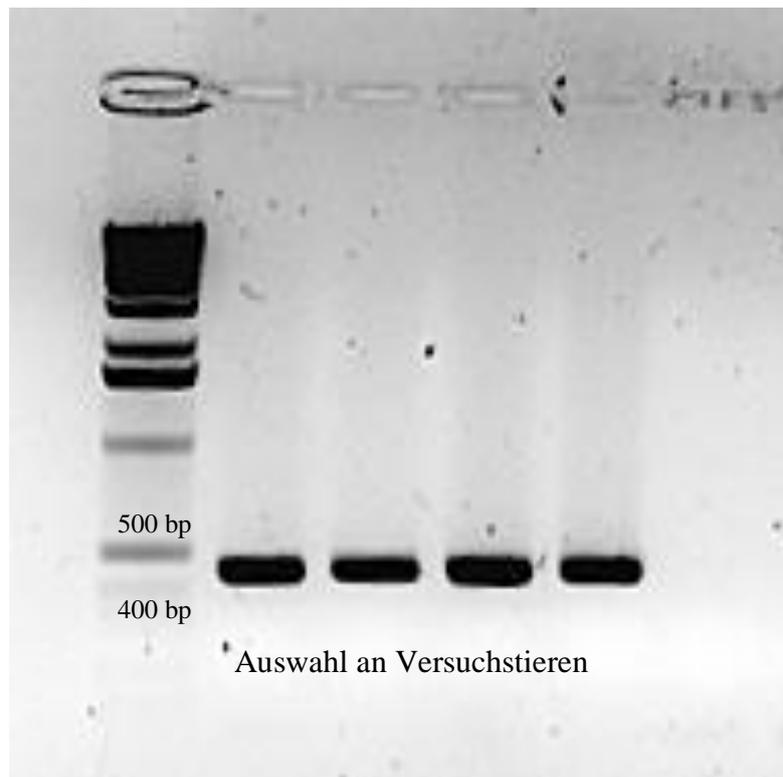


Abbildung 16) PCR Produkt der Standardreihen EGR-1 Primer. Es sind vier kardiale Proben der Versuchstiere, eine Wasserkontrolle sowie der Größenstandard abgebildet.

Die erzeugten Standardreihen besaßen einen Regressionskoeffizienten von 0,999 bzw. 0,993, die Standardkurve hatte eine Steigung von 3,56 bzw. 3,15.

4.2.1.2 Real-Time-PCR Untersuchung – Erstellung der Standardreihe und der Primer-Test für 18S

Zur Gewährleistung einer gleichmäßigen Ausgangskonzentration der cDNA der Versuchstiere erfolgte der Bezug der jeweiligen Messwerte von EGR-1 auf das Housekeeping-Gen 18S. Hierzu wurden die in Abbildung 17 gezeigten Primer, einmal für die Standardkurve, um eine Standardreihe mit bekannter cDNA Konzentration zu erzeugen und einmal für die 18S rRNA erzeugt.

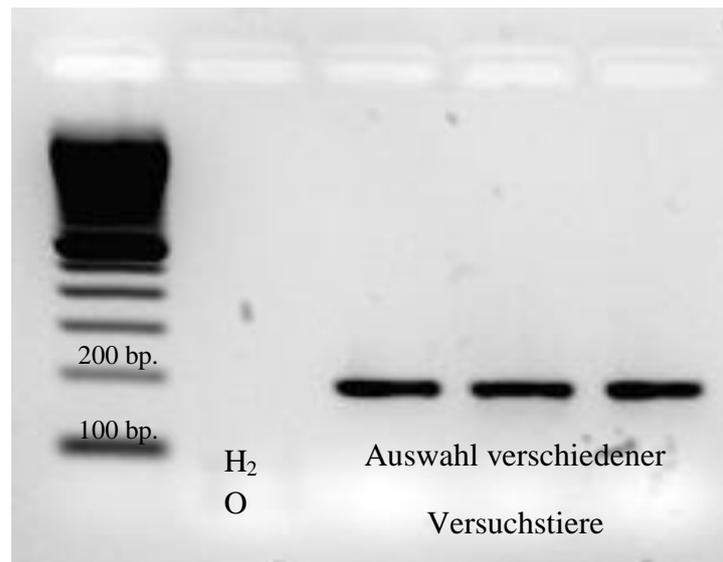


Abbildung 18) 18S PCR Produkt. *Verwendet wurden die für die Standardreihe entworfenen Primer (siehe 2.1.2). Gezeigt sind die Amplifikate aus kardialer cDNA von drei Versuchstieren, einer Wasserkontrolle sowie der Größenstandard.*

Die erzeugte Standardreihe von 18S, hatte einen Regressionskoeffizienten von 0,997 bzw. 0,998 und eine Steigung von 3,54 bzw. 3,48.

In Abbildung 19 ist das Produkt der qualitativen PCR der 18S-Primer für die SYBR Green Untersuchung dargestellt. Es zeigte sich bei Tieren beider Mausstämmen eine einzelne scharf begrenzte Bande, welche der erwarteten Größe des Amplikons von 122 bp entsprach.

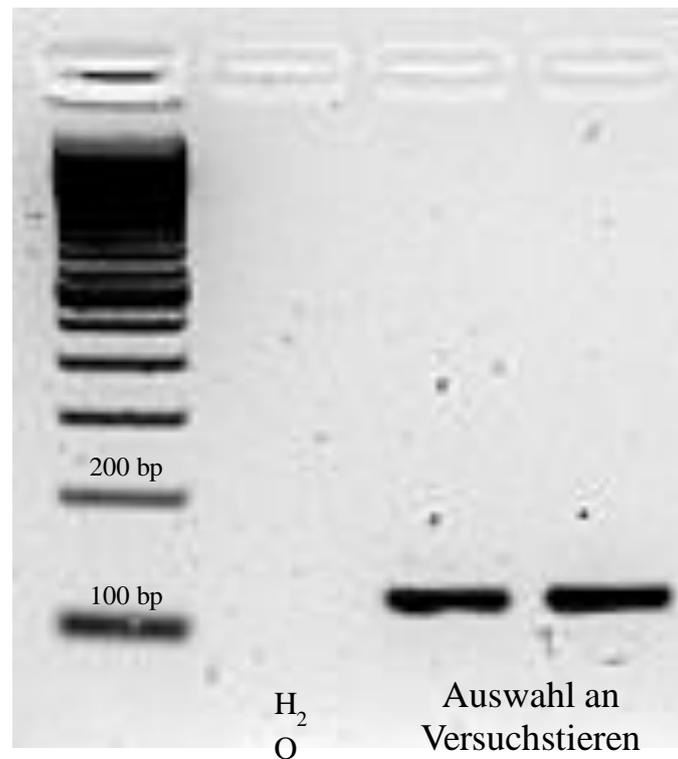


Abbildung 19) 18S PCR Primer. Gezeigt sind die 18S Amplifikate aus kardialer cDNA von zwei Versuchstieren, eine Wasserkontrolle sowie der Größenstandard.

Die Dissoziationskurven der 18S-Primer zeigten bei der SYBR Green Untersuchung einen spezifischen Schmelzpunkt bei ca. 82°C bei nur einem Maximum (siehe Abbildung 20).

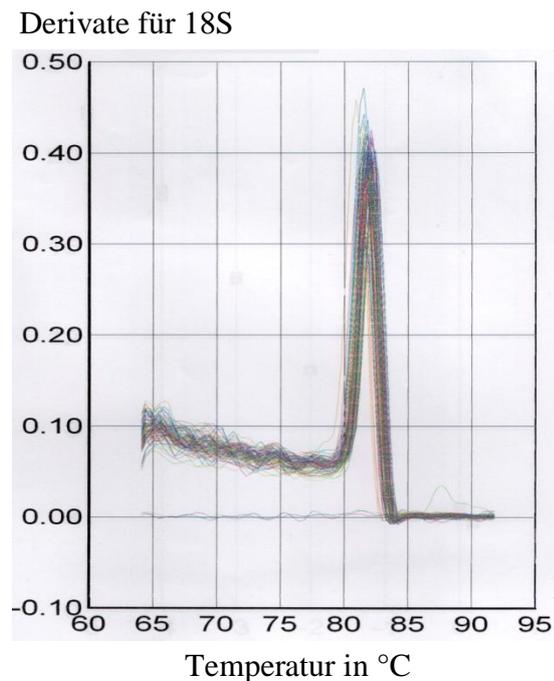


Abbildung 20) Dissoziationskurve für selektiv amplifizierte 18S cDNA. Es zeigte sich eine 18S spezifische Schmelztemperatur von 82°C.

4.2.1.3 Expression der kardialen mRNA von EGR-1 im permissiven Mausmodell A.BY/SnJ

Die absolute Expression der kardialen mRNA des EGR-1 zeigte im Verlauf der Infektion im permissiven Mausstamm A.BY/SnJ am vierten postinfektiösen Tag einen deutlichen Anstieg (4,3-facher Anstieg vom Wert der nicht infizierten Kontrollen ausgehend $p < 0,01$) (Abb.21). Dieser Anstieg ging am achten postinfektiösen Tag zwar zurück, blieb jedoch noch über den Werten der nicht infizierten Kontrolltiere erhöht (1,9-facher Anstieg vom Wert der nicht infizierten Kontrollen ausgehend $p < 0,05$). Am zwölften und 28. postinfektiösen Tag waren die Werte ebenfalls erhöht (2,8-facher bzw. 3,2-facher Anstieg vom Wert der nicht infizierten Kontrollen ausgehend, $p < 0,5$ bzw. nicht signifikant).

