

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

DISSERTATION

**Untersuchungen der kardialen mRNA Expression von Interferon-reguliertem
Faktor-7 in murinen Modellen der akuten und chronischen enteroviralen
Myokarditis**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Bianca Woodruff
aus Mussenhausen

Datum der Promotion: 25.10.2013

Gewidmet meinen Kindern,
Sophia, Fem,
William und Lea

„Das Schönste, was wir erleben können, ist das Geheimnisvolle.“

Albert Einstein

(Wie ich die Welt sehe, 1930)

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaare
Bwd	Backward
C	Cytosin
CAD	Constitutive activation domain
CAR	Coxsackie-/Adenovirusrezeptor
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CT	Cycle Threshold
CVA	Coxsackievirus Typ A
CVB3	Coxsackievirus Typ B3
DAF	Decay accelerating factor
DBD	DNA-bindende Domäne
DC	Dendritische Zellen
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
DdNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Ds	Double stranded
DTT	Dithiothreitol
ECMV	Enzephalomyokarditisvirus
EKG	Elektrokardiogramm
Fwd	Forward
G	Guanin
G	Gravitationskonstante
ICAM-1	intrazelluläre Adhäsionsmolekül-1
I.p	Intraperitoneal
I.v.	Intravenös
IAD	IRF-assozierte Domäne
ID	Inhibitorische Domäne
IFN	Interferon
IKK	Inhibitor der NF- κ B Kinase

IKK-1	Inducible IKK
IL	Interleukin
iNOS	Induzierbare NO-Synthetase
IRAK	IL-1 Rezeptor-assozierte Kinase
IRF-7	Interferon regulierender Faktor 7
IRF-E	IRF-bindende-Elemente
ISGF3	Interferon-stimulierter Genfaktor 3
ISRE	IFN-stimulated response element
ISRE	IRF-stimulated response element
Kb	Kilobase
KDa	Kilo Dalton
LCMV	Lymphozytärer Choriomeningitis Virus
LMP-1	Latentes Membranprotein 1
Log	Logarithmisch
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	Leucin-reiche Domäne
M	Marker
M-CSF	Makrophagen-Koloniestimulierender-Faktor
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
mRNA	Messenger Ribonukleotid
MyD88	Myeloid differentiation factor 88
NF- κ B	Nuklear Faktor κ B
NK	Natürliche Killerzellen
NO	Stickstoffmonoxid (nitric oxide)
OD	Optische Dichte
p.i	Post infectionem
PCR	Polymerase chain reaction
PDC	Plasmacytoide dendritische Zellen
Pfu	Plaque forming Units
PRD	Positive regulatorische Domäne
Qty	Quantität
RD	Response domain
RIN	RNA Integritätsnummer

RIP-1	Rezeptor-interagierendes Protein-1
RNA	Ribonukleotinsäure
Upm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkription
RT-qPCR	Real-Time quantitative PCR
SEM	Standard Error of the Mean
Ss	Single stranded
STAT	Signal transducer and activator of transcription
T	Thymin
TANK	TRAF-assoziiertes NF- κ B Aktivator
TPA	Tetradecanoylphorbol-Acetat
TBE	Tris-Borat-Puffer
TBK	TANK-binding kinase
TIR	Toll/IL-1 Rezeptor Homologie Domäne
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAF	Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor-assoziiertes Protein
TRIF	TIR domain-containing adapter inducing IFN- β
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV	Ultraviolettes Licht
VAD	Virus-aktiviertes Domäne
VSV	Vesicular stomatitis Virus
WHO	World Health Organisation
X-Gal	5-Bromo-4-Chlorindoxyl- β -D-Galaktosidase
ZNS	Zentralnervensystem

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Drei Phasen der murinen viralen Myokarditis	19
Abb. 2	MyD88-abhängiger TLR-Signalweg bei einer CVB3-Infektion	24
Abb. 3	MyD88-unabhängiger TLR-Signalweg bei einer CVB3-Infektion	25
Abb. 4	Schematische Struktur des IRF-7 Proteins	29
Abb. 5	Murine IRF-7 Isoformen	29
Abb. 6	Virus/IFN induzierter IRF-7 Signalweg	31
Abb. 7	Schematischer Ablauf einer Real-Time PCR	47
Abb. 8	Prinzip der Klonierung	52
Abb. 9	RNA-Integritätsnachweis mittels Gelelektrophorese	56
Abb. 10	Bioanalyzenergebnis für die RNA Integrität	57
Abb. 11	Schema zur Etablierung einer IRF-7 RT-qPCR	58
Abb. 12	Hypothetische cDNA-Sequenz der murinen IRF-7	59
Abb. 13	Gel nach qualitativer IRF-7 PCR mit IRF-7 BWn Primer	60
Abb. 14	Nukleotidsequenz des neuen IRF-7 Exon	60
Abb. 15	Zyklentest für qualitative IRF-7 PCR mit IRF-7 BWn Primer	61
Abb. 16	Qualitative PCR mit neu etablierten IRF-7 Assay	62
Abb. 17	RT-qPCR der IRF-7 Standardreihe	63
Abb. 18	IRF-7 Standardkurve	64
Abb. 19	18S Standardkurve	65
Abb. 20	RT-qPCR für IRF-7	66
Abb. 21	Dissoziationskurve für selektiv amplifizierte IRF-7 cDNA	67
Abb. 22	Dissoziationskurve für selektiv amplifizierte 18S cDNA	67
Abb. 23	GraphPad Prism Darstellung in log ₁₀ der IRF-7 mRNA Expression der A.BY Maus	69
Abb. 24	GraphPad Prism Darstellung in log ₁₀ der IRF-7 mRNA Expression der C57Bl/6 Maus	70
Abb. 25	Vergleich der auf 18S standardisierten IRF-7 mRNA Expression in beiden Myokarditismodellen im CVB3-Infektionsverlauf	71
Abb. 26	Induktionsgrad der IRF-7 Expression in A.BY im CVB3-Infektionsverlauf	74
Abb. 27	Induktionsgrad der IRF-7 Expression in C57Bl/6 im CVB3- Infektionsverlauf	75

Abb. 28	Vergleich des Induktionsfaktors der IRF-7 mRNA Expression beider Myokarditismodelle	76
---------	--	----

Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Ansatz des DNA-Verdau	42
Tab. 2	Ansatz und Programm der Reversen Transkription	43
Tab. 3	Ansatz und Programm der IRF-7 PCR	45
Tab. 4	Ansatz und Programm der 18S PCR	46
Tab. 5	Ansatz und Programm der IRF-7 RT-qPCR	48
Tab. 6	Ansatz und Programm der 18S RT-qPCR	49
Tab. 7	Ansatz der Ligation	53
Tab. 8	Absolute IRF-7 Expression nach IRF-7 RT-qPCR im CVB3-Infektionsverlauf in A.BY und C57Bl/6	68
Tab. 9	IRF-7 Induktionsvergleich der beiden Myokarditismodellen im Verlauf der CVB3-Infektion	72

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	3	
Abbildungsverzeichnis	6	
Tabellenverzeichnis	8	
Inhaltsverzeichnis	9	
Abstract	13	
Abstrakt	14	
1	Einleitung	15
1.1	Virusmyokarditis und dilatative Kardiomyopathie	15
1.2	Murine Modelle für Myokarditis	17
1.3	Murine virale Infektion	17
1.4	Coxsackievirus B3	20
1.5	Toll-like Rezeptoren	21
1.6	Interferone	26
1.7	Interferon regulierende Faktoren	27
1.8	Interferon regulierender Faktor 7	28
1.8.1	Struktur des IRF-7	28
1.8.2	Regulation des IRF-7	30
1.8.3	Funktion des IRF-7	30
1.9	Ziel dieser Arbeit	32

2	Versuchstiere und Material	33
2.1	Versuchstiere	33
2.2	Materialien	33
2.2.1	Chemikalien	33
2.2.2	Primer	34
2.2.3	Lösungen, Puffer, Medien	35
2.2.4	Kits	35
2.2.5	Prokaryonte Zellen	35
2.2.6	Verbrauchsmaterialien	35
2.2.7	Geräte	35
2.2.8	Software	36
3	Methoden	37
3.1	Isolierung von murinen Gewebe	37
3.2	Einteilung der kardialen histopathologischen Veränderungen	37
3.3	Isolierung der RNA	38
3.4	RNA-Reinheitskontrolle	39
3.4.1	Photometer	39
3.4.2	Nano Drop	40
3.5	RNA-Qualitätsanalyse	40
3.5.1	Gelelektrophorese	40
3.5.2	Bioanalyzer	41
3.6	RNA-Quantitätsbestimmung	41
3.7	DNA-Verdau	41
3.8	Reverse Transkription	42
3.9	Primerdesign	43
3.10	Amplifizierung von DNA mittels PCR	44
3.11	Nachweis amplifizierter DNA mittels Gelelektrophorese	46
3.12	Real-Time-quantitative PCR	46
3.13	Isolierung von DNA aus Agarosegele	51
3.14	Klonierung der aus dem Agarosegel isolierten cDNA in <i>E. coli</i>	51

3.14.1	Ligation	53
3.14.2	Transformation mit <i>E.coli</i>	53
3.15	Plasmidpräparation	54
3.16	Restriktionsverdau	55
3.17	Statistik	55
3.17.1	Graphik	55
4	Ergebnisse	56
4.1	RNA-Reinheit, Integrität und Quantität	56
4.2	Etablierung eines IRF-7 RT-qPCR Assay	58
4.2.1	IRF-7 Primertest	58
4.2.2	Zyklentest für den IRF-7 Assay	61
4.2.3	Qualitative PCR zum IRF-7 Induktionsnachweis in den beiden Mausmodellen der akuten und chronischen Myokarditis	62
4.2.4	Etablierung der IRF-7 RT-qPCR in den beiden Mausmodellen der akuten und chronischen Myokarditis	63
4.2.4.1	Standardkurven für IRF-7 mRNA und 18S rRNA	63
4.2.4.2	Dissoziationskurven für IRF-7 und 18S	66
4.3	Absolute Expression von IRF-7 mRNA im akutem und chronischem Myokarditismodell	68
4.3.1	Absolute Expression von IRF-7 mRNA im Myokarditismodell der A.BY Maus	69
4.3.2	Absolute Expression von IRF-7 mRNA im Myokarditismodell der C57Bl/6 Maus	70
4.3.3	Vergleich der absoluten IRF-7 Expression in beiden Myokarditismodellen	71
4.4	IRF-7 Induktion in beiden Myokarditismodellen im CVB3-Infektionsverlauf	72
4.4.1	Induktion der IRF-7 mRNA-Expression im Modell der A.BY Maus	74

4.4.2	Induktion der IRF-7 mRNA-Expression im Modell der C57Bl/6 Maus	75
4.4.3	Vergleich des Induktionsfaktor in beiden Myokarditismodellen im CVB3-Infektionsverlauf	76
5	Diskussion	77
5.1	Differentielle Expression von IRF-7 bei der chronischen und akuten Myokarditis	78
5.2	Virusreplikation und kardiale IRF-7 Induktion	80
5.3	Diskussion der angewandten Methoden	83
5.4	IRF-7 Splice-Variante	85
5.5	Therapeutische Implikationen	86
6	Zusammenfassung	88
	Anhang	89
	Referenzen	89
	Lebenslauf	100
	Veröffentlichung	101
	Danksagung	102
	Eidesstattliche Versicherung	103

Abstract

Introduction The enteroviral myocarditis is a potentially lethal disease. The end phase of the myocarditis is development of dilative cardiomyopathy, characterized by a very poor prognosis. The therapy of dilative cardiomyopathy is largely symptomatic. The aim of this dissertation was to evaluate whether the cardiac expression of IRF-7 differed over time between two mouse models of CVB3-myocarditis. C57Bl/6-mice, which eliminate the virus, were compared with A.BY-mice, which develop chronic myocarditis with viral persistence. IRF-7 plays a key role in the regulation of the early anti-viral interferon response.

Methods RNA was isolated from the frozen hearts of both mouse models at specific time points after CVB3 infection. After evaluating the purity, quality and quantity of the RNA, the expression of IRF-7 was quantified using real-time-PCR and related to the expression of 18S rRNA, which was used as an internal standard.

Results The presented findings show that the cardiac IRF-7 mRNA expression was strongly induced in both mouse models on day 4 in comparison with the non-infected mice. However, C57Bl/6 mice showed a 2.7 times stronger expression than A.BY mice on day 4, which decreased after day 8. While C57Bl/6 mice reached maximal expression on day 4, A.BY mice showed a delayed maximal IRF-7 expression on day 8, which was lower than the level seen with C57Bl/6 mice. In contrast with C57Bl/6 mice, the IRF-7 mRNA expression of the A.BY mice remained clearly higher than the non-infected control mice until day 28. An additional result of this dissertation was the identification of a new cardiac-expressed IRF-7 exon.

Conclusion These results show that the C57Bl/6 mouse, which is able to eliminate CVB3, displays a faster and stronger induction of IRF-7 than the A.BY-mouse. Fast and robust cardiac induction of IRF-7 appears, therefore, to be a requirement for the efficient elimination of the virus.

Abstrakt

Die enterovirale Myokarditis ist eine potenziell lebensbedrohende Erkrankung. Die Endphase der Myokarditis ist die Entwicklung einer dilatativen Kardiomyopathie mit einer sehr schlechten Prognose. Die Therapie der dilatativen Kardiomyopathie ist zum großen Teil symptomorientiert. Ziel dieser Dissertation war zu untersuchen, ob sich die kardiale Expression von IRF-7 in zwei Mausmodellen der CVB3-Myokarditis im Zeitverlauf nach Infektion unterscheidet. Untersucht wurden C57Bl/6-Mäuse, die das Virus eliminieren, und A.BY-Mäuse, die eine chronische Myokarditis mit viraler Persistenz entwickeln. IRF-7 ist entscheidend an der Regulation der antiviralen frühen Interferonantwort beteiligt.

Dafür wurde RNA aus gefrorenen Herzen dieser Mausstämme zu definierten Zeitpunkten nach CVB3-Infektion isoliert. Nach Bestimmung von Reinheit, Qualität und Quantität der RNA wurde die Expression der IRF-7 mRNA mittels Real-Time-PCR quantifiziert und die Expression jeweils auf die 18S rRNA als endogener Standard bezogen.