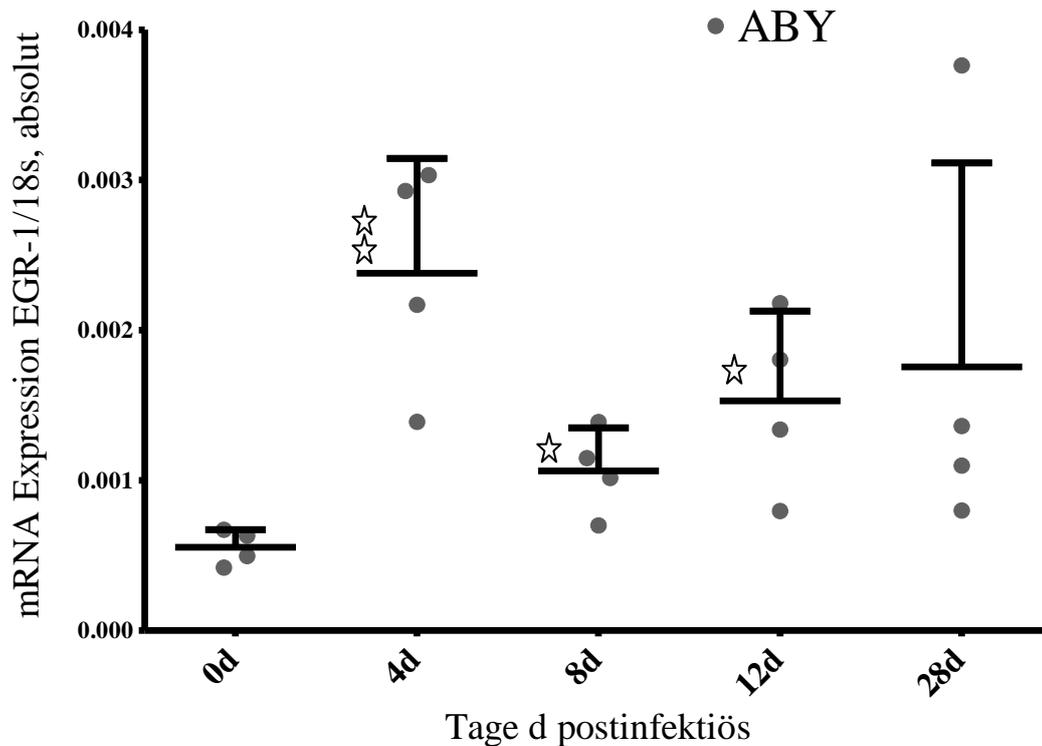


Abbildung 21) mRNA Expression von EGR-1 im Verlauf der Infektion im permissiven Mausmodell A.BY/SnJ. Die Daten werden als Einzelwerte und MW \pm SD der absoluten Expression dargestellt. Pro Zeitpunkt lagen 4 verschiedene Versuchstiere je Mausstamm vor. * = $p < 0,05$ ** = $p < 0,01$, jeweils bezogen auf den Anstieg von der jeweiligen nicht infizierten Kontrolle.

4.2.1.4 Expression der kardialen mRNA des EGR-1 im resistenten Mausmodell C57Bl/6

Im resistenten Mausstamm C57Bl/6 zeigte die Expression der kardialen mRNA des EGR-1 am vierten postinfektiösen Tag einen 3,6-fachen Anstieg ($p < 0,01$). Am achten postinfektiösen Tag ging das Expressionslevel der mRNA wieder deutlich zurück (2,2-facher Anstieg im Vergleich zu den nicht infizierten Kontrollen, $p < 0,05$), behielt am zwölften postinfektiösen Tag diesen Wert in etwa bei und erreichte bis zum 28. postinfektiösen Tag im Mittelwert jedoch noch nicht wieder den Wert der nicht infizierten Kontrollen (weiterhin 1,7-fach erhöhte Expression). Wobei sich am Tag 28 p.i. keine statistisch signifikante Abweichung von den nicht infizierten Kontrolltieren zeigte, was durch die große Streubreite der Einzelwerte verursacht erscheint. In Abbildung 22 ist der Verlauf der kardialen mRNA Expression während der Infektion in Einzelwertdarstellung gezeigt.

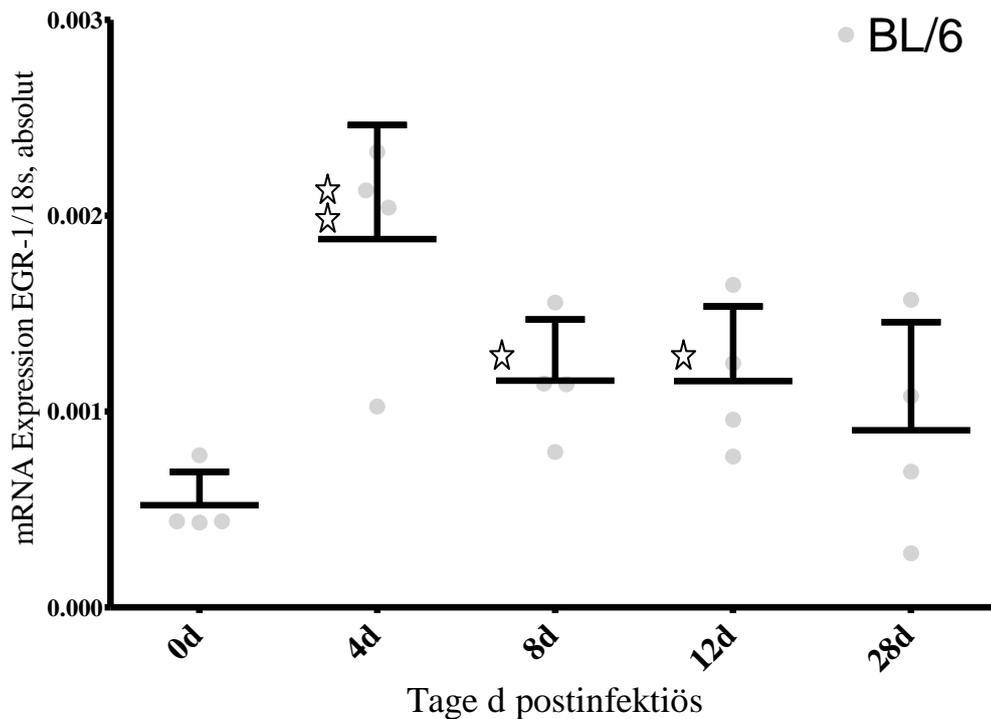


Abbildung 22) mRNA Expression von EGR-1 im Verlauf der Infektion im resistenten Mausmodell C57Bl/6. Die Daten werden als Einzelwerte und MW \pm SD der absoluten Expression dargestellt. Pro Zeitpunkt lagen 4 verschiedene Versuchstiere je Mausstamm vor. *= $p < 0,05$ **= $p < 0,01$, jeweils bezogen auf den Anstieg der jeweiligen nicht infizierten Kontrolle.

4.2.1.5 Expression der kardialen mRNA des EGR-1 im Vergleich der beiden Mausmodelle

Der Vergleich der kardialen mRNA Expression der beiden Mausmodelle zeigte in beiden Mausstämmen einen hochsignifikanten deutlichen Anstieg der Expression zum 4. postinfektiösen Tag. Im weiteren Verlauf der Infektion zeigte der Mausstamm C57Bl/6 einen Rückgang der EGR-1 Expression, während das permissive Mausmodell A.BY/SnJ im Mittelwert Hinweise auf ein erhöhtes Expressionslevel beibehält. Jedoch zeigte sich sowohl beim permissiven wie auch beim resistenten Mausmodell keine statistische Signifikanz bezüglich der Veränderung der Expression am 28. postinfektiösen Tag im Vergleich zu den nicht infizierten Kontrolltieren.

Die basale präinfektiöse kardiale mRNA Expression lag in beiden Mausmodellen auf dem gleichen Niveau (Abb. 23). Ebenso bestand zwischen den beiden Mausstämmen kein statistisch signifikanter Unterschied im Verlauf der Expression (Abb. 23).

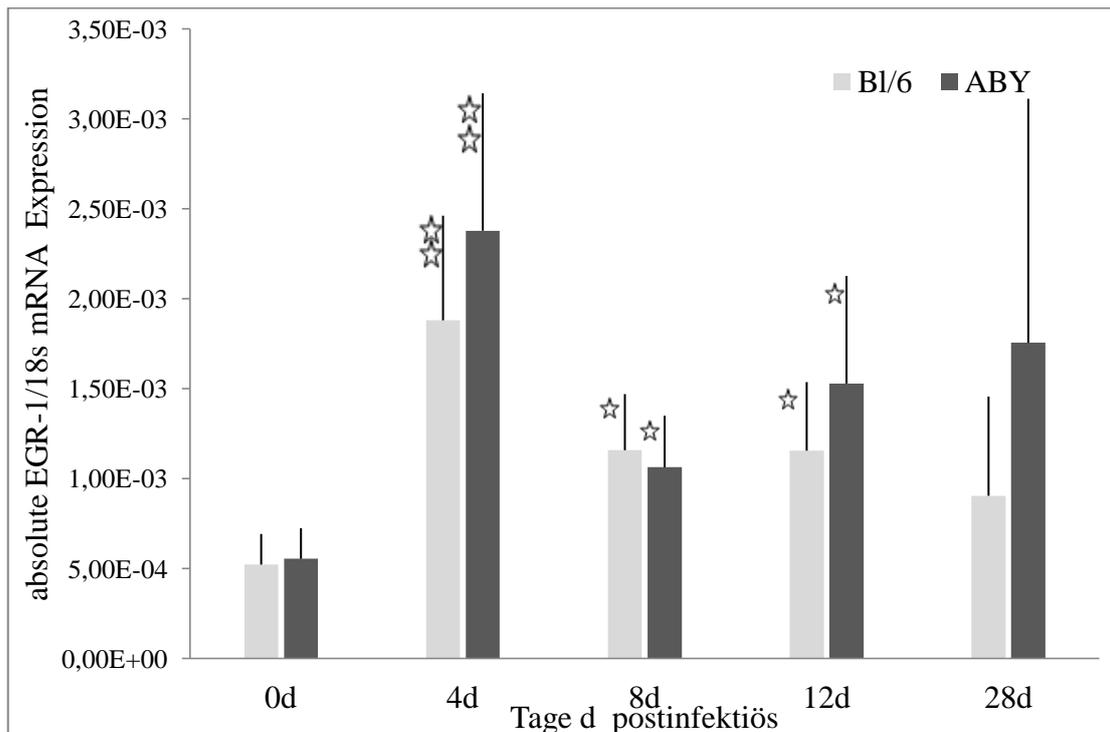


Abbildung 23) mRNA Expression von EGR-1 im Verlauf der CVB3- Infektion bei A.BY/SnJ und C57Bl/6 Mäusen. Die Daten werden als $MW \pm SD$ der absoluten Expression dargestellt. Pro Zeitpunkt lagen 4 verschiedene Versuchstiere je Mausstamm vor. * = $p < 0,05$ ** = $p < 0,01$, jeweils bezogen auf den Anstieg von der jeweiligen nicht infizierten Kontrolle.

5 Diskussion

5.1 Übersicht

Die durchgeführten Versuche konnten postinfektiös prinzipiell eine Veränderung der EGR-1 Expression sowohl auf mRNA-Ebene wie auch auf Proteinebene, sowie eine Veränderung der Expression des ERK-2/p42 auf Proteinebene zeigen.

Wobei sich Abweichungen des Expressionsverhalten zwischen dem resistenten C57Bl/6 und permissiven A.BY/SnJ Mausstamm darstellen ließen. Dies bringt die Vermutung mit sich, dass EGR-1 bzw. ERK-1/2 möglicherweise einen Einfluss auf den Verlauf der Infektion bzw. der Entzündungsreaktion haben könnten und die Anfälligkeit für die Viruspersistenz erhöhen könnten.

Erkenntnisse, welche Hinweise liefern könnten weshalb sich der Mausstamm C57Bl/6 als deutlich widerstandsfähiger als der Mausstamm A.BY/SnJ zeigt und postinfektiös keine Viruspersistenz bzw. im Endeffekt keine dilatative Kardiomyopathie ausbildet (6, 8, 9), lassen sich daher möglicherweise aus dem unterschiedlichen Expressionsmuster der beiden Mausstämme ableiten. Grundlegend lassen sich jedoch die gesteigerten Expressionslevel mit dem sich entwickelnden Inflammationsprozess in Übereinstimmung bringen. Diese Punkte entsprechen den bereits dargestellten Vermutungen, dass die postinfektiöse Expressionsveränderung der frühen Transkriptionsfaktoren einen Einfluss auf die spätere Ausprägung der infektiösen Myokarditis bzw. der infektiösen DCM (34) hat.

Unabhängig des untersuchten Mausmodells ließ sich im Verlauf der Infektion eine Zunahme der Expression des EGR-1 auf Protein- und mRNA-Ebene darstellen. Während sich im resistenten Mausmodell C57Bl/6 ein signifikanter Rückgang der Expression mit dem Ausheilen der Myokarditis zeigte, konnte auf Proteinebene ein signifikanter Unterschied zwischen dem Proteinexpressionslevel im resistenten und permissiven Mausstamm, in Form einer erhöhten Proteinexpression im permissiven Mausmodell A.BY/SnJ gezeigt werden.

Die Proteinexpressionsdaten des ERK-Signalwegs zeigten ebenfalls in beiden Mausmodellen eine signifikante Zunahme der Proteinexpression im Verlauf der Infektion. Zudem konnte auch hier auf Proteinebene eine, mit der Chronifizierung der Myokarditis einhergehende, anhaltend erhöhte Proteinexpression im permissiven Mausmodell A.BY/SnJ gezeigt werden. Der resistente Mausstamm C57Bl/6 zeigte bei den Proteinexpressionsdaten des ERK-Signalwegs mit dem Ausheilen der Myokarditis einen deutlichen Rückgang der Proteinexpression, hier zeigte sich zudem im Vergleich zum permissiven Mausstamm A.BY/SnJ am Tag 28 p.i. eine statistisch

signifikante deutlich geringere Proteinexpression. Bereits in verschiedenen weiteren Arbeiten konnte in vivo wie in vitro eine Aktivierung des ERK-Signalwegs nach der Infektion mit dem CVB3 gezeigt werden (44, 45, 57). Dies konnte mit den Proteinexpressionsdaten in der vorliegenden Arbeit für die untersuchten Mausmodelle ebenfalls dargestellt werden, ebenso wurde ERK-1/2 bereits in unterschiedlichen Modellen als Expressionsmodulator des EGR-1 beschrieben (58).

5.2 Proteinexpression von ERK-1/2 (p42/44)

5.2.1 Proteinexpression von ERK-1/2 (p42/44)

Es konnte bereits in vorhergehenden Arbeiten gezeigt werden, dass das MAP-Kinase System sowie ERK-1/2 im Rahmen der Infektion mit dem CVB3 entscheidende Faktoren der Regulation der Virus Replikation und der viralen Genexpression zu sein scheinen (45). So konnte gezeigt werden, dass in Human (HeLa)- und in Zelllinien des Hamsters (CHO) eine Korrelation zwischen der Aktivierung der ERK-1/2 Kinasen und der Virusreplikation besteht, zudem zeigte sich eine signifikante Reduktion der Aktivierung der ERK-1/2 Kinasen, wenn den Zelllinien der CAR fehlte (34).

Eine Aktivierung der ERK-Kinasen konnte ebenfalls in den vorhergehenden Arbeiten gezeigt werden, zudem zeigen sich vermehrt Hinweise, dass das Ausmaß der Aktivierung der Signalkaskade des ERK-1/2 ein potentieller Hinweis auf die Schwere und Ausprägung der sich entwickelnden Myokarditis sein kann (45, 34).

Wobei in den genannten Arbeiten einmal von einer durch die Virusinfektion selbst induzierten selbst-verstärkenden Stimulation der Reproduktion des Virus mittels des MAP-Kinase System ausgegangen wird und zum Anderen eine Beeinflussung der generellen Proteinbiosynthese der Wirtszelle selbst beschrieben wird (45).

In der Frühphase der Infektion konnte eine zweizeitige Aktivierung bzw. Phosphorylierung postinfektiös gezeigt werden. Einmal zeigte sich in infizierten CHO und HeLa Zellen eine frühe verstärkte Phosphorylierung ca. 30 Minuten nach der Infektion und zudem eine verstärkte Aktivierung ca. acht Stunden nach der Infektion, wobei die frühe Aktivierung auf die Virus-Migration in die Zell zurückgeführt wird und die später einsetzende auf die beginnende verstärkte Replikation des Virus (45).

Die verstärkte Expression des ERK-1/2 Systems postinfektiös deckte sich mit den Resultaten der hier durchgeführten Versuche. Wobei in den hier gezeigten Versuchen zudem ein signifikanter Unterschied in der Expression von ERK-2 Protein im weiteren Verlauf der Infektion gezeigt werden konnte. Verglichen mit den oben angeführten Arbeiten lagen die jeweiligen Zeitpunkte an denen die Versuchstiere in den hier gezeigten Versuchen getötet worden waren deutlich länger auseinander und orientierten sich vor allem an dem klinischen Verlauf der Infektion bzw. der (chronischen) Myokarditis. So sollte der Zusammenhang mit dem klinischen Bild und der mikroskopisch sichtbaren Inflammation besser untersucht werden. Jedoch lässt sich aufgrund des gewählten längeren Abstandes von Infektionszeitpunkt und den Untersuchungszeitpunkten nicht ausschließen, ob die ermittelten Expressionsänderungen nicht auch durch morphologische und mechanische Veränderung im Rahmen der Myokarditis beeinflusst wurden.

Die persistierende Inflammation mit Viruspersistenz beim permissiven Mausstamm A.BY/SnJ, welche sich auch noch am 28. postinfektiösem Tag nachweisen ließ (22, 59), zeigte so auch ein anhaltend 2-fach erhöhtes relatives Expressionslevel von ERK-2, was daher möglicherweise ebenfalls als Ausdruck der chronischen Inflammation wie der andauernden Virusreplikation gesehen werden kann. Die gezeigte Zunahme der Expression der ERK-1/2 Proteine im permissiven Mausmodell A.BY/SnJ war ab dem vierten postinfektiösen Tag signifikant und blieb anhaltend bis zum 28. postinfektiösem Tag bestehen.

Aufgrund der gewählten Methode der Proteinbestimmung mittels maximal semiquantitativen Western Blot, beschränkte sich die Aussage der unterschiedlichen Proteinexpression zwischen den beiden gewählten Mausstämmen jedoch auf die relative Proteinexpression im Vergleich zum jeweiligen relativen Basalwert nicht infizierter Kontrolltiere. Ein absoluter Vergleich der Proteinexpression mittels Western Blot methodisch bedingt schwierig und wurde auf Grund der eingeschränkten Aussagekraft nicht berücksichtigt (siehe 5.2.4).

Trotz dieses fehlenden Vergleichs der absoluten Proteinexpression zeigte sich im Vergleich der relativen Proteinexpression im resistenten Mausmodell C57Bl/6 ebenfalls ein signifikanter Expressionsanstieg zum Beginn der Infektion am achten postinfektiösen Tag. Dieser Expressionsanstieg verlief jedoch nicht progredient/ persistierend wie im permissiven Mausstamm A.BY/SnJ, sondern zeigte sich rasch mit dem klinischen Bild der ausheilenden Myokarditis übereinstimmend und fiel daher am Ende des Beobachtungszeitraum nach der Abheilung der akuten Myokarditis wieder auf den Ausgangswert nicht infizierter Kontrolltiere zurück.

Hier zeigte sich dann auch ein signifikanter Unterschied der relativen Proteinexpression der beiden Mausstämme zum Ende des Beobachtungszeitraums. Die permissiven Versuchstiere des Mausstamms A.BY/SnJ zeigten entsprechend des klinischen Verlaufs der Myokarditis eine anhaltend hohe Expression von ERK-(1/2), wohingegen die resistenten C57Bl/6 Versuchstiere eine nach der akuten Infektion regredierende Expression zeigten. Auch diese Punkte scheinen in Einklang mit den oben genannten Arbeiten zu stehen, da auch hier die Vermutung der reduzierten Expression aufgrund der erfolgten Viruselimination sowie der abgeheilten Inflammation naheliegt.

Rückschlüsse auf die spezifische Rolle des MAP-Kinase Systems bzw. der ERK-1/2 Proteine lassen sich jedoch natürlich aufgrund dieser Datenlage nicht treffen, ein Zusammenhang mit dem Inflammationsprozess scheint jedoch naheliegend. Die bereits durch verschiedene andere Arbeiten gezeigte bzw. vermutete aktivierende Rolle des MAP-Kinase Wegs in der Aktivierung der Expression von EGR-1 macht jedoch deutlich, dass die hier gezeigte Aktivierung und die gesteigerte Proteinsynthese von ERK-(1/2) einen weiteren Hinweis für die vermutete Zunahme der Expression von EGR-1 darstellen (60, 61).