Die vorgelegten Ergebnisse zeigen, dass die kardiale IRF-7 mRNA Expression in beiden Mausmodellen am Tag 4 im Vergleich zu nichtinfizierten Mäusen stark induziert war. C57Bl/6 Mäuse zeigten am Tag 4 im Vergleich zu A.BY Mäusen jedoch eine 2,7-fache stärkere Expression, die bei C57Bl/6 Mäusen ab Tag 8 wieder abnahm. Während C57Bl/6 Mäuse bereits am Tag 4 das Expressionsmaximum erreichten, zeigten A.BY Mäuse die maximale IRF-7 Expression verzögert am Tag 8, wobei das Niveau der C57Bl/6-Maus nicht erreicht wurde. Die IRF-7 mRNA-Expression blieb bei der A.BY-Maus im Unterschied zu C57Bl/6-Maus bis Tag 28 (jeweils im Vergleich zu nichtinfizierten Kontrollen) deutlich erhöht. Als weiteres Ergebnis dieser Dissertation konnte zudem ein neues kardial exprimiertes IRF-7 Exon identifiziert werden.

Diese Ergebnisse zeigten bei der C57Bl/6-Maus, die zu einer Elimination von CVB3 imstande ist, eine schnellere und stärkere kardiale Induktion von IRF-7 als bei der A.BY-Maus. Eine schnelle und robuste kardiale IRF-7 Induktion scheint demnach eine Voraussetzung für eine effiziente Elimination des Virus zu sein.

1. Einleitung

1.1 Virusmyokarditis und Dilatative Kardiomyopathie

Die Myokarditis ist eine kardiale Erkrankung, die in bis zu 9% der routinemäßig durchgeführten post mortem Studien identifiziert wurde (1, 2). Sie scheint zudem für 20% der Fälle eines plötzlichen Herztodes bei Erwachsenen, die jünger als 40 Jahre alt sind, verantwortlich zu sein (3). Klinisch definiert ist die Myokarditis als eine kardiale Erkrankung, die mit einer Entzündung des Myokards, einer Nekrose und/oder Degeneration der Myozyten in Abwesenheit eines ischämischen Ereignisses assoziiert ist (4, 5). Die weltweit am häufigsten auftretende Myokarditisart ist mit der Chagas-Krankheit assoziiert (6). In Europa und Nordamerika dagegen, ist die Virusmyokarditis die häufigste Myokarditisart. Es sind mehr als 20 Viren bekannt, die mit der humanen Myokarditis, assoziiert sind (7). In Deutschland ist der Parvovirus B19 der führende Myokarditiserreger, gefolgt vom Humanem Herpes-simplex-virus 6, den Enteroviren, dem Zytomegalievirus und den Adenoviren (8). Die Diagnose einer Myokarditis ist nur durch histologische und immunhistologische Untersuchung des Infiltrats zu sichern (9). Eine Inflammation liegt nach den Empfehlungen der WHO vor, wenn sich ≥ 14 Lymphozyten und Makrophagen pro mm^2 in einer Myokardbiopsie befinden (10). Die Kriterien für die Diagnose einer Myokarditis sind in den Dallas Kriterien aufgelistet, die auf histologischen Ergebnissen basieren. Diese Kriterien schließen die Kategorien akute Myokarditis (eine Entzündung mit Myozytenschaden), die Borderline-Myokarditis (eine Entzündung ohne Myozytenschaden), die persistierende Myokarditis (eine wiederholt bioptisch nachgewiesene Entzündung mit Myozytenschaden), sowie auch Heilungs- und Gesundungsprozesse ein (11).

Die klinischen Symptome reichen von einem asymptomatischen Stadium, bei dem die Diagnose der Myokarditis nur durch EKG-Abnormalitäten der ST-Strecken und T-Wellen diagnostiziert werden kann, über Grippe-ähnliche Symptome und/oder gastrointestinale Beschwerden bis hin zu fulminanten Verläufen mit Arrhythmien, Herzinsuffizienz und Tod (12). Bei Patienten mit fulminanten Myokarditisverläufen zeigte sich, dass dieser Myokarditisverlauf jedoch seltener chronifiziert (13). Ungefähr ein Drittel der Patienten mit einer viralen Myokarditis entwickeln eine chronische

Verlaufsform. Die chronische virale Myokarditis ist mit viraler Persistenz und Entwicklung einer dilatativen Kardiomyopathie assoziiert (14) und wird auch als inflammatorische DCM bezeichnet. Die DCM ist definiert als eine Einschränkung der systolischen Pumpfunktion des rechten und/oder linken Ventrikel, die zu einer zunehmenden Herzvergrößerung führt. Dieser Prozess wird als „Remodeling“ bezeichnet und geht häufig, jedoch nicht zwangsläufig, mit Symptomen einer Herzinsuffizienz einher. Die Patienten klagen über Belastungsdyspnoe, Müdigkeit, Orthopnoe, paroxysmale nächtliche Dyspnoe, periphere Ödeme und Palpitationen (15). Bei den meisten klinisch apparenten Patienten zeigt der inflammatorische DCM-Verlauf eine unaufhaltsame Progredienz (12).

Trotz extensiver Anstrengungen zeigte sich bis jetzt in großen randomisierten Studien kein Therapieansatz als effektiv (12). Zur Zeit richtet sich die supportive Therapie nach den Symptomen und Zeichen der Herzdysfunktion. Die Standardtherapie der Herzinsuffizienz mit Kochsalzrestriktion, Angiotensin-Converting-Enzyme-Hemmern, Diuretika und Digitalis kann eine symptomatische Besserung bewirken (16). Als antivirale und immunmodulierende Behandlung in der Phase der Virusinfektion und Viruspersistenz werden Interferone oder i.v. Immunglobuline eingesetzt (17).

Eine enterovirale RNA wurde in ungefähr 20%-25% aller mit inflammatorischen DCM erkrankten Patienten nachgewiesen (12). Die Prognose der klinisch apparenten inflammatorischen DCM ist ungünstig. Die 5-Jahresüberlebenszeit der mittels Biopsie nachgewiesenen inflammatorischen DCM beträgt nur 50% (14). Die Mehrheit der Patienten, insbesondere diejenige, die älter als 55 Jahre alt sind, sterben innerhalb von drei Jahren nach dem ersten Auftreten der Symptome (13).

Die Mortalität der inflammatorischen DCM ist aufgrund der Limitierung der Therapiemöglichkeiten hoch. Grund hierfür ist das ungenügende Verständnis der Pathogenese der Myokarditis. Mit der Hoffnung in Zukunft wirksamere Therapiemöglichkeiten entwickeln zu können, müssen zuerst die komplexen Interaktionen zwischen der direkten viralen Verletzung und der Immunantwort des Wirtes mit Hilfe von Tiermodellen besser verstanden werden .

1.2 Murine Modelle der Myokarditis

Viel von unserem Verständnis der Pathophysiologie der Entstehung der humanen viralen Myokarditis verdanken wir den Studien mit experimentellen murinen Modellen. Die Maus hat sich zu einem exzellenten und gut definierten Modell für virale Myokarditis entwickelt. Grund hierfür ist die einfache und kosteneffiziente Handhabung, das Vorhandensein von transgenen Linien und ihre Sensitivität zu cardiotropen Viren (14). Vergleiche der Krankheitsprogression und Prognose zwischen verschiedenen Mausstämmen zeigten wie bedeutsam der genetische Hintergrund des Wirtes für die wirtseigene Immunantwort ist.

Die Tübinger Arbeitsgruppe um Karin Klingel zeigte, dass das Coxsackievirus B3 (CVB3) in verschiedenen Mausstämmen unterschiedlich repliziert wird (18). Empfindliche Mäusestämme, wie A.BY/SnJ, entwickeln eine chronische Myokarditis mit dauerhafter Präsenz von viraler RNA im Myokard. Dagegen eliminieren resistendere Mäusestämme, wie C57Bl/6, den Virus nach der frühen akuten Phase der Infektion (19).

Nach der intraperitonealen Injektion von CVB3 repliziert sich dieser im Herz, im Pankreas, in der Milz und im Gehirn der Maus. Dort verursacht er klinische Symptome, die den humanen Erkrankungen ähneln (20-22). Drei pathologische Phasen der Erkrankung wurden charakterisiert und werden im darauffolgendem Kapitel dargestellt (Abb. 1).

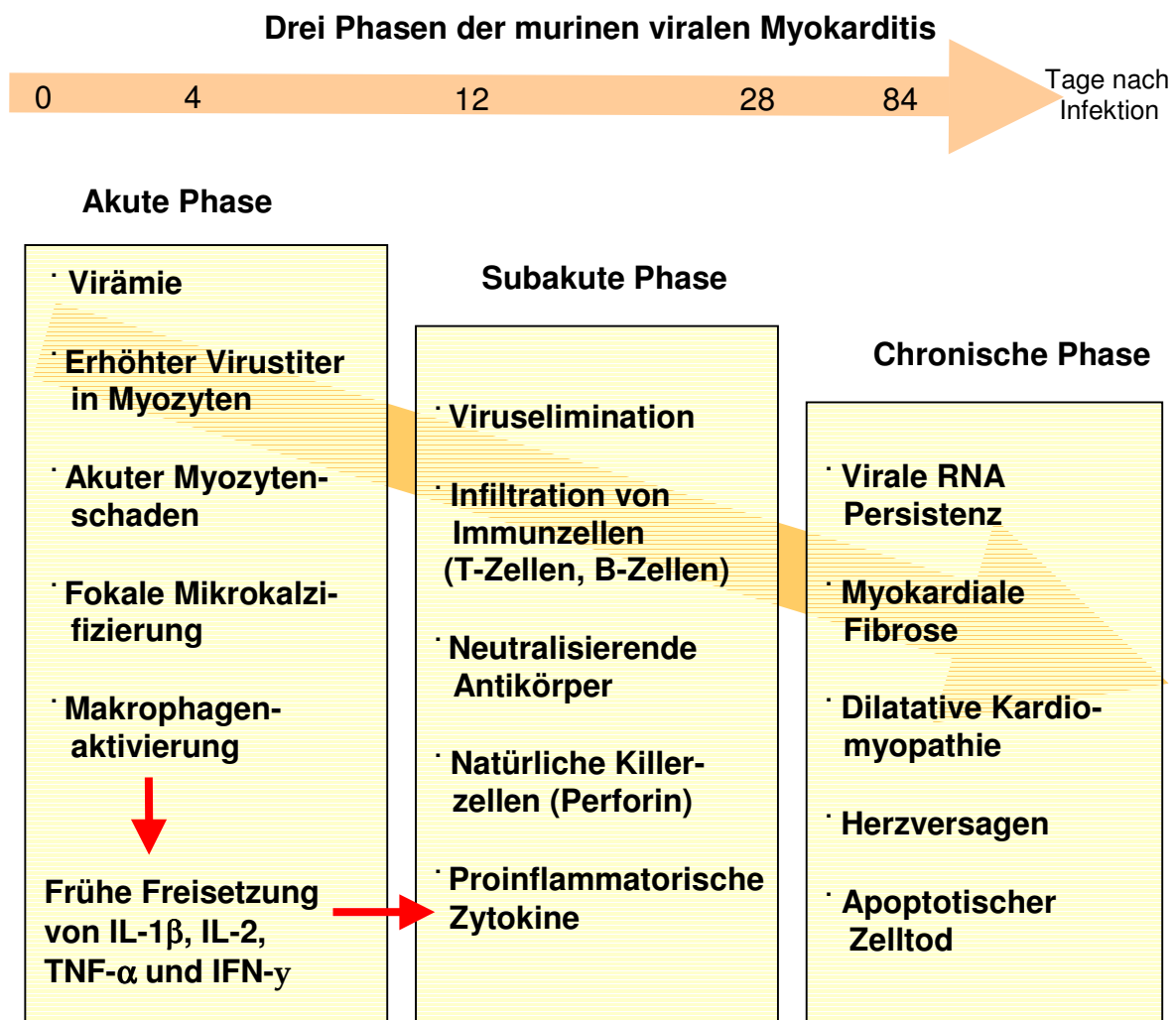
1.3 Murine Virale Infektion

Abbildung 1 zeigt die drei Phasen der murinen viralen Myokarditis mit den Veränderungen in den virusinfizierten murinen Kardiomyozyten.

Während der akuten virämischen Phase (Tag 0 bis Tag 4) befindet sich ein hoher Virustiter im Blut, in der Milz, dem Pankreas und dem Myokard. Starke Virusreplikation innerhalb der ersten drei bis vier Tagen nach der Infektion führt zu einer

virusinduzierten Kardiomyozytenschädigung, fokal sterbenden Myofibern (sowohl nekrotisch als auch apoptotisch), multivesikulärer Vacuolation und einer Kalzifizierung in der Abwesenheit von myokardialen Entzündungsinfiltraten (18, 23). Die myokardiale Expression der Zytokine IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-18, TNF- α , TNF- β und IFN- γ ist bereits vor der Immunzellinfiltration erhöht (bis zu Tag 5 p.i.). Das weist darauf hin, dass diese Zytokine von residenten Zellen des Myokards, wie Kardiomyozyten, Endothelzellen, Fibroblasten und dendritischen Zellen, als Antwort auf den Virus freigesetzt werden (24, 25). Zudem erscheinen neutralisierende Antikörper um den Tag 4 herum, die eine kritische Rolle in der Limitierung der Virusreplikation im Herzen und in anderen Organen spielen (26).

Die subakute Phase (Tag 5 bis Tag 14) beginnt mit der Freisetzung der neu gebildeten Viren ins Interstitium, was die Migration von natürlichen Killerzellen und Makrophagen stimuliert. Dieser ersten Welle von infiltrierenden Zellen folgt ein Anstieg der proinflammatorischer Zytokine und damit eine zweiten Welle von infiltrierenden Immunzellen, wie der antigenspezifischen CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten. In dieser Phase ist die extensive Virusinfektion mit der Entwicklung von multifokalen inflammatorischen Läsionen assoziiert. Bis zum Tag 14 p.i. ist der Virus bei den C57Bl/6 Mäusen eliminiert, während der neutralisierende Antikörpertiter den höchsten Stand erreicht (14, 18). NK-Zellen, aktiviert durch IL-2, töten die virusinfizierten Kardiomyozyten, um die Virusausbreitung zu limitieren (27). Jedoch verschlimmert die Überaktivierung und/oder Langzeitpräsenz der NK den myokardialen Schaden, aufgrund der exzessiven myokardialen Freisetzung von zytotoxischen Molekülen, wie dem Perforin (28). Die Expression proinflammatorischer Zytokine im Herz und im Plasma ist mit einer großen Infiltration von antigenspezifischen T-Lymphozyten assoziiert (25, 29). Die zytotoxischen T-Lymphozyten zielen auf virale Antigene, die auf der Oberfläche von infizierten Kardiomyozyten lokalisiert sind und in Verbindung mit dem MHC-1 Antigen präsentiert werden (30). IFN- γ und TNF- α regulieren hierbei den MHC und das ICAM-1 auf der Oberfläche von infizierten Myozyten hoch und vermitteln dadurch einen angemessenen Zell-Zell-Kontakt zwischen T-Lymphozyten und infizierten Myozyten (31). Die Aktivierung der T-Zellen unterscheidet sich zwischen den verschiedenen Mausstämmen und scheint eine wichtige Determinante der Wirtsempfindlichkeit für virale Myokarditis zu sein (32).

**Abbildung 1**

Drei Phasen der murinen viralen Myokarditis. Dargestellt sind die Veränderungen in den Virusinfizierten murinen Kardiomyozyten abhängig von der Dauer der Infektion (nach 14).

Die chronische Phase der Myokarditis (Tag 15 bis 90 p.i.) beginnt gewöhnlich mit einer kompletten Clearance der Virusbestandteile aus dem Blut und dem peripheren Gewebe. Jedoch können virale RNA und das Kapsidprotein VP1 im Herz, Milz und Lymphknoten überleben (33, 34, 35). Eine fortlaufende Expression von verschiedenen Zytokinen konnte während der chronischen Phase der viralen Myokarditis in humanen und murinen Modellen nachgewiesen werden (36, 37). Die Expression des regulatorischen Zytokin IL-18, des proinflammatorischen Zytokin TNF- α , des immunsuppressiven/fibrogenetischen Zytokin Tumorstromfaktor- β in Mäuseherzen am

Tag 28 und 98 p.i. sind Hinweise auf chronische Entzündungsinfiltrate und auf einen fortlaufenden Wundheilungsprozess im Myokard (38). Zudem kann neben der kontinuierlichen Virusreplikation und Immuneinfiltration ins Herz, der apoptotische Zelltod ein dritter Mechanismus für die Langzeitgewebezzerstörung sein (17). Wie CVB3 die Wirtszelle genau infiziert und die genannten Phasen der Infektion verursacht, wird im folgenden Kapitel erläutert.

1.4 Coxsackievirus B3

Coxsackieviren sind unbehüllte humanpathogene Enteroviren aus der Familie der Picornaviridae. Sie sind omnipräsent, werden sowohl über den fäkal-oralen Weg als auch über Tröpfcheninfektion übertragen und verursachen häufig kleine saisonale Epidemien (39). Es sind vom Coxsackievirus zwei Subtypen bekannt. Vom Coxsackie A Subtyp (CVA) kennt man 23 Serotypen. Diese verursachen hauptsächlich enterale Erkrankungen. Vom Coxsackie B Subtyp (CVB) sind sechs Serotypen bekannt, die mit ernstesten Erkrankungen des Herzens, des Pankreas und des ZNS assoziiert sind, wie die aseptische Meningitis, die Myokarditis, die Pankreatitis und höchstwahrscheinlich den Insulin-abhängigen Diabetes mellitus (Typ 1) (40). Der Serotyp CVB3 wurde mit ungefähr 20%-40% der sporadischen Fälle eines akuten Herzversagens oder einer DCM in Verbindung gebracht (39, 41, 42). Die Inkubationsperiode variiert von einem Tag bis zu zwei bis drei Wochen (40).

Coxsackieviren sind kleine RNA-Viren von kugelförmiger Form (Ikosaeder) mit einem Durchmesser von etwa 30 nm. Das Virion besteht aus einem zentralen RNA-Knäuel und einem außen liegenden Kapsid. Die RNA liegt im Virion als 7.4-kb einzelsträngiges (ss) RNA-Genom mit positiver Polarität vor, die als mRNA während einer Infektion fungiert (43). Voraussetzung für die Infektion von Myozyten ist die Bindung des CVB3 sowohl an das Membranprotein Decay-accelerierender-Faktor (DAF), als auch an den Coxsackievirus- und Adenovirus-Rezeptor (CAR). Der DAF, ein 70 kDa membranständiges Protein, wird stark im humanen Gewebe exprimiert und agiert bei der CVB3-Infektion als Corezeptor (44). Der CAR ist ein transmembranes Protein mit engen Anhaftungsstellen in humanen Epithelzellen (45). Es ist dem Virus nicht möglich, CAR von der apikalen Oberfläche zu erreichen. Der CVB3 benützt eine ausgefeilte Strategie, um Kontakt zum versteckten CAR zu bekommen (46). Hochreguliert liegt

CAR im Herzen von DCM-Patienten vor (47). Dagegen bewirken TNF- α und IFN- γ eine Herabsetzung der CAR-Expression in Endothelzellen (48).

Nach der Bindung an den CAR/DAF Komplex, erfolgt die Virusinternalisation in endocytische Vesikel und die Virus-Entmantelung (Uncoating). Danach dringt die nun freigesetzte virale (+)-Strang RNA ins Cytoplasma. Während der Eklipse, das ist der Zeitraum, währenddessen kein infektiöses Virus in der Zelle nachweisbar ist, erfolgt die Synthese des (-)-Strangs und damit die Replikation der Virusnukleinsäure sowie die Synthese eines großen viralen Polyproteins (49). Dieses neusynthetisierte Polyprotein wird nach und nach mittels viruskodierter Proteasen in die vier viralen Struktur-Kapsidproteine VP1, VP2, VP3 und VP4 und in die sieben viralen nicht-Struktur-Proteasen und -Polymerasen 2A^{pro}, 2B, 2C, 3A, 3B/VPg, 3C^{pro}/3CD^{pro}, 3D^{pol} geteilt (50). Diese bewirken eine Stimulation der viralen Translation (51) und Hemmung vieler zellulärer Transkriptionsfaktoren, was zur Verminderung der Wirtszell mRNA Translation und Proteinsynthese führt (52). Zusätzlich zur immunologisch mediierten Apoptose verursachen auch einige virale Proteasen die Apoptose der Wirtszellen (53), was zu virusinduzierten myokardialen Läsionen führt (54). Die Montage der Viren erfolgt im Zytoplasma. Dann werden die replizierten Viren freigesetzt, um die Infektion weiterzuschüren (55).

In unseren Experimenten verwendeten wir Coxsackie B3 Viren vom Nancy-Typ(56, 57) Die Virulenz des pantropischen CVB3 vom Typ Nancy, ist etwas weniger ausgeprägt als bei anderen CVB3-Varianten, wie z.B. der CVB3 vom Woodruff-Typ, der stark myocardiotrop reagiert und akut schwere myokardiale Läsionen verursacht (58). Ursache für die unterschiedliche Virulenz sind vermutlich Unterschiede in der Nukleotidsequenz (59). Wie das Immunsystem CVB3 erkennt, wird im folgenden Kapitel beschrieben.

1.5 Toll-Like Rezeptoren

Toll-like Rezeptoren (TLR) sind Schlüsselmoleküle des innaten Immunsystems. Sie erkennen virale Nukleinsäuren, bakterielle Bestandteile bzw. Produkte wie LPS, Pilze und Protozoen. Bis jetzt wurden bei der Maus und beim Menschen 13 verschiedenen

TLR identifiziert. Sie sind an Zelloberflächen und in Endosomen lokalisiert. TLR 2, 4, 5 und 11 sind an der Zelloberfläche lokalisiert und erkennen Lipopeptide, LPS, Flagellin und Propellin. Die TLR 3, 7, 8 und 9 sind dagegen auf zytoplasmatischen Vesikeln, wie den Endosomen und dem Endoplasmatischem Retikulum, lokalisiert (60). TLR 3 bindet doppelsträngige (ds) RNA, während TLR 7, 8 und 9 einzelsträngige DNA mit nichtmethylierte CpG-Motiven (Cytosin-Phosphat-Guanosin Motive) und einzelsträngige (ss) RNA erkennen. TLR bestehen aus einer transmembranen Leuzin-reichen Domäne (LRR), die in den extrazellulären Raum bzw. ins Lumen der Endosomen weist, und einer zytoplasmatischen Domäne (TIR), die homolog zum Interleukin-1 Rezeptor ist. Nach Ligandenerkennung aktivieren die TLR intrinsische Signalwege, die zur Phosphorylierung und Aktivierung von Transkriptionsfaktoren führen (61). Bei der CVB3-Infektion werden folgende intrinsischen Signalwege aktiviert:

1. MyD88-abhängiger Weg (Abb.2)

Dieser Signalweg wird vor allem in plasmacytoiden Dendritischen Zellen (pCD) benutzt. Diese Zellen produzieren eine große Menge von Typ 1 IFN als Antwort auf eine virale Infektion (62). Dabei spielt das MyD88 (ein Adaptorprotein der TIR Domäne) eine essentielle Rolle (63). Nach Erkennung der ssRNA des CVB3 durch die TIR-Domäne der TLR 7, 8 und 9, bildet das MyD88-Adaptorprotein einen zytoplasmatischen Komplex mit IRAK 4 (IL-1 Rezeptor-assoziierte Kinase), IRAK 1, TRAF 6 (Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor-assoziiertes Protein), IKK- α (Inhibitor des NF- κ B Kinase) und IRF-7 (Interferon-regulierender Faktor) (64-69). IRAK 1, TRAF 3 und IKK- α führen zur Phosphorylierung von IRF-7 und dadurch zur Translokation des aktivierten IRF-7 in den Nukleus, wo dieser die Expression von Typ 1 IFN bewirkt (68, 64, 65, 69). MyD88, TRAF 6 und IRAK 4 regulieren sowohl die IRF-7 Aktivierung als auch die NF- κ B Aktivierung (70).

2. MyD88-unabhängiger Weg (Abb.3)

Dieser Signalweg erfolgt in gewöhnlichen dendritischen Zellen. Hier wird die Signalkaskade getriggert mit Hilfe des TIR-Adaptorproteins TRIF (71). Nach Erkennung der ds RNA durch den TLR3, assoziiert TRIF mit TRAF 3, TRAF 6, IKK-i, TBK 1 und Rezeptor-interagierendem Protein-1 (RIP1). Aktiviertes TRAF 3, IKK-i und TBK 1 führen zur zytoplasmatischen Phosphorylierung und damit Aktivierung von IRF-3 und IRF-7,

die dann in den Nukleus transportiert werden, wo sie die Transkription von IFN- β bewirken (64, 65). Aktiviertes TRAF 6 und RIP1 bewirken die Aktivierung von NF- κ B, was eine Induktion proinflammatorischer Zytokinen nach sich zieht (72). Dieser Weg spielt eine wichtige Rolle im Hervorrufen einer inflammatorischen Antwort auf eine RNA-Virusinfektion in vivo (73). Dies ist ein notwendiger Prozess für die Induktion der Virus-spezifischen T-Zell-Antwort. Für die IFN-Antwort ist dieser Weg aber um ein Vielfaches ineffektiver als der MyD88-abhängige Weg (70). TLR 4 benutzt sowohl den MyD88-abhängigen Weg als auch den MyD88-unabhängigen Weg (74).

Diese TLR-Signalwege führen zu einer Zytokin- und Interferonausschüttung. Die Funktionen der Zytokine und Interferone werden im folgenden Kapitel erläutert.

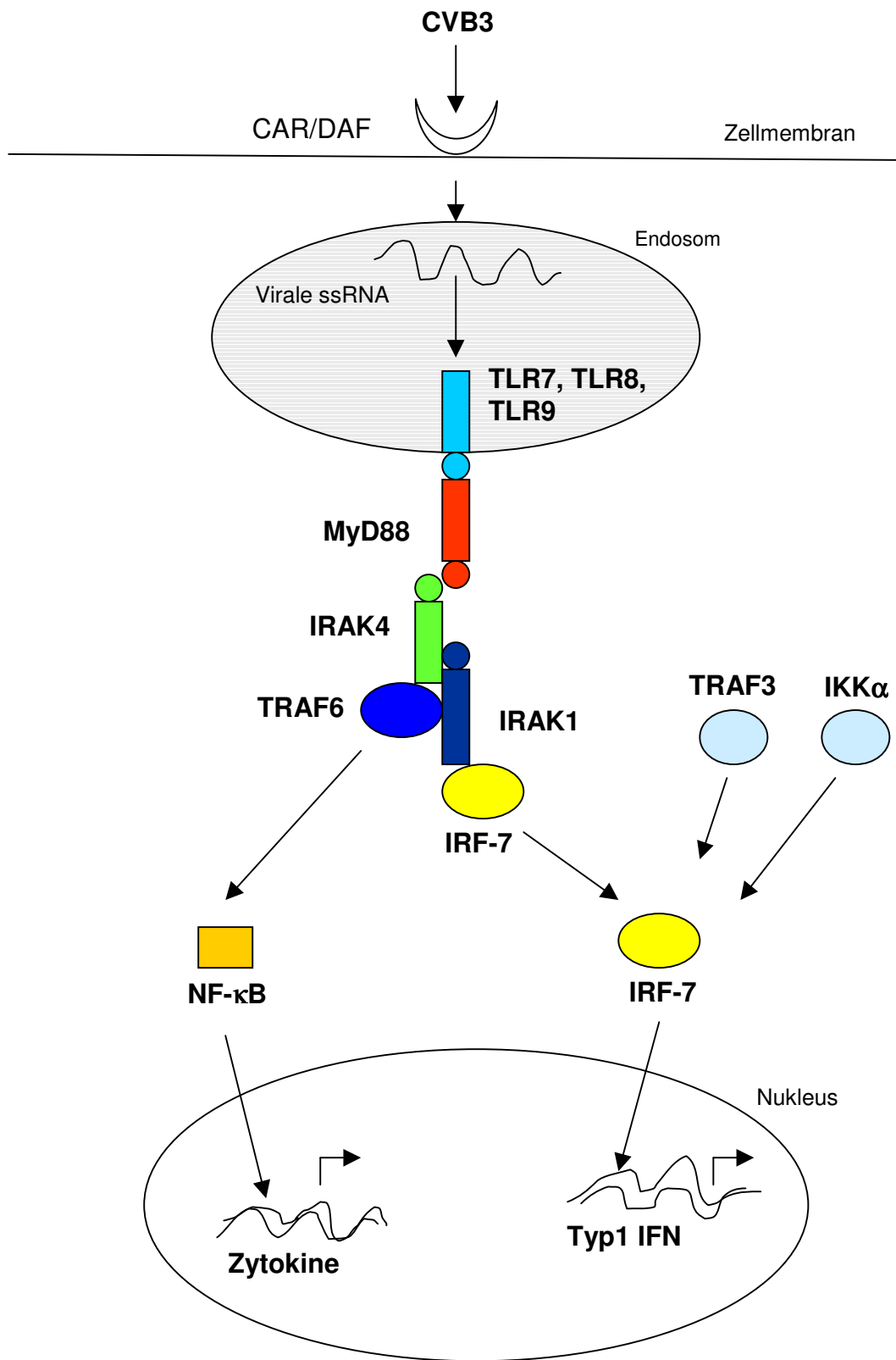


Abbildung 2

MyD88-abhängiger TLR-Signalweg bei einer CVB3-Infektion (nach 74).