Bemerkenswert ist jedoch die Tatsache, dass sich in den hier gezeigten Versuchen die Konzentration der ERK-(1/2) Proteine scheinbar änderte, während die vorhergehenden Arbeiten zumeist nur einen Anstieg der phosphorylierten aktiven ERK-(1/2) Proteine nachweisen konnten. Wobei die Phosphorylierung des Proteins aus der nicht-phosphorylierten Form rasch stattfinden kann und lediglich mit kurzer Halbwertszeit biologisch aktiv ist, so dass die persistierende erhöhte Expression der nicht phosphorylierten Form ebenfalls für eine erhöhte biologische Aktivität des ERK-(1/2) sprechen sollte.

Die Zunahme der Expression von ERK-(1/2) lag etwa im Bereich einer maximalen Verdreifachung des Wertes nicht infizierter Kontrolltiere, was in einem Bereich liegt, der mit dem semiquantitativen Verfahren des Western Blots gut erfasst werden kann, jedoch nicht unbedingt einen Rückschluss auf die biologische Wirksamkeit oder Relevanz erlaubt.

Die Proteinexpression von ERK-2 ist im Vergleich zum ERK-1 konstant signifikant erhöht, wobei die jeweilige Induktion der Proteinexpression gleich erschien. Dieses Phänomen fiel auch bei weiteren Western Blot Versuchen anderer Arbeiten auf (34, 45), wobei jedoch die biologische Bedeutung der absolut betrachtet geringeren Proteinexpression von ERK-1 bislang nicht geklärt erscheint.

5.2.2 Proteinexpression des phosphorylierten ERK-1/2 (p-p42/44)

Die Phosphorylierung von ERK-1/2 stellt einen der entscheidenden Schritte zur posttranslationalen Aktivierung in die biologisch aktive Form der ERK dar. Diese Phosphorylierung aus den nicht phosphorylierten Unterformen kann innerhalb kurzer Zeit als Reaktion auf einen spezifischen Stimulus stattfinden (34).

In den in dieser Arbeit gezeigten Versuchen ließ sich jedoch kein sinnvoller Zusammenhang der Expression des pERK-1/2 der jeweiligen Versuchstiere darstellen. Bereits bei den nicht infizierten Tieren ließ sich teilweise eine deutlich erhöhte Signalintensität feststellen. Auch bei den Versuchstieren, die im Verlauf der Infektion untersucht worden waren, zeigte sich ein sehr unterschiedliches wechselndes Expressionsmuster.

Dies brachte die Vermutung mit sich, dass es sich bei den zunehmenden Signalintensitäten möglicherweise um ein erhöhtes Expressionsmuster des pERK-1/2 handelt, welches nicht primär auf den Zusammenhang mit der viralen Infektion zurückzuführen ist, worauf vor allem eine deutliche Phosphorylierung nicht infizierter Tiere hindeutet. So scheint ein Zusammenhang mit kurzfristigen Gegebenheiten z.B. im Rahmen der Tötung der Tiere (Stressreize etc.) denkbar, welche zu einer raschen Phosphorylierung der ERK-1/2 Proteine führten. Dies würde auch die deutliche Heterogenität der Expression der verschiedenen Versuchstiere beider Mausstämme wie sämtlicher postinfektiöser Zeitpunkte erklären.

Daher erscheint eine Auswertung der Daten der phosphorylierten ERK Proteine aufgrund starker Störeffekte, als nicht valide für die Beantwortung der Frage nach einer differenziellen Phosphorylierung von ERK-1/2 im Verlauf der Infektion mit dem CVB3 in den hier untersuchten resistenten C57Bl/6 bzw. permissiven A.BY/SnJ Mausstämmen.

5.3 Das Expressionslevel des EGR-1 Transkriptionsfaktors im Verlauf der Virusinfektion

5.3.1 Grundlegende Stimuli der Expression und mögliche weitere Funktionen und Aufgaben des EGR-1

Das EGR-1 vermag als "immediate Early Transkriptionsfaktor" besonders rasch auf einen spezifischen Reiz hin die Transkription zu beginnen, wobei nicht unbedingt eine gesteigerte *de-novo* Proteinbiosynthese hiermit einhergehen muss (62). Für EGR-1 ist eine ungewöhnlich umfangreiche Liste an möglichen Stimuli bekannt, welche für eine verstärkte Expression sorgen können. So wird die EGR-1 Expression durch Hitze, UV Licht, ionisierende Strahlung und H₂O₂

induziert (58). Zudem sind eine Vielzahl an Prozessen bekannt, an denen EGR-1 beteiligt ist u.a. im Bereich der Immuntoleranz (63), der Schmerzverarbeitung im Hippokampus, im Bereich der Langzeitgedächtnisentwicklung (64), mechanischer Verletzungen (65), im Bereich des kardialen Remodelings und zudem scheint EGR-1 eine Reihe von Genen zu modulieren, welche im Bereich der Entstehung der Arteriosklerose eine Rolle spielen (58).

Verschiedene Punkte machen einen Einfluss von EGR-1 im Rahmen der infektiösen Kardiomyopathie wahrscheinlich bzw. liefern Hinweise hierzu. Einmal wurde, wie bereits erwähnt, ein Zusammenhang zwischen der verstärkten Expression und Synthese von ERK-1/2 im Rahmen der Infektion und dem Aufrechterhalten des inflammatorischen Prozesses vermutet, zudem zeigt sich ein möglicher Zusammenhang zwischen dem vermutlich im Rahmen der Infektion ebenfalls stimulierten Endothelinsystems und EGR-1. Bei den zudem weitreichenden weiteren Funktionen und Beteiligungen an verschiedenen unterschiedlichen Prozessen, scheint die Betrachtung der Expression von EGR-1 im Verlauf der Infektion sinnvoll.

EGR-1 zählt zu der Gruppe der immediate early Transkriptionsfaktoren, weshalb nicht nur mit einer gesteigerten Expression von EGR-1 auf mRNA-Ebene zu rechnen ist, sondern auch die genaue Betrachtung der Proteinbiosynthese sinnvoll erscheint, da hier möglicherweise eine *de novo* Synthese zu erwarten ist bzw. diese nicht stattfinden könnte.

5.3.2 Das Expressionslevel des Early Growth Response-1 Transkriptionsfaktors auf mRNA-Ebene

Die Expression von EGR-1 auf mRNA-Ebene zeigte im Verlauf der Infektion eine, jeweils bei beiden Mausstämmen auftretende, statistisch signifikante Zunahme. Diese moderate Zunahme (ca. 4-fach) der Expression zeigte sich in beiden Mausstämmen.

Dieses grundlegende Ergebnis deckt sich mit den bereits angestellten Vermutungen, dass das EGR-1 womöglich über die MAP-Kinase Signalkaskade und das oben gezeigte ERK-1/2 stimuliert und zu Beginn der Infektion vermehrt transkribiert wird.

Aufgrund der gewählten Methode ließ sich hierfür auch ein Vergleich der absoluten mRNA Menge heranziehen. Hierbei zeigte sich auch in der akuten Phase der Infektion kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Mausstämmen. Am Tag 4 p.i. zeigte sich in beiden Stämmen ein ca. vier-facher Anstieg der Expression verglichen mit dem Wert nichtinfizierter Kontrolltiere.

Die Ergebnisse können den vermuteten Verlauf der weiteren Expression im Fortschreiten der Entzündungsreaktion teilweise bestätigen. Die Vermutung, dass die weiterhin bestehende Inflammation im permissiven Mausstamm A.BY/SnJ mit bestehender Viruspersistenz und klinischer Entzündungsreaktion zu einer anhaltenden erhöhten Expression führt konnte in der Tendenz gezeigt werden. Allerdings fehlte hierfür eine andauernde statistische Signifikanz, so dass zum Ende des Beobachtungszeitraums am 28. postinfektiösen Tag im Mittel eine weiterhin erhöhte Expression gezeigt werden konnte, die statistische Signifikanz aufgrund der hohen SD jedoch nicht bestand.

Die statistische Qualität wird hierbei aufgrund der geringen Anzahl an Versuchstieren zu den jeweiligen Zeitpunkten (n=4) durch starke Streuung eingeschränkt. Die Tendenz und der jeweilige Mittelwert über den Verlauf der Infektion zeigten jedoch eine andauernd über den Wert der nicht infizierten Kontrolliere erhöhte Konzentration an EGR-1 mRNA im permissiven Mausstamm A.BY/SnJ.

Der besonders im Interesse stehende Vergleich zwischen den beiden untersuchten Mausmodellen/ Mausstämmen zeigte auf der mRNA-Ebene jedoch keinen signifikanten Unterschied. Mit dem Abklingen und Ausheilen der Infektion im resistenten Mausstamm C57Bl/6 zeigte sich am 28. p.i. Tag, im Vergleich zu den nicht infizierten Kontrolltieren, keine signifikant erhöhte Expression mehr. Jedoch konnte am Ende des Beobachtungszeitraums mit statistischer Signifikanz kein Unterschied zwischen den beiden Mausmodellen ausgemacht werden. Betrachtet man jedoch die Mittelwerte und die Tendenz, dann lässt sich eine deutliche Reduktion der jeweiligen Expressionsraten zu den untersuchten postinfektiösen Tagen mit dem Abklingen der akuten Infektion im resistenten Modell darstellen.

Verschiedene Arbeiten konnten in der letzten Zeit zeigen, dass zwei unterschiedliche Formen der EGR-1 mRNA auftreten. Die eine wird als kurze Form bezeichnet, short variant (sv), die andere wird, da sie ca. 293 Basenpaare länger ist, als long variant (lv) bezeichnet. Die längere Variante weist durch Polyadenylierung einen verlängerten Poly-A Schwanz auf, dieser, so wird vermutet, verleiht eine längere Halbwertszeit. Eine unterschiedliche Funktion in der Proteinbiosynthese konnte bislang nicht nachgewiesen werden, da sich die beiden mRNA Stränge lediglich in der nicht-transkribierenden Region am 3'Ende unterscheiden. Die längere Variante konnte in den Zellen der Retina und im ZNS nachgewiesen werden (46).

Die hier verwendeten Primer sind sowohl für die kurze wie lange Version geeignet, eine Unterscheidung der beiden Formen ist jedoch nicht möglich.