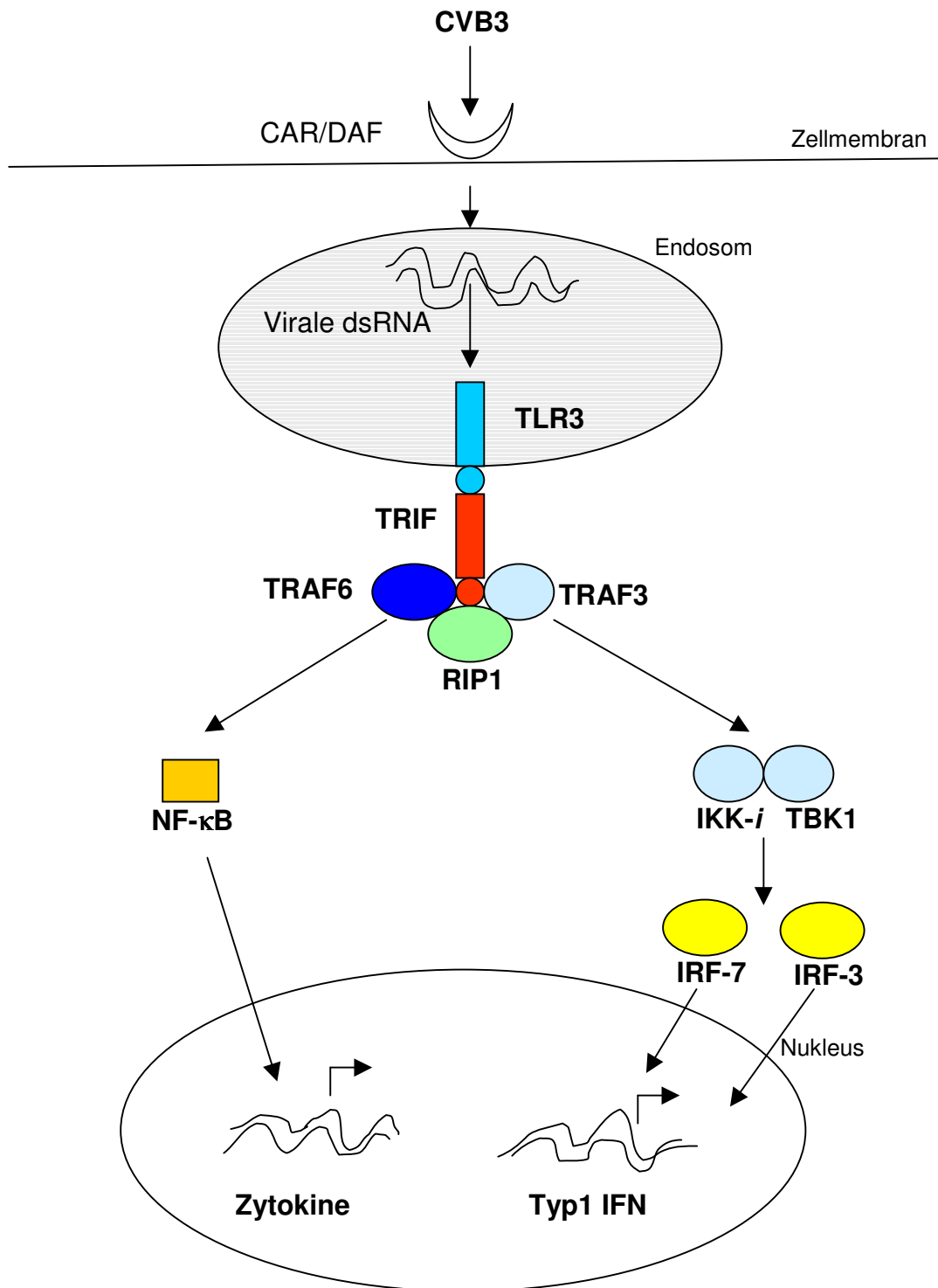


Abbildung 3

MyD88-unabhängiger TLR-Signalweg bei einer CVB3-Infektion (nach 70).

1.6 Interferone

Interferone (IFN) gehören zusammen mit den Interleukinen, koloniestimulierenden Faktoren, Tumornekrosefaktoren und Chemokinen in die Gruppe der Zytokine. Deren Aufgabe ist die Regulierung des Wachstums und der Differenzierung von Zellen. Interferone haben eine immunstimulierende, antitumorale und vor allem antivirale Wirkung. Sie werden in Typ I und Typ II Interferone eingeteilt. Typ I IFN sind IFN- α (mindestens 13 Subtypen) und IFN- β . Typ I IFN werden in virusinfizierten Zellen gebildet und sind Schlüssel-Zytokine der frühen antiviralen Antwort. Typ II IFN ist IFN- γ , das vor allem von aktivierten T-Zellen und NK produziert wird. Alle IFN-Gene befinden sich beim Menschen auf Chromosom 9p und bei der Maus auf Chromosom 4q. Interessanterweise enthalten die Gene für α - und β -Interferone keine Introns. Dies könnte damit zusammenhängen, dass α - und β -IFN in virusbefallenen Zellen gebildet werden, in denen das Spleißen durch die Virusinfektion gestört ist. Nach Virusinfektion kann jede Zelle zur Produktion von Interferon Typ I induziert werden (75). Hauptsächlich wird IFN- α von Leukozyten (insbesondere von Monozyten und Makrophagen) gebildet und Interferon- β von Fibroblasten produziert (76, 77). Die plasmacytoiden dendritischen Zellen spielen eine besondere Rolle bei der IFN Produktion, da sie (im Gegensatz zu den Fibroblasten, Kardiomyozyten und anderen hämatopoietischen Zellen) den TLR- und MyD88-abhängigen Weg der IFN Produktion benutzen, der exklusiv vom IRF-7 kontrolliert wird. Typ I IFN induzieren die Apoptose von virusinfizierten Zellen und leiten die zelluläre Abwehr bei einer viralen Infektion ein. Zudem aktivieren sie natürliche Killerzellen und T-Zellen. Sie induzieren die Maturation der dendritischen Zellen, verstärken die Antikörperantwort in den B-Zellen, vermitteln die CD8⁺-T-Zellantwort und rekrutieren mit Hilfe von Chemokinen Lymphozyten und Monozyten zu den entzündeten Stellen. Damit spielen sie nicht nur eine essentielle Rolle im innate antiviralen Immunsystem, sondern aktivieren auch das adaptive Immunsystem. Sekretiertes Interferon bindet an den IFN- α -Rezeptor, aktiviert diesen und führt somit zur Heterodimerisierung von den Signalübermittlern und Transkriptionsaktivatoren STAT1 und STAT2. Diese bewirken nach Translokation in den Nukleus die Induktion der Transkription von hunderten Effektormolekülen. Eines dieser Effektormolekülen ist der IRF-7, der wiederum eine verstärkte Expression der IFN bewirkt (positiver Feedback-Loop der IRF-7 Expression) (78). Reguliert wird die Expression der Interferone mittels

der Interferon regulierenden Faktoren, die als Transkriptionsfaktoren fungieren. Hierbei spielt das IRF-7 eine herausragende Rolle und wird als der Masterregulator der IFN bezeichnet (79).

1.7 Interferon-regulierende Faktoren

Interferon-regulierende Faktoren (IRF) sind Transkriptionsfaktoren, die die Expression von IFN- α und IFN- β sowie weiterer wichtiger Zielgene (ι NOS, Chemokine, Zytokine) induzieren. Für Mensch und Maus sind jeweils 9 IRFs (IRF-1 bis IRF-9) beschrieben (80). Alle IRFs haben eine starke Homologie der N-terminalen DNA bindenden Domäne (DBD). Diese ist durch Elemente mit 5 Tryptophanwiederholungen charakterisiert, die sich innerhalb der ersten 150 Aminosäuren des Proteins befinden (81). Die IRF DBD vermittelt spezifische Bindungen an GAAA-Sequenzen, die dem *IFN-stimulated response element* (ISRE) ähneln (82). Jeder IRF besitzt eine einzigartige C-terminale Domäne, die IRF-assoziierte Domäne (IAD) genannt wird. Diese IADs sind sowohl für die Interaktion mit anderen Mitgliedern der IRF Familie verantwortlich als auch für die Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren (83). Zum Beispiel besitzt IRF-2 eine inhibitorische Domäne (ID), die die transkriptionale Aktion von IRF-1 reprimiert (84). Auch die Zelltyp spezifische Expression der IRFs und deren Transaktivationspotenzial wird über die IADs reguliert (83). Einige IRFs sind spezifisch für hämatopoetische Zellen (IRF-4, IRF-8) (80), während andere in multiplen Gewebsarten und Zellen exprimiert werden. IRF-5 ist nur im Lymphgewebe mit Ausnahme des Thymus lokalisiert (80). IRF-3 und IRF-7 werden beide konstitutiv exprimiert (85), wobei aber nur die IRF-7 Expression reguliert wird (86). Aktiviert werden die IRFs mittels Phosphorylierung an deren Carboxylende, nachdem der Virus von den TLR erkannt und deren spezifische Signalweg aktiviert wurden. Danach translozieren die aktivierten IRFs vom Zytoplasma in den Nukleus, wo sie die Transkription von ISRE-besitzenden Genen bewirken (80). Die Stabilität der IRF-Proteine ist sehr unterschiedlich (IRF-1 ~ 30min, IRF-2 ~ 8h Halbwertszeit) (87).

Wichtig ist die Kooperation zwischen IRF-3 und IRF-7, die zu einer Verstärkung der antiviralen Antwort führt. Bei der frühen antiviralen Antwort fungiert IRF-3 als

Transkriptionsfaktor der Expression von IFN- β . IFN- β induziert dann, mittels Bindung an den IFN-Rezeptor und Aktivierung der STAT-Moleküle, die Expression von IRF-7, die wiederum die Transkription von Typ I IFN bewirkt. Dieser positive Feed-Back Mechanismus verstärkt die antivirale Antwort (88).

Zusätzlich zu ihrer Funktion in der viralen Abwehr sind die IRFs auch in zahlreiche andere biologische Prozesse involviert. Sie beeinflussen die Zellzyklusregulation, die Apoptose, die Tumorsuppression (IRF-1, IRF-8) und die Onkogenese (IRF-2, IRF-4) (80).

1.8 Interferon regulierender Faktor 7

Der Interferon regulierender Faktor 7 (IRF-7) ist ein Schlüsselmolekül der zellulären Antwort auf eine Virusinfektion. Es wurde deshalb auch als Masterregulator der Interferonexpression bezeichnet (79). IRF-7 beeinflusst das innate und das adaptive Immunsystem während einer Virusinfektion. IRF-7 kontrolliert die systemische Produktion von IFN im Rahmen der innate Immunantwort. Zudem reguliert IRF-7 die lokale Aktion der Interferone, die von den plasmacytoiden dendritischen Zellen des adaptiven Immunsystems gebildet werden (79). Dies zeigt die herausragende Bedeutung des IRF-7 bei der Regulation der antiviralen Abwehr.

IRF-7 wurde kloniert und als Protein identifiziert, das an die Promotoregion des Epstein-Barr-Virus-Nuklearantigens-1 gebunden ist (86). Bis jetzt wurden 8 Isoformen des humanem und murinen IRF-7 beschrieben (IRF-7A bis IRF-7H) (86, 89).

1.8.1 Struktur des IRF-7

Das humane IRF-7 Gen ist auf Chromosom 11 lokalisiert. Die DBD ist am N-terminalen Ende des Proteins lokalisiert. Die Konsensussequenz für die IRF-7 Bindung wurde durch Zufallsselektion als 5'-GAAA/TNC/TGAAANT/C-3' identifiziert (90). Diese Sequenzen sind in funktionellen Promotorelementen Typ I IFN-regulierter Gene enthalten, wie IFN- α 4, - α 7 und - α 14 (86, 89). Die C-terminale Region von IRF-7 besteht aus multiplen Domänen, die als konstitutive Aktivierungsdomäne (CAD), virusaktivierte Domäne (VAD), inhibitorische Domäne (ID) und Antwort-Domäne (RD) bezeichnet werden (91). Die C-terminale Region zwischen den Aminosäuren 468 und 491 ist der

Ort der virusinduzierten Phosphorylierung und damit Aktivierung des IRF-7 (92).
Abbildung 4 zeigt die schematische Struktur des humanem IRF-7 Proteins.

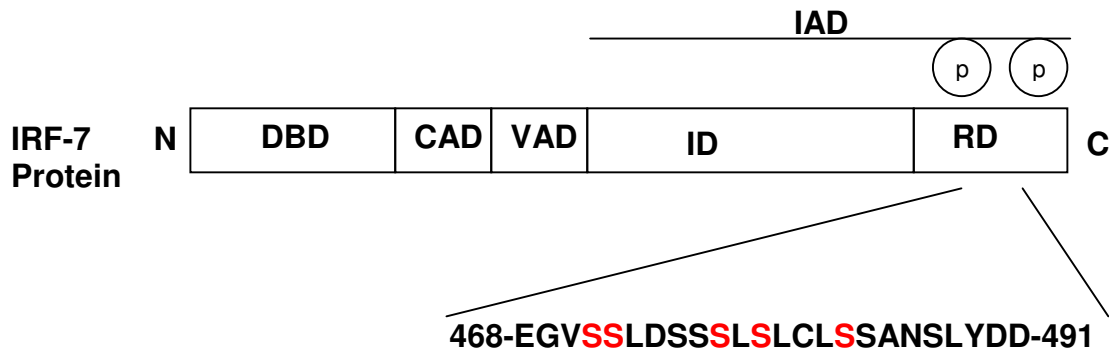


Abbildung 4

Schematische Struktur des humanen IRF-7 Protein mit der Aminosäuresequenz 468-491. Wichtige Serine, die an der virusinduzierten Phosphorylierung beteiligt sind, sind rot dargestellt (nach 83).

Abbildung 5 gibt die schematische Struktur der 8 bekannten murinen IRF-7 Isoformen mit farblich unterschiedlich dargestellten Exone wieder.