Ob für die hier bearbeitete Fragestellung eine Unterscheidung sinnvoll sein könnte ist fraglich, da bislang ein Nachweis fehlt, dass diese unterschiedlichen mRNA Versionen auch kardial auftreten.

5.3.3 Das Expressionslevel des Early Growth Response-1 Transkriptionsfaktors auf Protein-Ebene

Alleine anhand der Expressionsdaten der mRNA des EGR-1 lässt sich nicht unbedingt auch ein Rückschluss auf die Expression des EGR-1 auf Proteinebene ziehen, auch ist es nicht unbedingt nötig, dass nach Stimulation durch einen bestimmten Reiz eine gesteigerte *de-novo* Proteinbiosynthese stattfindet.

Unter Betrachtung der Ergebnisse des Western Blots ließ sich, ähnlich den Messwerten auf mRNA-Ebene, ebenfalls eine verstärkte Expression im Verlauf der Infektion darstellen.

Es zeigte sich jedoch lediglich am vierten postinfektiösen Tag im resistenten Mausmodell C57Bl/6 ein statistisch hochsignifikanter ca. 2-facher Anstieg der Proteinexpression. Das permissive Mausmodell A.BY/SnJ zeigte eine flach ansteigende, eher konstant erhöhte Tendenz der Proteinexpression im Mittel (zwischen dem 4.-28. p.i. Tag), eine statistische Signifikanz wurde jedoch nicht erreicht.

Während der resistente Mausstamm C57Bl/6 mit dem Abklingen der klinischen Inflammation (ab ca. dem zwölften p.i. Tag) eine signifikante Abnahme der Expression zeigte, konnte für den permissiven Mausstamm A.BY/SnJ eine tendenziell stetig leicht erhöhte Proteinexpression gezeigt werden, wobei sich im Vergleich zum resistenten Mausstamm C57/Bl6 eine signifikant höhere Proteinexpression am 28. p.i. Tag zeigte.

Diese Expressionswerte sprechen im resistenten Mausmodell C57Bl/6 für einen Zusammenhang mit der akuten Inflammation nach Infektion mit dem CVB3. So zeigte sich nach dem Rückgang der akuten Entzündungsreaktion ebenfalls ein Rückgang der Proteinexpression, welche mit dem Ausheilen der Myokarditis sogar wieder den Wert nicht infizierter Kontrolltiere erreichte bzw. sogar leicht unterschritt.

Im permissiven Mausmodell A.BY/SnJ konnte im Vergleich zum Basalwert keine statistisch signifikante Abweichung nachgewiesen werden. Im Mittel zeigte sich im Verlauf der Infektion, bezogen auf die nicht infizierten Kontrollwerte tendenziell eine erhöhte Proteinexpression,

welche sich bis zum 28. postinfektiösen Tag ansteigend zeigte, wobei sich zum 28. postinfektiösen Tag ein signifikanter Unterschied zu dem resistenten Mausmodell nachweisen ließ.

Diese Expressionsänderungen würden auch für einen Zusammenhang mit der chronifizierten Entzündungsreaktion sprechen, wobei auch ein leichter Rückgang nach einem initialen Maximum um den vierten p.i. Tag denkbar wäre, da auch im permissiven Mausmodell A.BY/SnJ nach der akuten Infektion ein Rückgang der nachgewiesenen Viruskonzentration aufgetreten war (6).

Setzt man den klinischen, molekularbiologischen und histopathologischen Verlauf der inflammatorischen Kardiomyopathie (6, 66) in Bezug zu den Expressionsdaten von EGR-1 lässt sich annehmen, dass die einsetzende Entzündungsreaktion nach der Infektion mit dem CVB3 mit einer erhöhten Expression von EGR-1 einhergeht. Wobei sich im resistenten Mausmodell C57Bl/6 am Tag 4 p.i. eine Zunahme der Expression auf mRNA- und Proteinebene zeigte, eine zeitliche Differenz zwischen der mRNA-Ebene und Proteinebene zeigte sich nicht.

Die histopathologischen Veränderungen setzten hingegen erst am achten p.i. Tag ein (66). Hier zeigte sich bereits ein Rückgang der Expression von EGR-1 auf Protein- und mRNA-Ebene. Hier lässt sich also eher von einer Funktion von EGR-1 im Rahmen der akuten Inflammation und Infektion ausgehen, da mit zunehmender Elimination des Viruspartikels auch ein Rückgang der Protein- wie mRNA-Expression auftrat (ab Tag 8 p.i.). Im resistenten Mausmodell C57Bl/6 zeigte sich mit dem Ausheilen, der Elimination des Viruspartikels und dem histopathologischen Abklingen der Entzündungsreaktion ein Rückgang der Expression des EGR-1, sowohl auf Protein- wie auch auf mRNA-Ebene.

Das permissive Mausmodell A.BY/SnJ zeigte auf der mRNA-Ebene einen vergleichbaren raschen Anstieg der Expression des EGR-1 ebenfalls bereits am Tag 4 p.i., die Proteinexpression zeigte hingegen lediglich eine leichte Tendenz einer ansteigenden Expression, welche bis zum Tag 28 p.i. anhielt und hier einen signifikanten Expressionsunterschied im Vergleich zum resistenten Mausmodell C57Bl/6 zeigte. Dies entsprach der chronischen Viruspersistenz, der prolongierten Entzündungsreaktion wie den anhaltenden histopathologischen Veränderungen im permissiven Mausmodell A.BY/SnJ. Wobei bemerkenswert ist, dass sich im permissiven Mausmodell A.BY/SnJ am vierten postinfektiösen Tag eine ca. 4-fache Steigerung der Expression auf mRNA-Ebene zeigte, wohingegen auf Proteinebene kein signifikanter Anstieg der Proteinexpression darstellbar gewesen war. Ob es hierbei um ein technisches Problem oder

um eine tatsächlich nur auf die mRNA-Ebene beschränkte signifikante Expressionszunahme handelte, lässt sich nicht mit Sicherheit sagen. Nichtsdestotrotz wäre auch eine auf die mRNA beschränkte Expressionssteigerung denkbar, wobei sich hierfür kein Beleg in der Literatur ausmachen lässt.

Die hier geschilderten Werte der Proteinexpression beruhen auf dem relativen Vergleich der Expression in Bezug auf einen jeweiligen relativen Basalwert. Dieser Basalwert entsprach einer Probe eines nicht infizierten Kontrolltieres, welche jeweils auf jeder Nitrozellulosemembran vorhanden waren und so einen relativen Vergleich der Proteinexpression im Vergleich zu nicht infizierten Versuchstieren erlaubten. Dies schloss technische Fehler und Schwierigkeiten aus, da jeder dieser Vergleiche der Proteinexpression jeweils nur auf einer Nitrozellulosemembran stattfand.

Um jedoch den interessanten Punkt zu beantworten, ob es möglicherweise einen Unterschied in der Expression der nicht infizierten Kontrolltiere der jeweiligen Mausstämme des EGR-1 Proteins gab, wurde ein Vergleich anhand der mitgeführten Positivkontrollen angestellt. Hier zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied in der basalen Expression. Eine erhöhte basale Expression hätte z.B. im resistenten Mausmodell C57Bl/6 auf eine mögliche protektive Funktion des EGR-1 im Rahmen der inflammatorischen Kardiomyopathie hinweisen können.

5.3.4 Auswertung der absoluten Proteinexpression

Der Vergleich der absoluten Expression ist hier, aufgrund der methodischen Ungenauigkeit im Rahmen des semiquantitativen Western Blot bei einem Vergleich der Proteinexpressionsänderung zwischen zwei Nitrozellulosemembranen nicht dargestellt worden. Der Versuch einen Vergleich der absoluten Expression, d.h. einen Vergleich der Proteinexpressionsänderung zwischen mehreren Versuchstieren auf verschiedenen Nitrozellulosemembranen anzustellen, wurde bei nicht validen Messwerten nicht weitergeführt. Es wurde daher versucht, mittels eines technischen Standards als Korrekturwert auf den jeweiligen Nitrozellulosemembranen einen absoluten Vergleich anzustellen. Es zeigte sich jedoch, dass der jeweilige technische Standard einmal, trotz identischer Proteinprobe zu Messwerten führte, die sich in mehreren Zehnerpotenzen unterschieden und zudem bereits minimale Abweichungen der Signalbanden des technischen Standards, z.B. im Rahmen einer nicht vollständig inkubierten Chemoluminiszenzlösung o.ä. Messwerte verfälschten, die die

Messunterschiede im Rahmen der hier gezeigten Relevanz vollständig überdeckten und daher keine validen Ergebnisse erbrachten.

Daher beziehen sich alle Messergebnisse zur Proteinexpression auf den relativen Verlauf der Proteinexpression, verglichen zwischen Versuchstieren zu jeweils allen postinfektiösen Zeitpunkten auf einer einzelnen Nitrozellulosemembran. Hierbei wurden die jeweiligen nicht infizierten Kontrolltiere auf jeder einzelnen Nitrozellulosemembran als Ausgangswert, willkürlich als 1 bzw. 100% angenommen, herangezogen und innerhalb der einzelnen Nitrozellulosemembran mit den weiteren Signalbanden der infizierten Versuchstiere verglichen.

Lediglich der Vergleich zwischen den einzelnen nicht infizierten Kontrolltieren wurde, mittels absoluter Expressionsmessung dargestellt. Jedoch zeigte sich auch hier eine sehr große SD, was auch die Frage der technische Validität der Messung aufwirft.

5.3.5 Das Early Growth Response-1 Protein

Wie bereits im Ergebnisteil dargestellt, zeigten sich im Western Blot zusätzlich zu den erwarteten Signalbanden weitere Signale, die bereits in verschiedenen anderen Arbeiten beschrieben worden waren.

Einmal zeigte sich in dem erwarteten Bereich um 80 kDa teilweise eine Doppelbande, welche bereits durch (47) beschrieben worden war. Es konnte gezeigt werden, dass diese nach der Behandlung mit Alkalischer-Phosphatase verschwand, also von einer post-translationalen Phosphorylierung des EGR-1 ausgegangen werden konnte.

Day berichtete auch bereits von der ca. 50 kDa schweren Variante des EGR-1, welche durch Zellfraktionierungsversuche dem Zytoplasma zugeordnet werden konnte. Ob es sich bei diesem Protein jedoch um eine Vorstufe oder möglicherweise um ein Abbauprodukt handelte, konnte bislang noch nicht beantwortet werden. Jedoch zeigte sich, dass die Variante um 50 kDa ausschließlich im Zytoplasma, die um 80 kDa schwere Variante ausschließlich im Zellkern nachgewiesen werden konnte. Eine voneinander abhängige Induktion oder Veränderung der Expression konnte nicht nachgewiesen werden (47).

C. Matheny et al. konnten jedoch zeigen, dass sowohl die zytoplasmatische wie die nukleäre Variante die Kernlokalisations-Sequenz (NLS) tragen. Dies macht es umso erstaunlicher, dass eine zytoplasmatische wie nukleäre Variante eines Transkriptionsfaktors zu existieren scheint.

Die zytoplasmatische wie nukleäre Expression des EGR-1 konnte von weiteren Arbeitsgruppen gezeigt werden (67, 49).

Der zytoplasmatischen Variante konnte bislang jedoch noch keine genauere Charakterisierung zugewiesen werden, jedoch scheint eine Möglichkeit zu sein, dass es sich um eine vorbestehende Vorstufe handelt, so dass es der Zelle schneller möglich wäre auf einen spezifischen Reiz zu reagieren und durch eine posttranslationale Modifikation ein funktionierendes EGR-1 Protein zu generieren, ohne die *de-novo*-Synthese abwarten zu müssen.

5.4 Mögliche Induktion des EGR-1 durch den MAP-Kinase Signalweg und die mögliche Funktion des EGR-1 im Rahmen der infektiösen Myokarditis

Die vorliegenden Versuche zeigten eine im Rahmen des akuten Infektionsprozesses durch CVB3 auftretende Steigerung der Expression des EGR-1 wie von ERK-1/2.

Der aus der Literatur bereits bekannte Zusammenhang der Aktivierung bzw. der Induktion des EGR-1 durch den MAP-Kinase Signalweg und damit durch ERK-1/2 lässt sich anhand dieser Versuche nachvollziehen (6). Hierbei kann von einer Aktivierung der EGR-1 Expression mittels aktiviertem ERK-1/2 ausgegangen werden, welches nach erfolgter Phosphorylierung in den Zellkern transloziert wird und die Bildung eines Komplexes aus dem Transkriptionsfaktor SRF und ELK-1 induziert, welcher an den Promotor des EGR-1 bindet und die Expression des EGR-1 stimuliert (68). Auch der aus Zellkulturen und teilweise auch aus murinen Modellen vermutete Expressionsanstieg von ERK-1/2 nach Infektion mit CVB3 konnte in den vorliegenden Versuchen gezeigt werden.

Daher erscheint die Annahme, dass EGR-1 auch im Rahmen des murinen Modells für die chronische Myokarditis verstärkt exprimiert wird und dies durch die MAP-Kinasen vermittelt wird schlüssig. Jedoch ist hier die rasche Aktivierung und die bereits erhöhte Expression des EGR-1 auf mRNA- wie Proteinebene bereits am vierten postinfektiösen Tag zu beachten, während sich die erhöhte Expression auf Proteinebene für ERK-2 erst in beiden Mausmodellen am Tag 8 p.i. zeigte. Dies schließt eine Vermittlung der Induktion von EGR-1 durch das MAP-Kinase System jedoch nicht aus, da sicherlich nicht die maximale Proteinkonzentration für die Modulation der EGR-1 Expression entscheidend erscheint.

Die initial gestellte Vermutung, ob EGR-1 eine Funktion im Rahmen einer Aktivierung im Endothelinsystem zu haben scheint oder auch selbst durch einen Bestandteil dieses

Signalsystems moduliert wird, lässt sich aus den hier gezeigten versuchen nicht ableiten, dennoch erscheint die Vermutung, die sich anhand der Literatur stellen lässt, naheliegend, so dass hierbei sicher auch eine Beeinflussung vorliegt, deren weitere Betrachtung lohnenswert erscheint.

Neben der möglichen Beeinflussung des Endothelinsystems scheint eine weitere Funktion des EGR-1 im Rahmen der infektiösen Myokarditis relevant zu sein. Verschiedene vorhergehende Arbeiten (6, 69) berichteten von einer Modulation der Expression des tumour necrosis factor- α (TNF- α) durch EGR-1. TNF- α hingegen wurde bereits mehrfach in Verbindung mit der Chronifizierung und Aufrechterhaltung der chronischen Entzündungsreaktion in der CVB-3 induzierten murinen Myokarditis gebracht (6).

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass es unter der Blockade des ERK-1/2 Signalwegs zu einer deutlichen Reduktion des inflammatorischen Geschehens und der Virus-Reproduktion gekommen war (34, 57).

So zeigten sich für EGR-1 u.a. zwei mögliche Wege an der inflammatorischen Reaktion der chronischen infektiösen Reaktion beteiligt zu sein, welche auch mit dem hier ermittelten Expressionsverhalten in Übereinstimmung zu sein scheinen. Nichtsdestotrotz lässt sich bei der Betrachtung verschiedener Arbeiten, welche die Induktion von EGR-1 im Rahmen von mechanischen Reizen (35-38, 70) untersuchen, auch die Vermutung nachvollziehen, dass die Expressionssteigerung des EGR-1 im Verlauf der Infektion auch im Zusammenhang mit mechanischen Reizen im Zusammenhang mit der zumindest temporär hochgradig eingeschränkten Ejektionsfraktion des Herzens im Rahmen der Myokarditis stehen könnte. Auch die Möglichkeit einer Kombination der Expressionssteigerung einmal im Rahmen der Infektion und andererseits der mechanischen Reize ist möglich, wobei die Aktivierung der Expression des EGR-1 auf mechanische Reize nicht unbedingt mittels des MAP-Kinase Wegs vermittelt sein muss.

6 Zusammenfassung

Die dargestellten Versuche zeigten im Verlauf der CVB-3 Infektion eine signifikante Änderung der Expression des EGR-1 auf Protein- wie mRNA-Ebene. Der bereits in der Literatur beschriebene Zusammenhang zwischen dem MAP-Kinase Signalweg und EGR-1 konnte anhand der Expressionsuntersuchungen auf mRNA- und Proteinebene in dem hier vorliegenden murinen Modell der Myokarditis nachvollzogen werden. Im resistenten Mausmodell C57Bl/6 zeigte sich auf der Proteinebene eine rasche Auf- und Abregulation des EGR-1, wohingegen sich im permissiven Mausmodell A.BY/SnJ in der chronischen Phase der Myokarditis im Mittel die Tendenz einer Aufregulation zeigte, wobei sich keine statistische Signifikanz zeigte. Auf der Ebene der mRNA konnte für EGR-1 in beiden Mausmodellen eine erhöhte Expression im Rahmen der akuten Entzündungsreaktion gezeigt werden. Im resistenten Mausmodell C57Bl/6 zeigte sich am 28. postinfektiösem Tag im Mittel kein signifikant erhöhtes Expressionsniveau mehr, im permissiven Mausmodell A.BY/SnJ zeigten sich im Mittel Hinweise auch im Rahmen der persistierenden Entzündungsreaktion eine persistierend erhöhte mRNA-Expression zu zeigen. Für ERK-1/2 zeigte sich nach der CVB3-Infektion in beiden untersuchten Mausstämmen (permissiv wie resistent) eine Induktion der Expression auf Proteinebene. Wobei sich im permissiven Mausstamm A.BY/SnJ, anders als im Vergleich mit dem resistenten Mausstamm C57Bl/6, im Rahmen der Chronifizierung der Myokarditis eine signifikant länger anhaltende und stärkere Steigerung der Proteinexpression von ERK-2 zeigte.

Der bereits beschriebene Zusammenhang der Expressionsmodulation von EGR-1 durch ERK-1/2, ließ sich anhand der Expressionsdaten der EGR-1 mRNA und der ERK-2 Proteinexpression nachvollziehen. So ließ sich für das resistente Mausmodell C57Bl/6 ein vergleichbares Expressionsmuster, mit einer Auf- bzw. Abregulation vor bzw. nach der akuten Phase der CVB-3 Infektion zeigen. Im permissiven Mausmodell A.BY/SnJ hingegen konnte die in der chronischen Phase der Myokarditis signifikant erhöhte ERK-2 Expression, für EGR-1 auf mRNA-Ebene nicht mit statistischer Signifikanz gezeigt werden, hier ließ sich lediglich im Mittelwert in der Tendenz eine erhöhte Expression zeigen. Diese Versuchsergebnisse passen zu dem histopathologischen Bild, in dem sich im resistenten Mausmodell C57Bl/6 mit der abklingenden Entzündungsreaktion auch die Proteinexpression von EGR-1 und ERK-2 reduziert hat, wohingegen mit dem Fortbestehen der histopathologischen Veränderungen im permissiven Mausmodell A.BY/SnJ ebenfalls das Expressionsniveau erhöht erscheint.