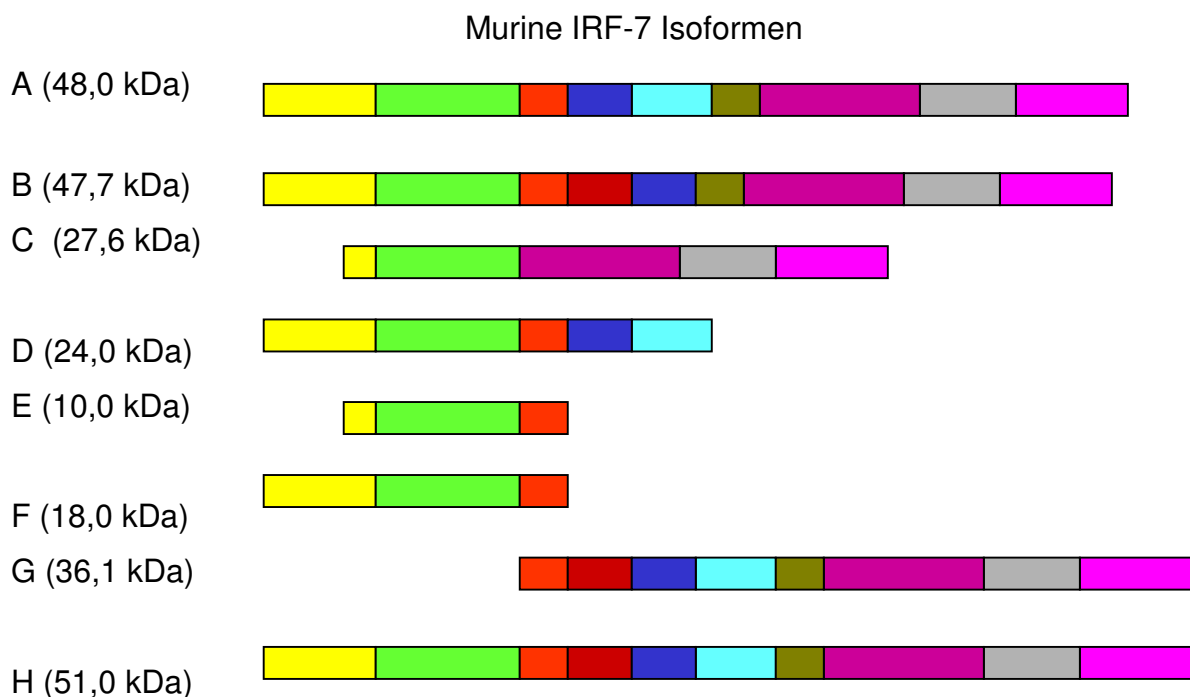


Abbildung 5

Murine IRF-7 Isoformen a bis h mit den farblich markierten Exone (nach 93).

Im Vergleich mit anderen IRFs zeigt IRF-7 eine besonders kurze Halbwertszeit (94). In der bis dato veröffentlichten Literatur konnte IRF-7 als Protein nur in vitro nachgewiesen werden, und hier häufig nur nach Transfektion eines getaggen Fusionsproteins (94, 86).

1.8.2 Regulation der IRF-7 Expression

In den meisten untersuchten Geweben wurde eine basale Expression von IRF-7 mRNA gezeigt. Im lymphoiden Gewebe ist die IRF-7 Expression am stärksten. Im Unterschied zu IRF-3 ist die IRF-7 mRNA Expression induzierbar (86, 89). Die Regulation der IRF-7 mRNA Expression erfolgt auf zwei Ebenen. Die IRF-7 Expression wird auf der Ebene der IRF7 mRNA Transkription kontrolliert. Zudem erfolgt eine Regulation im Rahmen der Aktivierung des IRF-7 Proteins. Vor allem virale Nukleinsäuren, LPS und INF steigern die IRF-7 Expression. IFN bindet an den IFN-Rezeptor und führt somit zur Aktivierung von ISGF3, einem Komplex aus STAT 1, STAT 2 und dem Protein p48. ISGF3 induziert die Expression von IRF-7 mRNA. $\text{TNF}\alpha$, TRAF3, IKK- ι , IKK- α , TBK, NF- κ B, IFN- α , INF- β und STAT-Moleküle wirken als Induktoren der IRF-7 mRNA Expression (95) (Abb. 2 und 3). Chemische Reagenzien wie Butyrat oder der Phorbolster TPA (89) sowie biologische Agenzien wie das EBV-kodierte latente Membranprotein 1 (LMP-1) können die Expression der IRF-7 mRNA induzieren (96).

Posttranslational wird die IRF-7 Aktivierung durch Phosphorylierung mit nachfolgender nuklearer Translokation geregelt. Aber auch DNA-schädigende Agenzien, wie UV-Licht, und LMP-1 können IRF-7 Protein phosphorylieren (89). Andererseits können verschiedene virale Gene (HHV-8 vIRF-3, Vaccinia Virus E3L, Influenza Virus NS1, HHV-8 ORF-45) die Aktivierung von IRF-7 Protein blockieren (97, 98, 99) .

1.8.3 Funktion des IRF-7

Abbildung 6 zeigt kurz zusammenfassend den IFN/Virus vermittelten Signalweg des IRF-7.

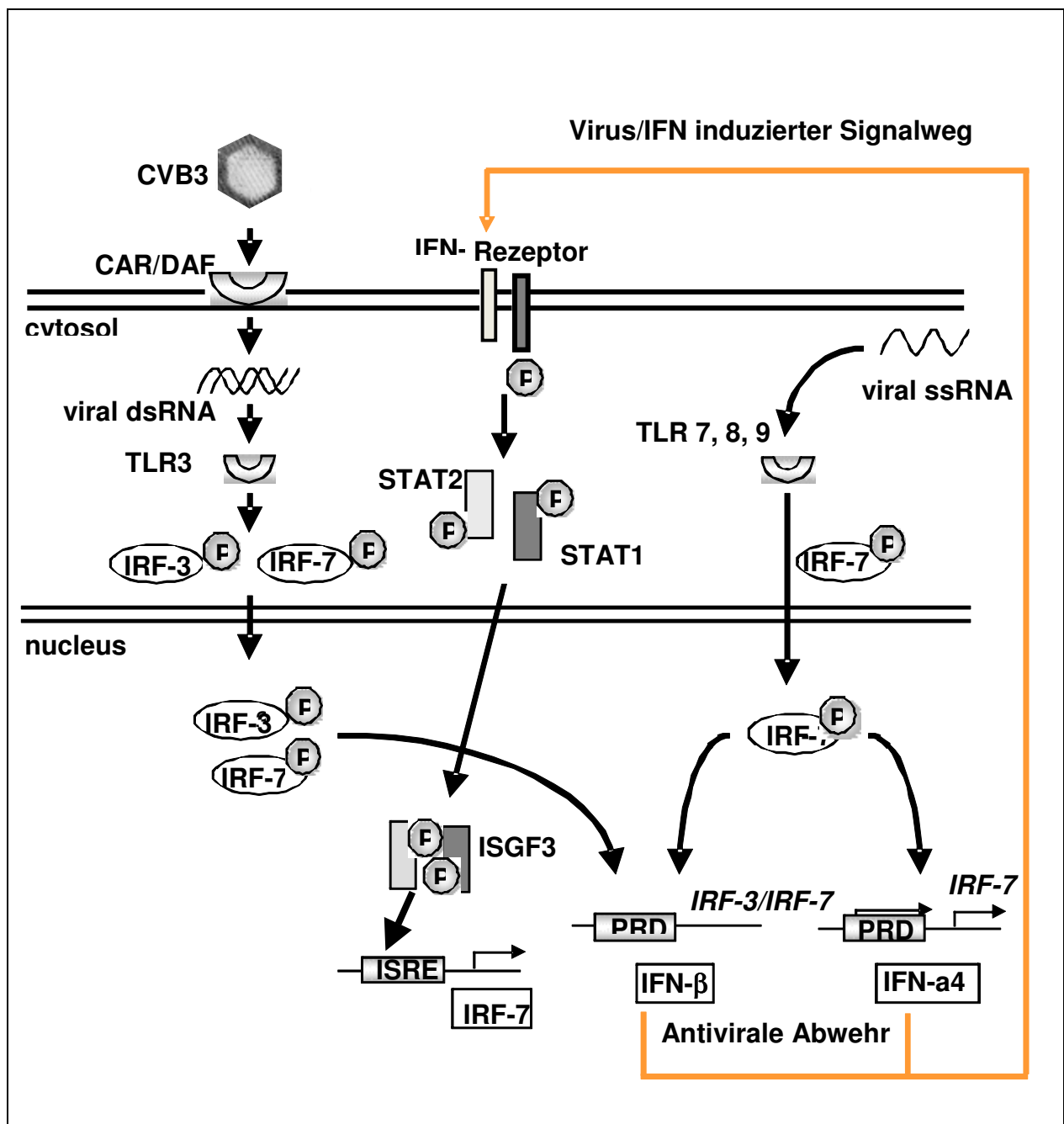


Abbildung 6

Virus/IFN induzierter IRF-7 Signalweg (nach 100).

1.9 Fragestellung dieser Arbeit

In dieser Arbeit wurde im Zeitverlauf nach CVB3-Infektion die kardiale Expression von IRF-7 auf der mRNA-Ebene untersucht. Die Hypothese war, dass im Modell der akuten Myokarditis der C57/Bl6 Maus die IRF-7 Expression stärker induziert wird als im Modell der chronischen Myokarditis der A.BY Maus. Hierzu mußte ein quantitativer Assay zur Bestimmung der kardialen IRF-7 mRNA etabliert werden.

2. Versuchstiere und Material

2.1 Versuchstiere

Verwendet wurden Mäuse der Stämme A.BY und C57Bl/6. Vier Wochen alte A.BY und C57Bl/6 Mäuse wurden im Institut für molekulare Pathologie der Universität Tübingen mit 5×10^4 pfu CVB3 des Stamms Nancy i.p. infiziert. Die Mäuse wurden im 12 h Tag-Nacht-Zyklus gehalten und bekamen Standardfutter und Wasser *ad libitum*. Die Experimente waren durch die zuständige Tierschutzbehörde genehmigt (Tiergenehmigungsnummer: PA 1/04, Regierungspräsidium Tübingen).

2.2 Materialien

2.2.1 Chemikalien

Agarose	Cambrex Bio Science, Wiesbaden, Deutschland
Ethidiumbromid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Isofluran	Abbott, Karlsruhe, Deutschland
DNTPs	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
Tris-HCL	Merck, Darmstadt, Deutschland
Borsäure	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
EDTA	Sigma-Aldrich Chemie, München, Deutschland
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt, Deutschland
Bacto™ Agar	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
100 bp DNA Marker	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Trizol	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Chloroform	Sigma-Aldrich Chemie, München, Deutschland
Isopropanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Hot Start-Taq-Polymerase	Qiagen, Hilden, Deutschland
SuperScript II-Polymerase	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Q-Solution	Qiagen, Hilden, Deutschland
Polysucrose 400 (Ficoll 400)	Pharmacia, Erlangen, Deutschland
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland

RNase ZAP	Bio Products, Köln, Deutschland
Dithiothreitol	Sigma-Aldrich Chemie, München, Deutschland
Rnasin	Sigma-Aldrich Chemie, München, Deutschland
Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie, München, Deutschland
DNA-Leiter	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Enfluran	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ampicillin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
LB-Medium	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
X-Gal	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

2.2.2 Primer

Forward Primer für IRF-7

BW fwd	5'-gga gga gtt tcg ggc tcg ga-3'
BWn fwd	5'-gcg gca agg gtc acc aca ct-3'
BW3 fwd	5'-gag acg ctt ctc cag cat gtg t-3'

Backward Primer für IRF-7

BW bwd	5'-ggc cac tga ccc agg tcc at-3'
BWn bwd	5'-cgt aga gac tgt tgg tgc tag a-3'
BW3 bwd	5'-gc ggt tgc gct cca gca gct-3'

Forward Primer für 18S

18S fwd	5'-cct gcg gct taa ttt gac tca aca-3'
---------	---------------------------------------

Backward Primer für 18S

18S bwd	5'-cac caa cta aga acg gcc atg ca-3'
---------	--------------------------------------

Diese Primer wurden von der Firma TIB MolBiol, Berlin, Deutschland synthetisiert.

Primer für Vektor <i>pGEM-T easy</i>	Promega, Mannheim, Deutschland
Random hexamer Primer für RT	Roche, Mannheim, Deutschland

2.2.3 Lösungen, Puffer, Medien

TBE	0,1 M Tris-HCL, 0,1 M Borsäure, 3 mM EDTA (pH 8,0)
Ficoll-Puffer	15 g Ficoll, 100 ml 1xTBE-Puffer, 1 ml Bromphenolblau
LB-Agar	1,5 g Bacto-Agar, 100 ml LB-Medium, autoklavieren, Lagerung bei 4 °C

2.2.4 Kits

SuperScript II Reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
RNeasy Mini Kit	QIAGEN, Hilden, Deutschland
RNase free DNase Set	QIAGEN, Hilden, Deutschland
RNA 6000 Nano Kit	Agilent, Waldbronn, Deutschland
PCR-Kit	QIAGEN, Hilden, Deutschland
TaqMan-Kit Quanti Tect	QIAGEN, Hilden, Deutschland
pGEM-T Easy Vector System	Promega, Mannheim, Deutschland
QIAprep Miniprep	QIAGEN, Hilden, Deutschland

2.2.5 Prokaryonte Zellen

Subcloning DH5a (<i>E.coli</i>)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
-----------------------------------	------------------------------------

2.2.6 Verbrauchsmaterialien

Reaktionsgeräte	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
96-Well Platte	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Einmalskalpelle	Braun, Melsungen, Deutschland
Petrischalen	Greiner, Nürtingen, Deutschland

2.2.7 Geräte

Photometer	Shimadzu, Duisburg, Deutschland
NanoDrop	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
PCR-Gerät	MJ Research, Watertown, USA
TaqMan	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Bioanalyzer	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
ABI Prism 7000	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Geldokumentationssystem 5000	Ultra-Violet Products, Cambridge, UK

Heizblock	Thermo-Dux, Wertheim, Deutschland
Vortexer	Janke & Kunkel, Staufen, Deutschland
Zentrifuge	Heraeus, Hanau, Deutschland
Minizentrifuge	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Teflon-Glas-Homogenisator	Braun, Melsungen, Deutschland

2.2.8 Software

NanoDrop 2000	NanoDrop Products, Wilmington, USA
Bioanalyzer 2100 Expert	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
TaqMan 7500	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
SPSS Version 16	SPSS, Chicago, USA
GraphPad Prism 3.0	GraphPad Software, La Jolla, USA

3. Methoden

3.1 Entnahme und Konservierung muriner Organe

Die Versuchstiere wurden mit Isofluran/Enfluran narkotisiert und mittels Genickbruch getötet. Herz, Milz, Leber und Pankreas wurden entnommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Aufarbeitung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Vor der Kryokonservierung wurde aus jedem Herz ein Gewebesegment entnommen und für histologische Untersuchungen in Paraffin eingebettet.

3.2 Einteilung der kardialen histopathologischen Veränderungen

Kardiale Paraffinschnitte von CVB3-infizierten A.BY und C57Bl/6 Mäusen und nicht infizierten Kontrollmäusen wurden an Tag 4, 8, 12 und 28 p.i. von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. med. K. Klingel in der Abteilung für Molekulare Pathologie, Institut für Pathologie am Universitätsklinikum Tübingen untersucht.

Die histopathologischen Befunde wurden nach Schweregrad der kardialen Schädigung und Entzündung eingeteilt (101):

Grad 0: Keine Myokardschädigung, keine Entzündungszellen

Grad 1a: Einzelne Myozytolysen und einzelne mononukleäre Entzündungszellen

Grad 1b: Kleine Herde an Fibrose und evtl. einzelne mononukleäre Entzündungszellen

Grad 2: Kleine Herde an Myozytolysen und einige wenige kleine Herde an Entzündungszellen

Grad 3: Viele Myozytolysen diffus und große Herde an Entzündungszellen

Grad 4: Großflächige Nekrosen und ausgeprägte Entzündungszellinfiltration über beide Ventrikel

Die Kontrollproben zeigten keine pathologischen Veränderungen (Grad 0). Im Gegensatz dazu zeigten CVB3-infizierten Proben von A.BY und C57Bl/6 Mäusen im zeitlichen Verlauf histopathologische Veränderungen, deren Einteilung gemäß oben genannter Gradierung erfolgte (101):

A.BY

Tag 4 pi	Grad 2
Tag 8 pi	Grad 4
Tag 12 pi	Grad 4
Tag 28 pi	Grad 4

C57Bl/6

Tag 4 pi	Grad 1a
Tag 8 pi	Grad 2, 2-3
Tag 12 pi	Grad 1a, 2
Tag 28 pi	Grad 1b

Bis zum Tag 8 nach CVB3-Infektion konnte bei beiden Modellen ein Anstieg der kardialen Schädigung und Entzündung festgestellt werden. Beim Modell der C57Bl/6 Maus fiel der Grad der histopathologischen Veränderung vom Tag 8 bis zu Tag 28 nach CVB3-Infektion wieder ab. Im Modell der A.BY Maus blieben ab Tag 8 bis zum Tag 28 nach CVB3-Infektion sämtliche Anzeichen einer pathologischen Veränderung deutlich erhöht. Die histopathologischen Veränderungen waren zu allen Zeitpunkten der CVB3-Infektion im Modell der A.BY Maus stärker als im Modell der C57Bl/6 Maus.

Die in dieser Arbeit untersuchten kardialen RNA-Proben stammen aus den oben genannten Infektionsversuchen.

3.3 Isolierung der RNA

Um Gesamt-RNA zu isolieren wurde murines Herzmuskelgewebe (je ca. 100 mg) in Trizol (pro 50-100 mg Organgewicht mindestens 1 ml Trizol) gegeben und vermischt. Dadurch können Zellen zerstört und Zellbestandteile gelöst werden, ohne dabei die RNA zu schädigen. Danach wurde das Gemisch mittels des Potters homogenisiert. Nach einer 5 minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur, wurde pro 1 ml Trizol 0,2

ml Chloroform zugegeben, 15 s per Hand gründlich geschüttelt und nochmals 2-3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 15 minütiger Zentrifugation bei 12.000 g und 4 °C, wurde die wässrige RNA-haltige Phase gewonnen, während die organische DNA- und Protein-haltige Phase verworfen wurde. Die RNA wurde mit 0,5 ml Isopropanol präzipitiert, gevortext, 10 min inkubiert und 10 Minuten bei 12.000 g und 4 °C zentrifugiert. Jetzt wurde die RNA als gelähnliches Pellet am Boden des Reaktionsgefäß sichtbar. Der Überstand wurde verworfen. Die RNA wurde mit 75 % Ethanol durch Vortexen gewaschen und nach 5 minütiger Zentrifugation bei 7.500 g und 4 °C wurde der Überstand vorsichtig abgegossen. Dieses RNA-Pellet wurde dann 5 min an Luft getrocknet, aber nicht vollständig, da ansonsten die RNA unlöslich werden würde. Anschließend wurde die RNA in 100 µl RNase-freiem Wasser gelöst und bis zum weiteren Gebrauch bei -80 °C gelagert.

3.4 RNA-Reinheitskontrolle

Um nachzuweisen, dass unsere isolierte RNA nicht mit Proteinen und/oder DNA verunreinigt ist, wurde eine RNA-Reinheitskontrolle mittels Photometer und Nano Drop durchgeführt.

3.4.1 Photometer

Das Messprinzip des Photometers liegt in der Absorption von Licht bei einer bestimmten Wellenlänge. Die Extinktion wird gemessen und anhand der Differenz kann die Absorption errechnet werden. Die Reinheit der isolierten RNA wird durch den Quotienten aus den Absorptionen bei $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ abgeschätzt. Ein Quotient kleiner als 1,65 deutet auf eine Protein-Kontamination hin. Dagegen zeigt ein Quotient zwischen 1,65 und 2,2 eine ausreichende Reinheit der isolierten RNA an. Im Idealfall sollte der Quotient 1,8 betragen. Höhere Werte als 2,2 deuten auf eine DNA-Verunreinigung hin.

3.4.2 Nano Drop

Das Messprinzip des Nano-Drop entspricht dem des Photometers. Es wird mit der zu untersuchenden Substanz eine Wassersäule erzeugt, dann die Extinktion des Lichts bei einer bestimmten Wellenlänge gemessen. Der Nachweis für die Verunreinigung mit DNA erfolgt anhand einer charakteristischen Absorptionskurve für DNA, die ein Maximum bei 260 nm aufweist.

3.5 RNA-Qualitätsanalysen

Die Qualität, das heißt die Integrität der isolierten RNA, kann mittels der Gelelektrophorese und des Bioanalyzers gemessen werden. Dabei wird geprüft, wie integer die RNA ist und untersucht ob schon Abbauprodukte der RNA vorhanden sind.

3.5.1 Gelelektrophorese

Die Integrität der isolierten RNA kann durch Gelelektrophorese verifiziert werden. 5 µl isolierter RNA wurden mit 5 µl Ficoll vermischt und auf ein 2 % Agarosegel mit 3 µl Ethidiumbromid (1 µg/ml) aufgetragen und bei 90 V aufgetrennt. Als Laufpuffer diente TBE. Als Längenstandard diente der 100 bp Marker. Die (negativ geladenen) RNA-Fragmente wandern im Gel mit einer Geschwindigkeit umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Größe im elektrischen Feld zum positiven Pol (Anode). Bromphenol gibt einen optischen Anhaltspunkt für den Fortschritt der Elektrophorese. Das im Gel enthaltene Ethidiumbromid lagert sich in die RNA-Doppelhelix ein. Es kann mit UV-Licht angeregt und somit die RNA indirekt sichtbar gemacht werden. Die Banden wurden anschließend unter UV-Licht visualisiert. Hinweise für die weitgehende Integrität der RNA sind eine 28S-RNA-Bande, die im Vergleich zur 18S-RNA-Bande etwa doppelt so intensiv erscheint. Auch die scharfe Abgrenzbarkeit der rRNA-Banden sind Zeichen einer intakten RNA. Auf Fragmentierung der RNA, das heißt schon abgebaute RNA, weisen Schmierspuren im Gel hin.

3.5.2 Bioanalyzer

Das Messprinzip des Bioanalyzers ähnelt dem der Gelelektrophorese. Ein elektrisches Feld wird angelegt. Die RNA (negativ geladen) wandert von Kathode (Minuspol) zur Anode (Pluspol). Dabei entspricht die Leiter dem Marker. Sie misst die Zeit und die Menge der RNA. Die Dye-Konzentration ist ein Äquivalent zum Ethidiumbromid, lagert sich in Sekundärstrukturen der RNA ein, wird durch Licht angeregt und fluoresziert. Der Marker zeigt den Beginn einer Probe an. Wir führten die RNA-Quantifizierung mittels des „RNA 6000 Nano Kit“ nach Herstellerprotokoll durch. 28S und 18S ribosomale RNAs werden scharf abgrenzbar dargestellt. Die RIN (RNA integrity number) gibt die Integrität der RNA an und variiert von 10 (höchste Integrität) bis 1 (abgebaute RNA).

3.6 RNA-Quantitätsbestimmung

Die optische Dichte bei 260 nm entspricht 1 bei einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml. Folglich wird die Konzentration der RNA nach folgender Formel errechnet:

$$40 \text{ µg/ml} \times \text{OD } 260 \text{ nm} \times \text{Verdünnungsfaktor.}$$

Dieser Formel unterliegt die RNA-Quantitätsbestimmung beim Photometer und beim Nano Drop. Auch der Bioanalyser liefert genaue RNA-Quantitätsbestimmungen.

3.7 DNA-Verdau

Um noch verbliebene DNA-Kontaminationen zu beseitigen wurde ein DNA-Verdau Trizol-isolierter RNA mit RNeasy Mini Kit (QIAGEN) und RNase free DNase Set (QIAGEN) nach Herstellerprotokoll durchgeführt (Tabelle 1). Dabei wird β-Mercaptoethanol zur RNA-Stabilisierung verwendet, das sich an Disulfid-Brücken von Proteinen anlagert. Dadurch hemmt es Enzyme, die ansonsten die RNA abbauen würden. Um die sehr temperaturanfälligen RNA-Proben zu schützen, wurden alle Proben während des Versuchs auf Eis gelagert.

X μ l	=5 μ g RNA	Inkubation im Wasserbad:
2,50 μ l	10 x RQ1-Puffer	1. 37 °C, 15 min
1,25 μ l	MgCl ₂ (50 mM)	2. 65 °C, 10 min
0,25 μ l	DNase RQ1	
DEPC-H ₂ O ad 25 μ l		

Tabelle 1

Ansatz des DNA-Verdau.

3.8 Reverse Transkription

Reverse Transkription bedeutet das Überschreiben der genetischen Information eines RNA-Genoms in eine komplementäre DNA (cDNA) mittels einer reversen Transkriptase. Das ist eine DNA-Polymerase, die mit Hilfe ihrer reversen Transkriptaseaktivität und dem Random Hexamer Primer, die RNA in 5´-3´Richtung zur cDNA transkribiert. Der Random Hexamer Primer besteht aus einer Mischung von Oligonukleotiden, die alle möglichen Sequenzen für ein Hexamer repräsentieren. Danach erfolgt die Vervollständigung des einzelsträngigen cDNA-Stranges zum doppelsträngigen Strang. Man spricht von reverser, also umgekehrter Transkription, da es sich um genetische Informationsüberschreibung in umgekehrter Richtung im Vergleich zur Mehrzahl zellulärer Transkriptionsvorgänge handelt.

Zur Denaturierung von Sekundärstrukturen der RNA werden 10 μ l RNA (verdünnt nach DNA-Verdau auf 40 ng/ μ l) mit 1 μ l dNTP und 1 μ l Random Hexamer Primer bei 65 °C 5 Minuten lang inkubiert. Zum Annealing der Random-Hexamer-Primer werden 4 μ l First Strand Puffer, 2 μ l DTT und 1 μ l RNasin dazugegeben. DTT lagert sich an Disulfid-Brücken von Proteinen und hemmt dadurch Enzyme, die für den Abbau der RNA zuständig sind und RNasin zerstört RNasen. Nach dem Mischen wird das Gemisch 2 Minuten lang bei 25 °C inkubiert. Danach wird 1 μ l SuperScript II-Polymerase zugegeben und vorsichtig vermischt. Jetzt erfolgt 50 Minuten lang bei 42 °C das Annealing und die Elongation. Die Reverse Transkriptase wird 10 Minuten lang bei 70 °C inaktiviert. Und mit einer 5minütigen Kühlung bei 4 °C wird die Reverse Transkription abgeschlossen.

10 µl RNA	Reaktionsbedingungen:
1 µl dNTP	1. 65 °C, 5 min
1 µl Random Hexamer Primer	2. 25 °C, 2 min
4 µl First Strand Puffer	3. 42 °C, 50 min
2 µl DTT	4. 70 °C, 10 min
1 µl Rnasin	5. 4 °C, 5 min
1 µl SuperScript II-Polymerase	

Tabelle 2

Ansatz und Programm der Reversen Transkription.

Es wurden 12 Serien (unabhängige Ansätze) von cDNA-Synthesen hergestellt. Jede Serie enthält cDNA der Tage 0, 4, 8, 12 und 28 nach CVB3-Infektion für A.BY Mäuse und für C57Bl/6 Mäuse.

3.9 Primerdesign

Zur Auswahl der Nukleotidsequenz der einzelnen Primer wurde eine detaillierte Datenbankrecherche nach den publizierten genomischen bzw. cDNA-Sequenzen in der Gendatenbank auf dem Server des National Center for Biotechnology (NCBI) durchgeführt. Es wurden computergestützt Primerpaare ermittelt, die folgende Kriterien erfüllten:

1. Die Primerlänge liegt zwischen 20 und 25 bp.
2. Die Primersequenzen sind spezifisch für die interessierende cDNA ohne Kreuzreaktivität mit anderen Sequenzen.
3. Die Primer überspannen mindestens ein Intron, so dass eine Amplifikation aus genomischer DNA entweder nicht stattfindet oder eine Bande größerer Länge produziert.
4. Die Ausbildung von Sekundärstrukturen innerhalb eines Primers ist minimal.

5. Die gegenseitige Bindung der Primer (Primer-Dimer-Formation) ist minimal, wobei insbesondere Komplementaritäten am 3'-Ende vermieden werden.
6. Die optimale Annealing-Temperatur beider Primer eines Paares ist ungefähr gleich, wobei darauf geachtet wurde, dass das Verhältnis von [Adenin + Thymin] / [Cytosin + Guanosin] ungefähr 1:2 ist (2+4 Regel). Die Annealing-Temperatur wird abgeschätzt: $2 \times (\text{Adenin} + \text{Thymin}) + 4 \times (\text{Guanosin} + \text{Cytosin})$.

3.10 Amplifizierung von DNA mittels PCR

Zur Vervielfältigung der aus der Reversen Transkription gewonnenen cDNA führten wir Polymerasekettenreaktionen (PCR) durch. Dabei amplifizierten wir zu jeder PCR eine Negativkontrolle mit. Diese bestand aus einem Reversen Transkriptions-Ansatz ohne Zugabe der Reversen Transkriptase, um mögliche DNA-Kontaminationen ausschließen zu können. Zusätzlich erfolgte auch zu jeder PCR eine H₂O Probe, der statt cDNA die entsprechende Menge an PCR-Puffer zugegeben wurde, um falsch positive PCR-Banden zu ermitteln. Zur Qualitätskontrolle der PCR wurde für alle IRF-7 PCR 18S als endogener Standard benutzt. Dieses Gen 18S, auch Housekeeping-Gen genannt, wird unabhängig von Zelltyp, Zellstadium und äußeren Einflüssen exprimiert, im Gegensatz zu den regulierten Genen, wie das IRF-7 Gen. Dadurch können Messfehler bei der Quantifizierung und Ungenauigkeiten beim Pipettieren durch Abgleich der Ergebnisse mit dem Housekeeping-Gen ausgeglichen werden.