7 Literaturverzeichnis

- 1) Aretz HT, Billingham ME, Edwards WD, Factor SM, Fallon JT, Fenoglio JJ Jr, Olsen EG, Schoen FJ. Myocarditis. A histopathologic definition and classification. *Am. J. Cardiovasc. Pathol.* 1987; 1:3–14
- 2) Abelmann WH. Virus and the heart. *Circulation.* 1971; 44:950–56
- 3) Woodruff J. Viral myocarditis. A review. *Am. J. Pathol.* 1980; 101, 427–484
- 4) Schultheiss HP, Noutsias M, Kühl U, Gross U, Lassner D, Poller W, Pauschinger M. Cardiomyopathies II. Hypertrophic cardiomyopathy, restrictive cardiomyopathy, arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Internist (Berlin).* 2005; 46(12):1373-85
- 5) Grist NR, Reid D. Organisms in myocarditis/endocarditis viruses. *J. Infect.* 1997; 34:155
- 6) Esfandiarei M, McManus B. Molecular Biology and Pathogenesis of Viral Myocarditis. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 2008; 3:127–55
- 7) Nippoldt TB, Edwards WD, Holmes DR Jr, Reeder GS, Hartzler GO, Smith HC. Right ventricular endomyocardial biopsy: clinicopathologic correlates in 100 consecutive patients. *Mayo Clin. Proc.* 1982; 57:407–18
- 8) Schultheiss HP. In focus: Inflammatory cardiomyopathy. *Internist (Berlin).* 2006; 47(9):970, 972-3
- 9) Kühl U, Schultheiss HP: Myocarditis - early biopsy allows for tailored regenerative treatment. *Dtsch Arztebl Int* 2012; 109(20): 361–8
- 10) Baboonian C, Davies MJ, Booth JC, McKenna WJ. Coxsackie B viruses and human heart disease. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1997; 223:31–52
- 11) Saraste A , Kytö V, Saraste M, Vuorinen T, Hartiala J, Saukko P. Coronary flow reserve and heart failure in experimental coxsackievirus myocarditis. A transthoracic Doppler echocardiography study. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology.* 2006 Vol. 291 no. 2, H871-H875
- 12) Rabin ER, Hassan SA, Jenson AB, Melnick JL. Coxsackievirus B3 myocarditis in mice. An electron microscopic, immunofluorescent and virus-assay study. *Am. J. Pathol.* 1964; 44:775–97
- 13) Melnick JL, Godman GC. Pathogenesis of coxsackievirus infection; multiplication of virus and evolution of the muscle lesion in mice. *J. Exp. Med.* 1951;93:247–66

- 14) Seki Y, Kai H, Kai M, Muraishi A, Adachi K, Imaizumi T. Myocardial DNA strand breaks are detected in biopsy tissues from patients with dilated cardiomyopathy. *Clin. Cardiol.* 1998; 21:591–96
- 15) Chow LH, Gauntt CJ, McManus BM. Differential effects of myocarditic variants of coxsackievirus B3 in inbred mice. A pathologic characterization of heart tissue damage. *1991 Lab. Invest.* 1991; 64:55–64
- 16) McManus BM, Chow LH, Wilson JE, Anderson DR, Gulizia JM, Gauntt CJ, Klingel KE, Beisel KW, Kandolf R. Direct myocardial injury by enterovirus: a central role in the evolution of murine myocarditis. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1993; 68:159–69
- 17) Seko Y, Takahashi N, Yagita H, Okumura K, Yazaki Y. Expression of cytokine mRNAs in murine hearts with acute myocarditis caused by coxsackievirus B3. *J. Pathol.* 1997; 183:105–8
- 18) Fuse K, Chan G, Liu Y, Gudgeon P, Husain M, Chen M, Yeh WC, Akira S, Liu PP. Myeloid differentiation factor- 88 plays a crucial role in the pathogenesis of Coxsackievirus B3-induced myocarditis and influences type I interferon production. *Circulation.* 2005; 112:2276–8
- 19) Cho CT, Feng KK, McCarthy VP, Lenahan MF. Role of antiviral antibodies in resistance against coxsackievirus B3 infection: interaction between preexisting antibodies and an interferon inducer. *Infect. Immun.* 1982; 37:720–27
- 20) Henke A, Huber S, Stelzner A, Whitton JL. The role of CD8+ T lymphocytes in coxsackievirus B3-induced myocarditis. *J Virol.* 1995; 69(11): 6720-8
- 21) Gupta S, Markham DW, Drazner MH, Mammen PP. Fulminant myocarditis. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2008; 5(11): 693-706
- 22) 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; 89:314–18
- 23) Matsumori A, Yamada T, Suzuki H, Matoba Y, Sasayama S. Increased circulating cytokines in patients with myocarditis and cardiomyopathy. *Br. Heart J.* 1994; 72:561–66
- 24) Godeny EK, Gauntt CJ. Involvement of natural killer cells in coxsackievirus B3-induced murine myocarditis. *J. Immunol.* 1986; 137:1695–702

- 25) Godeny EK, Gauntt CJ. Murine natural killer cells limit coxsackievirus B3 replication. *J. Immunol.* 1987; 139:913–18
- 26) Koike H, Kanda T, Sumino H, Yokoyama T, Arai M, Motooka M, Suzuki T, Tamura J, Kobayashi I. Reduction of viral myocarditis in mice lacking perforin. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* 2001; 110:229–37
- 27) Seko Y, Tsuchimochi H, Nakamura T, Okumura K, Naito S, Imataka K, Fujii J, Takaku F, Yazaki Y. Expression of major histocompatibility complex class I antigen in murine ventricular myocytes infected with coxsackievirus B3. *Circ. Res.* 1990; 67:360–67
- 28) Woodruff JF, Woodruff JJ. Involvement of T lymphocytes in the pathogenesis of coxsackievirus B3 heart disease. *J. Immunol.* 1974; 113:1726–34
- 29) Parrillo JE, Cunnion RE, Epstein SE, Parker MM, Suffredini AF, Brenner M, Schaer GL, Palmeri ST, Cannon RO 3rd, Alling D. A prospective, randomized, controlled trial of prednisone for dilated cardiomyopathy. *N. Engl. J. Med.* 1989; 321:1061–68
- 30) Maisch B, Schönian U, Hengstenberg C, Herzum M, Hufnagel G, Bethge C, Bittinger A, Neumann K. Immunosuppressive treatment in autoreactive myocarditis: results from a controlled trial. *Postgrad. Med. J.* 1994; 70:S29–34
- 31) Shikhman AR, Greenspan NS, Cunningham MW. A subset of mouse monoclonal antibodies cross-reactive with cytoskeletal proteins and group A streptococcal M proteins recognizes N-acetyl-beta-D-glucosamine. *J Immunol.* 1993; 151(7): 3902-13
- 32) Gauntt CJ, Tracy SM, Chapman N, Wood HJ, Kolbeck PC, Karaganis AG, Winfrey CL, Cunningham MW. Coxsackievirus-induced chronic myocarditis in murine models. *Eur Heart. J.* 1995; 56-8
- 33) Huber SA, Cunningham MW. Streptococcal M protein peptide with similarity to myosin induces CD4+ T cell-dependent myocarditis in MRL/++ mice and induces partial tolerance against coxsackieviral myocarditis. *J Immunol.* 1996; 156(9): 3528-34
- 34) Lim BK, Nam JH, Gil CO, Yun SH, Choi JH, Kim DK, Jeon ES. Coxsackievirus B3 replication is related to activation of the late extracellular signal-regulated kinase (ERK) signal. *Virus Res.* 2005; 113:153–57
- 35) Saadane N, Alpert L, Chalifour LE. Expression of immediate early genes, GATA-4, and Nkx2.5 in adrenergic-induced cardiac hypertrophy and during regression in adult mice. *Br J Pharmacol* 1999; 127:1165–1176
- 36) Yan SF, Mackman N, Kisiel W, Stern DM, Pinsky DJ. Hypoxia/ hypoxemia-induced activation of the procoagulant pathways and the pathogenesis of ischemia-associated thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19:2029–2035

- 37) Huang Z, Li H, Guo F, Jia Q, Zhang Y, Liu X, Shi G. Egr-1, the potential target of calcium channel blockers in cardioprotection with ischemia/reperfusion injury in rats. *Cell Physiol Biochem.* 2009; 24(1-2):17-24
- 38) Arab S, Konstantinov IE, Boscarino C, Cukerman E, Mori A, Li J, Liu PP, Redington AN, Coles JG. Early gene expression profiles during intraoperative myocardial ischemia-reperfusion in cardiac surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2007;134(1):74-81
- 39) Neyses L, Nouskas J, Luyken J, Fronhoffs S, Oberdorf S, Pfeifer U, Williams RS, Sukhatme VP, Vetter H. Induction of immediate-early genes by angiotensin II and endothelin-1 in adult rat cardiomyocytes. *J Hypertens.* 1993; 11(9):927-34
- 40) Sukhatme VP, Cao XM, Chang LC, Tsai-Morris CH, Stamenkovich D, Ferreira PC, Cohen DR, Edwards SA, Shows TB, Curran T. A zinc finger-encoding gene coregulated with c-fos during growth and differentiation, and after cellular depolarization. *Cell* 1988; 53(1):37-43
- 41) Datta R, Taneja N, Sukhatme V P, Qureshi S A, Weichselbaum R & Kufe W. Reactive oxygen intermediates target CC(A/T)6GG sequence to mediate activation of the early growth response 1 transcription factor gene by ionizing radiation. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 1993; 90, 2419-22
- 42) Treisman R. Journey to the surface of the cell: Fos regulation and the SRE. *EMBO J.* 1995; 14: 4905-4913
- 43) Lim CP, Jain N, Cao X. Stress-induced immediate-early gene, egr-1, involves activation of p38/JNK1. *Oncogene* 1998; 16(22): 2915-2926
- 44) Huber M, Watson KA, Selinka HC, Carthy CM, Klingel K, McManus BM, Kandolf R. Cleavage of RasGAP and phosphorylation of mitogen-activated protein kinase in the course of coxsackievirus B3 replication. *J. Virol.* 1999; 73:3587-94
- 45) Opavsky MA, Martino T, Rabinovitch M, Penninger J, Richardson C, Petric M, Trinidad C, Butcher L, Chan J, Liu PP. Enhanced ERK-1/2 activation in mice susceptible to coxsackievirus-induced myocarditis. *J Clin Invest.* 2002; 109(12):1561-9
- 46) Simon P, Schott K, Williams RW, Schaeffel F. Posttranscriptional regulation of the immediate-early gene EGR1 by light in the mouse retina. *Eur. J. Neurosci.* 2004; 20(12):3371-7
- 47) Day ML, Fahrner TJ, Aykent S, Milbrandt J. The zinc finger protein NGFI-A exists in both nuclear and cytoplasmic forms in nerve growth factor-stimulated PC12 cells. *J. Biol. Chem.* 1990; 265(25):15253-60