Das Reaktionsprinzip der PCR ähnelt der Replikation der DNA in der Zelle. Ausgehend von einer DNA-Matrize und einem spezifischen Primerpaar, das an den sense- bzw. antisense-Strang hybridisiert, wird die von den Primern flankierte Sequenz exponentiell amplifiziert. Die gesamte Reaktion basiert auf vier Teilschritten bei jeweils unterschiedlichen Temperaturen. Im ersten Schritt wird die Taq-Polymerase bei 95 °C aktiviert. Im zweiten Schritt, der Denaturierung (ca. 94 °C), wird die DNA in Einzelstränge aufgetrennt. Beim Annealing, dem dritten Schritt, hybridisieren die Oligonukleotid-Primer mit den beiden Matrizensträngen und dienen der DNA-Polymerase im vierten Schritt, der Elongation (ca. 72 °C), als Startmoleküle. Die Annealing-Temperatur wird anhand der „2+4“-Regel errechnet. Dabei gilt: A/T Paar=2 °C, G/C=4 °C. Dieser Zyklus wird je nach Reaktion 28 - 40 mal wiederholt, abhängig

davon nach wie vielen Zyklen der Peak erreicht wird, in dem Amplifizierungen exponentiell stattfinden. In dieser Kettenreaktion wird das gewünschte DNA-Fragment millionenfach amplifiziert. Die Taq-DNA-Polymerase stammt aus einem *E.coli*-Stamm, der ein Plasmid mit dem klonierten Gen der *Thermus aquaticus*-DNA-Polymerase trägt. Diese hitzestabile DNA-Polymerase hat die PCR sehr vereinfacht und verbessert. Das Bakterium *Thermus aquaticus* lebt im Wasser bei einer Temperatur von 75 °C. Seine DNA-Polymerase (Taq-Polymerase) hat ein Temperaturoptimum von 72 °C und ist selbst bei der Denaturierungstemperatur von ca. 94 °C noch stabil (Tabelle 3 und 4). Zum Testen der richtigen Zykluszahl für die IRF-7 PCR wird eine PCR mit festgelegter Endzyklenzahl von 40 Zyklen durchgeführt. Dabei wird während der Amplifikation jeweils alle zwei Zyklen – beginnend von einer mittleren Zykluszahl aus - eine Probe dem Gerät entnommen. Anschließend erfolgt eine Auswertung der Amplifikate mittels Gelelektrophorese.

IRF-7 PCR Ansatz	IRF-7 PCR Programm	
1 µl cDNA	Schritt 1: 95 °C	15 min
1 µl IRF-7 BW3 fwd-Primer	Schritt 2: 94 °C	1 min
1 µl IRF-7 BW3 bwd-Primer	Schritt 3: 66 °C	1 min
0,5 µl dNTP-Mix	Schritt 4: 72 °C	1 min
0,25 µl Hot Start-Taq-Polymerase	Schritt 5: 36 x Schleife Schritt 2-4	
2,5 µl 10xPCR-Puffer	Schritt 6: 72 °C	10 min
5 µl 5xQ-Solution	Schritt 7: 4°C	5 min
13,7 5µl H2O		

Tabelle 3

Ansatz und Programm der IRF-7 PCR.

18S PCR Ansatz	18S PCR Programm	
1 µl cDNA	Schritt 1: 95 °C	15 min
1 µl 18S fwd-Primer	Schritt 2: 94 °C	30 s
1 µl 18S bwd-Primer	Schritt 3: 68 °C	45 s
0,5 µl dNTP-Mix	Schritt 4: 72 °C	45 s
0,25 µl Hot Start-Taq-Polymerase	Schritt 5: 28 x Schleife Schritt 2-4	
2,5 µl 10xPCR-Puffer	Schritt 6: 72 °C	10 min
5 µl 5xQ-Solution	Schritt 7: 4 °C	5 min
13,75 µl H ₂ O		

Tabelle 4

Ansatz und Programm der 18S-PCR.

3.11 Nachweis amplifizierter DNA mittels Gelelektrophorese

Zur Analyse restringierter oder amplifizierter DNA wurden 2%ige Agarosegele verwendet, denen 3 µl Ethidiumbromid (1 mg/ml) zugegeben wurden. Als Laufpuffer diente TBE. Die DNA-Proben wurden mit 5 µl Ladepuffer (enthält Bromphenolblau und Ficoll) versetzt und bei 90 V aufgetrennt. Als Längenstandard diente der 100 bp-DNA Marker. Bromphenol und Xylencyanol geben einen optischen Anhaltspunkt für den Fortschritt der Elektrophorese. Das im Gel enthaltene Ethidiumbromid lagert sich in die DNA-Doppelhelix ein. Es kann mit UV-Licht angeregt und somit die DNA indirekt sichtbar gemacht werden. Durch Vergleich der Positionen der Banden der DNA-Fragmente mit den Banden des DNA-Größenstandards wird die Größe der PCR-Fragmente bestimmt.

3.12 Real-Time-quantitative PCR

Die Real-Time-quantitative-PCR (RT-qPCR) ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) beruht und zusätzlich die Quantifizierung der gewonnenen DNA ermöglicht. Die

Quantifizierung wird mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen durchgeführt, die während eines PCR-Zyklus erfasst werden (daher der Name „Real Time“). Der hierbei verwendete Fluoreszenzfarbstoff ist SYBR-Green. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu. Am Ende eines Laufs (der aus mehreren Zyklen besteht) wird anhand von erhaltenen Fluoreszenzsignalen die Quantifizierung in der exponentiellen Phase der PCR vorgenommen. Nur in der exponentiellen Phase der PCR (die wenige Zyklen in einem Lauf dauert) ist die korrekte Quantifizierung möglich, da während dieser Phase optimale Reaktionsbedingungen herrschen. Diese Methode unterscheidet sich somit von anderen quantitativen PCR-Methoden, die erst nach Ablauf der PCR eine quantitative Auswertung, meist unter Einbeziehung einer gelelektrophoretischen Auftrennung der PCR-Fragmente, vornehmen.

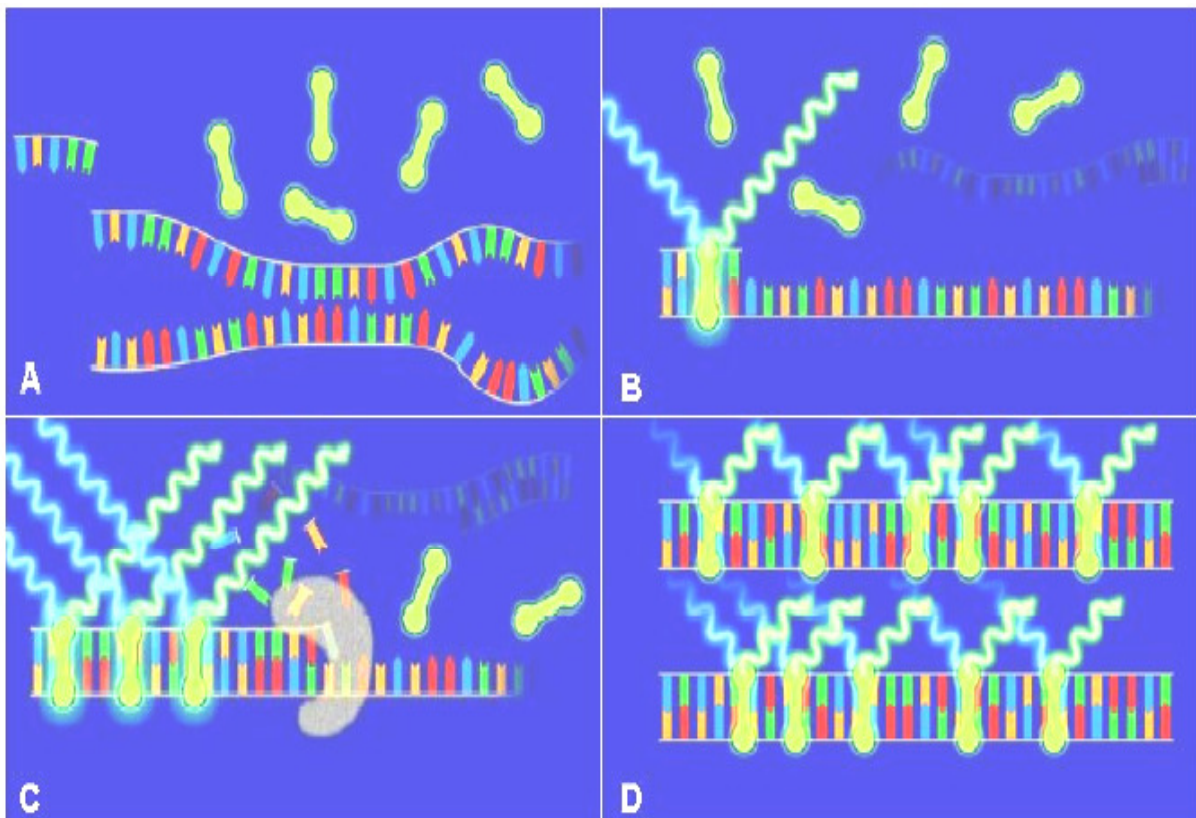


Abbildung 7

Schematischer Ablauf einer Real-Time PCR mit dem DNA interkalierenden Farbstoff SYBR Green. Bild A zeigt die Denaturierung, Bild B die Primeranlagerung (Annealing), Bild C die Kettenverlängerung (Elongation) und Bild D das Ende des jeweiligen Zyklus (nach Fa. Roche).

Der Reporter (ein Fluorochrom, der sich mit Licht einer bestimmten Wellenlänge anregen lässt und die aufgenommene Energie anschließend in Form von Licht einer anderen Wellenlänge wieder abstrahlt) und ein Quencher (ein Fluorochrom, dessen Anregungsspektrums dem Emissionsspektrum des Reporters entspricht) sitzen auf demselben Oligonukleotid, vorzugsweise an 5`- und 3`-Ende. Solange das Oligonukleotid intakt ist, ist die Lichtstärke des Reporters gering. Wird der Reporter aber durch die herannahende Polymerase freigesetzt, steigt die Lichtproduktion bei dieser Wellenlänge an. Je mehr DNA synthetisiert wird, desto mehr Reporter-Moleküle werden freigesetzt und entsprechend steigt die Signalstärke. Farbstoff SYBR-Green wird unspezifisch in doppelsträngige DNA eingebaut (Abb. 8). In der ersten Phase der Amplifikation einer PCR ist die Templatmenge begrenzt und die Wahrscheinlichkeit, dass sich Template, Primer und Polymerase treffen, suboptimal, während in der dritten Phase der Amplifikation die Menge der Produkte (DNA, Pyrophosphat, Monophosphatnucleotide) derart ansteigt, dass es zur Hemmung durch diese kommt, häufiger Produktfragmente miteinander hybridisieren, die Substrate langsam verbraucht werden und letztlich die Polymerasen und Nucleotide durch die Hitze langsam zerstört werden. Ein exponentieller und daher quantifizierbarer Anstieg findet sich nur in der Phase dazwischen. Exponentiell bleibt eine PCR bei 12 bis 400 Ausgangskopien für ca. 30 Zyklen, bei 200 bis 3200 für 25 Zyklen und bei anfänglich 3200 bis 51200 für höchstens 20 Zyklen (Tabelle 5). Um immer am Anfang der exponentiellen Phase messen zu können, wird häufig der CT-Wert (Cycle Threshold = "Schwellenwert-Zyklus") verwendet, der den Zyklus beschreibt, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt.

IRF-7 RT-qPCR Ansatz	IRF-7 RT-qPCR Programm	
1 µL cDNA (aus 400 ng-RT)	step: 95 °C	1 s
12,5 µL 2 x Mastermix (QuantiTect, Qiagen)	step 1: 95 °C	15 min
1,25 µL 10 µM IRF-7 BW3 fwd-Primer (Ziel: 500nM)	step 2: 95 °C	15 s
1,25 µL 10 µM IRF-7 BW3 bwd-Primer (Ziel: 500nM)	step 3: 65 °C	30 s
9 µL ddH ₂ O (QuantiTect, Qiagen)	step 4: 72 °C	30 s
	40 x step 2->4	

Tabelle 5

Ansatz und Programm der IRF-7 RT-qPCR.

Relative Quantifizierung

Hierfür wird eine interne Kontrolle benötigt. Eine interne Kontrolle kann ein Gen-Transkript sein, dessen Signal verwendet wird, um Variationen in der Ausgangsmenge der eingesetzten RNA auszugleichen. Dies wird als Normierung bezeichnet. Weil die Gesamtanalyse auf diesem Signal beruht, ist die Wahl der internen Kontrolle ein wichtiger Aspekt des Experiments. Die ideale interne Kontrolle ist leicht zu detektieren. Deren Expression sollte nicht während des Zellzyklus, zwischen Zelltypen oder als Antwort auf die experimentelle Behandlung (z. B. Stress, Medikamente, Krankheit) variieren. In dieser Arbeit wurde das 18S Gen verwendet (Tabelle 6).

18S RT-qPCR Ansatz	18S RT-qPCR Programm	
1 µL cDNA (aus 400ng-RT)	step: 95 °C	1 s
12,5 µL 2 x Mastermix (QuantiTect, Qiagen)	step 1: 95 °C	15 min
1,25 µL 10 µM 18S fwd-Primer (Ziel: 500nM)	step 2: 95 °C	15 s
1,25 µL 10 µM 18S bwd-Primer (Ziel: 500nM)	step 3: 65 °C	30 s
9 µL ddH ₂ O (QuantiTect, Qiagen)	step 4: 72 °C	30 s
	40 x step 2->4	

Tabelle 6

Ansatz und Programm der 18S RT-qPCR.

Effizienz

Die Effizienz kann auf verschiedene Arten berechnet werden, die sich in ihrem Ergebnis leicht unterscheiden. Die einfachste Art ist folgende: Die Effizienz E kann mit Hilfe der Steigung m einer Standardkurve berechnet werden:

$$E = 10^{-1/m}$$

Eine Steigung m von -3,32 würde somit eine Effizienz von 100 % bedeuten, d. h. eine Verdopplung der Amplifikate pro Zyklus. Eine Steigung von -3.58 bedeutet eine Effizienz von 90 %.

Herstellung einer Standardreihe

Die IRF-7 und 18S Standardreihen bestanden aus IRF-7 bzw. 18S cDNA von nicht infizierten murinen Herzen (nach positiver Reverser Transkription von 40 ng/µl RNA).

Nach cDNA-Messung mithilfe des Nano Drops wurden cDNA-Konzentrationen von 1 ng, 0,1 ng, 0,01 ng, 1 pg, 0,1 pg, 0,01 pg und 1 fg mittels Verdünnung hergestellt.