- 48) Sukhatme VP, Cao XM, Chang LC, Tsai-Morris CH, Stamenkovich D, Ferreira PC, Cohen DR, Edwards SA, Shows TB, Curran T. A zinc finger-encoding gene coregulated with c-fos during growth and differentiation, and after cellular depolarization. *Cell*. 1988; 53(1):37-43
- 49) Knight C, Slade JP, Carter D. The nuclear, 75 kDa form of early growth response protein-1/nerve growth factor-induced A protein is primarily restricted to LH beta-subunit-expressing cells in rat anterior pituitary. *Eur. J. Endocrinol.* 2000; 143(6):817-21
- 50) Meyer RG, Kupper JH, Kandolf R, Rodemann HP. Early growth response-1 gene (Egr-1) promoter induction by ionizing radiation in U87 malignant glioma cells in vitro. *Eur. J. Biochem.* 2002; 269(1):337-46
- 51) Cao X, Mahendran R, Guy GR, Tan YH. Detection and characterization of cellular EGR-1 binding to its recognition site. *J. Biol. Chem.* 1993; 268(23):16949-57
- 52) Henning V. Differentielle Expression des Early Growth Response Gene Egr1 und frühe Aktivierung der Mikroglia nach ionisierender Bestrahlung im Zentralen Nervensystem der Ratte. Institut für Hirnforschung der Universität Tübingen 2007
- 53) Boivin B, Allen B. p38 MAP kinase attenuates phorbol ester-induced ERK MAP kinase activation in adult cardiac ventricular myocytes. *Current Topics in Biochemical Research* Vol. 14. 01.2012
- 54) Szalay G, Meiners S, Voigt A, Lauber J, Spieth C, Speer N, Sauter M, Kuckelkorn U, Zell A, Klingel K, Stangl K, Kandolf R. Ongoing Coxsackievirus Myocarditis is Associated with Increased Formation and Activity of Myocardial Immunoproteasomes. *Am. J. of Pathol.* 2006; 168:1542-1552
- 55) Szalay G, Sauter M, Hald J, Weinzierl A, Kandolf R, Klingel K. Sustained nitric oxide synthesis contributes to immunopathology in ongoing myocarditis attributable to interleukin-10 disorders. *Am J Pathol.* 2006 Dec;169(6):2085-93
- 56) Julie M. J. Logan, Kirstin J. Edwards, Nick A. Saunders. Real-time PCR: Current Technology and Applications. Horizon Scientific Press, 2009: 67-68
- 57) Luo H, Yanagawa B, Zhang J, Luo Z, Zhang M, Esfandiarei M, Carthy C, Wilson JE, Yang D, McManus BM. Coxsackievirus B3 replication is reduced by inhibition of the extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling pathway. *J. Virol.* 2002; 76:3365-73

- 58) Aggeli IK, Beis I, Gaitanaki C. ERKs and JNKs mediate hydrogen peroxide-induced Egr-1 expression and nuclear accumulation in H9c2 cells. *Physiol Res.* 2010;59 (3):443-54
- 59) Szalay G, Meiners S, Voigt A, Lauber J, Spieth C, Speer N, Sauter M, Kuckelkorn U, Zell A, Klingel K, Stangl K, Kandolf R. Ongoing Coxsackievirus Myocarditis is Associated with Increased Formation and Activity of Myocardial Immunoproteasomes. *Am. J. of Path.* 2006; 168:1542-1552
- 60) Whitmarsh AJ, Shore P, Sharrocks AD, Davis RJ. Integration of MAP kinase signal transduction pathways at the serum response element. *Science.* 1995; 269(5222):403-7
- 61) Jones N, Agani FH. 2003. Hyperoxia induces Egr-1 expression through activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway. *J. Cell Physiol.* 2003; 196(2):326-33
- 62) Herschman HR. Extracellular signals, transcriptional responses and cellular specificity. *Trends Biochem Sci.* 1989; 14(11):455-8
- 63) Seyfert VL, McMahon SB, Glenn WD, Yellen AJ, Sukhatme VP, Cao XM, Monroe JG. Methylation of an immediate-early inducible gene as a mechanism for B cell tolerance induction. *Science.* 1990; 250(4982):797-800
- 64) Jones MW, Errington ML, French PJ, Fine A, Bliss TV, Garel S, Charnay P, Bozon B, Laroche S, Davis S. A requirement for the immediate early gene Zif268 in the expression of late LTP and long-term memories. *Nat. Neurosci.* 2001; (3):289-96
- 65) Liang KW, Ting CT, Yin SC, Chen YT, Lin SJ, Liao JK, Hsu SL. Berberine suppresses MEK/ERK-dependent Egr-1 signaling pathway and inhibits vascular smooth muscle cell regrowth after in vitro mechanical injury. *Biochem Pharmacol.* 2006;71(6):806-17
- 66) Szalay G, Sauter M, Hald J, Weinzierl A, Kandolf R, Klingel K. Sustained nitric oxide synthesis contributes to immunopathology in ongoing myocarditis attributable to interleukin-10 disorders. *Am J Pathol.* 2006 Dec;169(6):2085-93
- 67) Topilko, P, Schneider-Maunoury S, Levi G, Trembleau A, Gourdjji D, Driancourt M, Rao V, Charnay P. Multiple pituitary and ovarian defects in Krox-24 (NGFI-A, Egr-1)-targeted mice. *Mol.Endocrinol.* 1998, 12 (1), 107-122
- 68) Pagel JJ, Deindl E. Early growth response 1--a transcription factor in the crossfire of signal transduction cascades. *Indian J Biochem Biophys.* 2011 Aug;48(4):226-35.
- 69) Pines A, Romanello M, Cesaratto L, Damante G, Moro L, D'andrea P, Tell G. Extracellular ATP stimulates the early growth response protein 1 (Egr-1) via a protein

kinase C-dependent pathway in the human osteoblastic HOBIT cell line. *Biochem J.* 2003; 373(Pt 3):815-24

- 70) Stula M, Orzechowski HD, Gschwend S, Vetter R, von Harsdorf R, Dietz R, Paul M. Influence of sustained mechanical stress on Egr-1 mRNA expression in cultured human endothelial cells. *Molecular and Cellular Biochemistry* 210: 101–108, 2000.

8 Abbildungs- und Tabellen-Verzeichnis

Tabellen:

Tabelle 1)	Primär Antikörper
Tabelle 2)	Sekundär Antikörper
Tabelle 3)	Elektrophoresegele
Tabelle 4)	cDNA Synthese
Tabelle 5)	Standardreihen PCR
Tabelle 6)	TaqMan PCR
Tabelle 7)	SYBR Green PCR

Abbildungen:

Abbildung 1)	Drei Phasen der viralen Myokarditis
Abbildung 2)	Pathway der EGR-1 Expressionsn Aktivierung(vereinfacht)
Abbildung 3)	Western Blot der Proteinexpression von ERK-1/2, sowie der korrespondierenden GAPDH Kontrollen im Verlauf der Infektion
Abbildung 4)	Proteinexpression von ERK-2/GAPDH im Verlauf der Infektion im permissiven Mausmodell
Abbildung 5)	Proteinexpression von ERK-2/GAPDH im Verlauf der Infektion im resistenten Mausmodell
Abbildung 6)	Proteinexpression von ERK-2/GAPDH im Verlauf der Infektion für A.BY/SnJ und C57BL/6 Tiere

- Abbildung 7) Proteineexpression von ERK-2 (p42)/GAPDH und ERK-1 (p44)/GAPDH
- Abbildung 8) Proteineexpression von p-p44/p42 im Verlauf der Infektion
- Abbildung 9) Western Blot vollständige Lane
- Abbildung 10) Zwei exemplarische Western Blots.
- Abbildung 11) Proteineexpression von EGR-1/GAPDH im Verlauf der Infektion im permissiven Mausmodell A.BY/SnJ als Einzelwertdarstellung
- Abbildung 12) Proteineexpression von EGR-1/GAPDH im Verlauf der Infektion im resistenten Mausmodell C57Bl/6 als Einzelwertdarstellung
- Abbildung 13) Proteineexpression von EGR-1/GAPDH im Verlauf der Infektion
- Abbildung 14) Proteineexpression von EGR-1/GAPDH der nicht infizierten Versuchstiere
- Abbildung 15) mRNA Sequenz des murinen EGR-1 Gens
- Abbildung 16) PCR Produkt der Standardreihen EGR-1 Primer
- Abbildung 17) Ausschnitt der rRNA Sequenz des murinen 18S Gens.
- Abbildung 18) PCR Produkt der Standardreihen 18S Primer
- Abbildung 19) 18S PCR Primer
- Abbildung 20) Dissoziationskurve für selektiv amplifizierte 18S cDNA
- Abbildung 21) mRNA Expression von EGR-1/18S im Verlauf der Infektion im permissiven Mausmodell A.BY/SnJ
- Abbildung 22) mRNA Expression von EGR-1/18S im Verlauf der Infektion im resistenten Mausmodell C57Bl/6
- Abbildung 23) mRNA Expression von EGR-1/18S im Verlauf der Infektion im Vergleich zwischen beiden Mausmodellen

9 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ABY	A.BY/SnJ
Bl/6	C57Bl6
bp	Basenpaar
bwd	backward
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
CAR	Cosackie- und Andeoviursrezeptor
CVB3	Coxsackie-Virus B3
DAF	Decay accelerating factor
DCM	dilatative Kardiomyopathie
dNTPs	Didesoxyribonukleosidtriphosphat
DNA	desoxyribonuclein acid
cDNA	complementary DNA
ECE	Endothelin Converting Enzym
EGF	epidermal groth factor
EGR-1	Early Groth Response 1
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinase
pERK	phosphorylierte Extracellular-signal Regulated Kinase
ET	Endothelin
fwd	forward
G	Guanin
ggf.	gegebenenfalls
HMEC	immortalized human microvascular endothelial cells

IGF	Insulin-like Growth Factors
kB	kilo Base
LH	luteinisierendes Hormon
MAP-Kinasen	mitogen activated protein-Kinasen
NK-Zellen	Natürliche-Killerzelle
o.g.	oben genannt
o.ä.	oder ähnlich
PCR	Polymerase chain reaction
PDGFA	Platelet-Derived Growth Factor A
p.i.	post infectionem
Raf-1	rapidly accelerated fibrosarcoma 1
RNA	Ribonukleinsäure
mRNA	messenger ribonucleic acid
RT	reverse Transkriptase
RT-PCR	real-time PCR
SD	standard deviation
T	Thymin
TGF beta	transforming growth factor beta
TNF alpha	tumor necrosis factor alpha
u.a.	unter anderem

10 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Bastian Maroski, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

"Zeitliche Expression des Transkriptionsfaktors EGR-1 und der MAP-Kinasen ERK-1/2 in murinen Modellen der viralen Myokarditis"

selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

11 Lebenslauf

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