Berechnung mit Hilfe einer Standard-Kurve

Es besteht eine lineare, umgekehrt proportionale Beziehung zwischen dem Logarithmus der eingesetzten Menge und dem CT. Ist die Ausgangsmenge bekannt, kann eine Standardkurve durch Auftragen des Logarithmus der Ausgangsmenge gegen den CT konstruiert werden. Durch die Geradengleichung $x = (CT - b)/m$ kann an der Standardkurve für jede unbekannt Probe der Logarithmus der Kopienzahl bestimmt werden.

In dieser Arbeit wurden alle Proben normiert, indem pro 18S qPCR-Platte ein 18S Quantitätsmittelwert des Tages 0 als Referenz genommen wurde. Pro Platte wurden dann alle 18S Quantitäten auf diese Referenz genormt. Die IRF-7 Quantitätsmittelwerte wurden dann auf die genormten 18S Mittelwerte bezogen.

$$\text{IRF-7 Gen (normiert)} = \frac{\text{IRF-7 Mean Qty}}{\text{auf bestimmte Tag 0}} \\ \text{Referenz genormte 18S Mean Qty}$$

Die unterschiedliche Expression zweier Proben relativ zueinander lässt sich als Quotient darstellen und ergibt eine n-fache Expression:

$$\frac{\text{Gen Gruppe A (normiert)}}{\text{Gen Gruppe B (normiert)}} = n\text{-fache} \\ \text{Expression Gruppe A zu Gruppe B}$$

Dissoziationskurve

Zur Spezifität der Primerbeurteilung ist die Dissoziationskurve erforderlich, die nur einen Peak zeigen darf. Der Peak entspricht der spezifischen Schmelztemperatur, bei der 50% der amplifizierten cDNA denaturiert sind. Dabei wird der Fluoreszenzfarbstoff (z. B. SYBR Green I) freigesetzt, und es wird eine Fluoreszenzabnahme registriert. Da die doppelsträngige DNA von spezifischen PCR-Produkten einen höheren Schmelzpunkt hat als unspezifisch entstehende Primerdimere, ist eine Unterscheidung möglich. Die Höhe des Peak der Schmelzkurve gibt annähernd Auskunft über die Menge des gebildeten Fragments.

3.13 Isolierung von DNA aus Agarosegele

Nach der Gelelektrophorese wurde die zweite unerwünschte größere Bande (Fragmentgröße > 266 bp) mit Einmalskalpellen aus dem Gel ausgeschnitten und in Eppendorfgefäße überführt. Danach wurde ein 3-faches Volumen von QX1-Puffer und 10 µl QiaEx II („Glasmilch“), das vorher 15 s gevortext wurde, zugegeben, gemischt und 10 min bei 50 °C inkubiert, wobei alle 2 min gevortext wurde. Nach 30 sekundlichen Zentrifugieren mit 10.000 g bei Raumtemperatur, wurde der Überstand verworfen. 500 µl QX1 Puffer wurde dazugegeben, gevortext und bei Raumtemperatur mit 10.000 g für 30 s zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstands wurde noch zweimal mit je 500 µl PE-Puffer gewaschen, gevortext und wieder bei Raumtemperatur mit 10.000 g für jeweils 30 s zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das dabei entstandene Pellet wurde 10 bis 15 min an der Luft getrocknet, 20 µl ddH₂O zugegeben, gevortext und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach nochmaligen Zentrifugieren mit 10.000 g für 30 s bei Raumtemperatur wurde der Überstand, die isolierte cDNA, in ein neues Tube überführt und bei –20 °C gelagert.

3.14 Klonierung der aus dem Agarosegel isolierten cDNA in *E. coli*

Um die, aus dem Agarosegel isolierte, cDNA der zweiten unerwünschten Bande zu sequenzieren, musste diese zuerst vermehrt werden. Dazu wurde die cDNA mit einem Vektorplasmid ligiert und in *E.coli* Bakterien transformiert. Die Ligation erfolgt mittels einer DNA-Ligase unter Bildung einer Phosphodiesterbindung, wobei das genomische Fragment, welches nun Bestandteil des Plasmid ist, als Insert bezeichnet wird. Unter Transformation versteht man die Aufnahme von freier DNA (Plasmid oder Genomteilstücke) in eine Bakterien- oder eukaryotische Zelle (Abb. 9). Dies dient dazu, durch Vermehrung des Gastbakteriums einen hinsichtlich der Basenabfolge stabilen Klon des interessierenden DNA-Abschnittes in großer Quantität zu erzeugen.

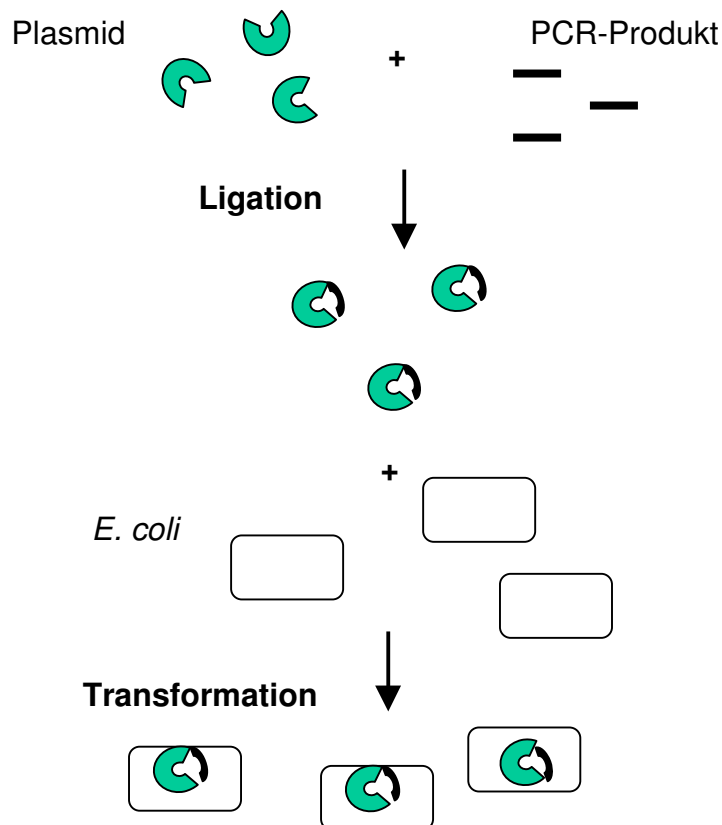


Abbildung 8

Prinzip der Klonierung eines PCR-Fragments in einen Vektor mit anschließender Transformation in DH5a *E. coli*.

Der hier verwendete pGEM-T easy Vektor trägt ein Antibiotikaresistenzgen für Ampicillin. Damit wird sichergestellt, dass nur diese Bakterien, die erfolgreich mit dem pGEM-T easy Vektorplasmid transformiert wurden, auf dem Selektionsmedium, das Ampicillin enthält, überleben können. Der in dieser Arbeit verwendete *E. coli* Stamm kann keine eigene funktionelle β -Galaktosidase synthetisieren, da diesem die für die N-terminale Region kodierende Sequenz fehlt. Der pGEM-T easy Vektor dagegen enthält dieses Gen. Erfolgt bei der Ligation keine Insertion des cDNA-Fragments und ist die Transformation der *E. coli* mit diesem Vektor erfolgreich, kann das β -Galaktosidase-Genfragment des Vektors das mutierte β -Galaktosidase-Gen des Bakteriums transkomplementieren. Das als Substrat eingesetzt X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Galaktopyranosid) wird durch die β -Galaktosidase hydrolysiert, so dass eine Blaufärbung der Bakterienkolonie eintritt. Wird die cDNA jedoch erfolgreich mit dem Vektor ligiert, inseriert sie in die Sequenz, die für das β -Galaktosidase-Genfragment kodiert. Damit kann keine aktive β -Galaktosidase mehr gebildet werden, folglich kann X-

Gal nicht umgesetzt werden und es tritt keine Blaufärbung der Bakterienkolonie ein – sie bleibt weiß. Somit besitzen die blauen Bakterienkolonien nur den Vektor, die weißen Bakterienkolonien dagegen den Vektor und das uns interessierende Insert.

3.14.1 Ligation

2 µl reamplifizierte cDNA	1. Alles mischen
1 µl pGEM-T easy Vektor	2. Inkubation bei 4 °C über Nacht
1 µl T4-DNA-Ligase	
5 µl 2 x Ligation Puffer	
1 µl H ₂ O	

Tabelle 7

Ansatz der Ligation.

Das Protokoll aus Tabelle 7 wurde durchgeführt und am darauffolgenden Tag erfolgte die Transformation von *E. coli*.

3.14.2 Transformation von *E. coli*

Die bei –70 °C gelagerten DH5α-Bakterien wurden zum langsamen Auftauen 10 min auf Eis gelagert. Danach wurde 1 µl aus dem Ligationsansatz dazugegeben, mit einer Pipettenspitze leicht verrührt und 30 min auf Eis inkubiert. Der darauffolgende Hitzeschock erfolgte 20 s bei 42 °C im Wasserbad. Nach 2-minütiger Inkubation auf Eis wurden schließlich 950 µl auf 37 °C vorgewärmtes LB-Flüssigmedium zugegeben und 1 h bei 37 °C mit 225 rpm geschüttelt. 50 µl des Transformationsansatzes wurde auf eine erste LB-Agarplatte verteilt, die restlichen 900 µl dann 2 min bei 5.000 rpm abzentrifugiert, der Überstand verworfen, die Bakterien vorsichtig resuspendiert und auf eine zweite LB-Agarplatte verteilt. Anschließend wurden die Platten über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Zur Intensivierung der Blaufärbung erfolgte eine Inkubation der Agarplatten für 1 h im Kühlschrank. Dann wurden pro Platte etwa 5 weiße Bakterienkolonien mit 1 ml-Pipettenspitzen entnommen, die dann samt Spitze in 4 ml LB-Flüssigmedium (mit Ampicillin) gegeben wurden und über Nacht bei 37 °C mit 225 rpm geschüttelt wurden.

100 ml LB-Agar

4 g LB-Agar (autoklaviert, bei 4 °C gelagert) wurde vor Benutzung zum Flüssigzustand erhitzt und handwarm abgekühlt. Danach wurden zu je 1 ml 1 µl Ampicillin (50 mg/ml) und 150-250 µL X-Gal (40 mg/ml) zugegeben und zu je ca. 10 ml auf ca. 10 Platten verteilt.

1l LB-Flüssigmedium

25 g LB-Medium wurde in 1 l ddH₂O gelöst, 20 min bei 121 °C autoklaviert und bei 4 °C gelagert. Vor Benutzung wurde dann 1 µL Ampicillin (1 µg/ml) zu 1 ml LB-Flüssigmedium zugegeben.

3.15 Plasmidpräparation

Zur Isolierung der Plasmid-DNA aus den *E. coli* wurden Lösungen, Gefäße und Säulen des QIAprep Spin Miniprep Kit verwendet. Dafür wurde 2 ml der Übernachtsbakterienflüssigkultur in ein 2 ml-Reaktionsgefäß gegeben, 1 min bei 10.000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das dabei entstandene Pellet wurde resuspendiert und 250 µl Puffer P1, der vorher mit RNase A versetzt wurde, zugegeben und gevortext. Nach Zugabe von 250 µl Puffer P2 wurde alles durch Schwenken des Gefäßes vermischt, bis ein klares Lysat entstand. Danach wurde 350 µl Puffer N3 zugegeben, vermischt bis nun ein flockiges Präzipitat entstand und 10 min bei 13.000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Nach Setzen der Säule auf ein 2 ml-Reaktionsgefäß, wurde der klare Überstand in die Säule gefüllt, 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Jetzt wurde 750 µl Puffer PE (mit 99 % Ethanol versetzt) auf die Säule gegeben, 1 min bei 13.000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Zum Trocknen der Säule wurde diese 1 min bei 13.000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert, auf ein neues 1,5 ml-Tube gesetzt und 50 µl dd H₂O auf die Matrix pipettiert. Nach 1-minütiger Inkubation erfolgte eine 1-minütige Zentrifugation bei 13.000 rpm und Raumtemperatur. Nach jetzigem Verwerfen der Säule befand sich nunmehr nur die Plasmid-DNA im Tube. Anschließend wurde damit ein Restriktionsverdau durchgeführt, um das gewünschte cDNA-Fragment zu separieren.

3.16 Restriktionsverdau

Zur Sicherstellung, dass die Plasmide das gewünschte cDNA-Insert besitzen, wurde nach der Plasmid-DNA-Präparation aus *E.coli* ein Restriktionsverdau mit dem Restriktionsenzym EcoRI durchgeführt. Da der pGEM-T Vektor je zwei das Insert flankierende EcoRI-Schnittstellen besitzt, ist dies möglich. Für einen 20 µL-Restriktionsansatz wurde 5 µL Plasmid-Miniprep-DNA mit 1 µL EcoRI, 2 µL 10×H-Puffer und 12 µL H₂O vermischt und 1,5 h bei 37 °C im Heizblock inkubiert. Die Fragmente wurden nach dem Verdau wie in Abschnitt 3.10 beschrieben mittels einer Gelelektrophorese in 1 % Agarose bei 90 V aufgetrennt. Anhand der Größe der gewonnenen DNA-Fragmente konnte die korrekte Länge und damit der Erfolg der Subklonierung bestätigt werden. Die Sequenzierung des Inserts erfolgte dann außerhalb unseres Institutes.

3.17 Statistik

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mittels SPSS-Software. Für Gruppenvergleiche wurde der nicht-parametrische Wilcoxon-Mann-Whitney-Test verwendet. Zusätzlich wurde der Kruskal-Wallis-Test (H-Test) für Vergleiche zwischen unterschiedlichen Zeitpunkten angewendet. Es wurden Unterschiede als signifikant gewertet, wenn ein $p < 0,05$ vorlag. Bei einem $p < 0,01$ wurde eine hohe Signifikanz und bei einem $p < 0,001$ eine höchste Signifikanz angenommen.

3.17.1 Graphik

Mittels der GraphPad Prism 3.0 Software wurden Graphiken von Einzelwerten hergestellt. Die Säulendiagramme erstellten wir anhand MS Excel.

4. Ergebnisse

4.1 RNA-Reinheit, Integrität und Quantität

Mittels der Gelelektrophorese und dem Bioanalyzer wurde die Reinheit und Integrität der Trizol-isolierten kardialen RNA überprüft. Die 28S und 18S ribosomale RNA war scharf abgrenzbar zu erkennen. Die 28S-Bande erschien intensiver als die 18S-Bande. Abbildung 10 zeigt eine leichte DNA-Verunreinigung oberhalb der 28S-Bande der zweiten Probe. Diese Probe wurde daraufhin nicht weiter verwendet.

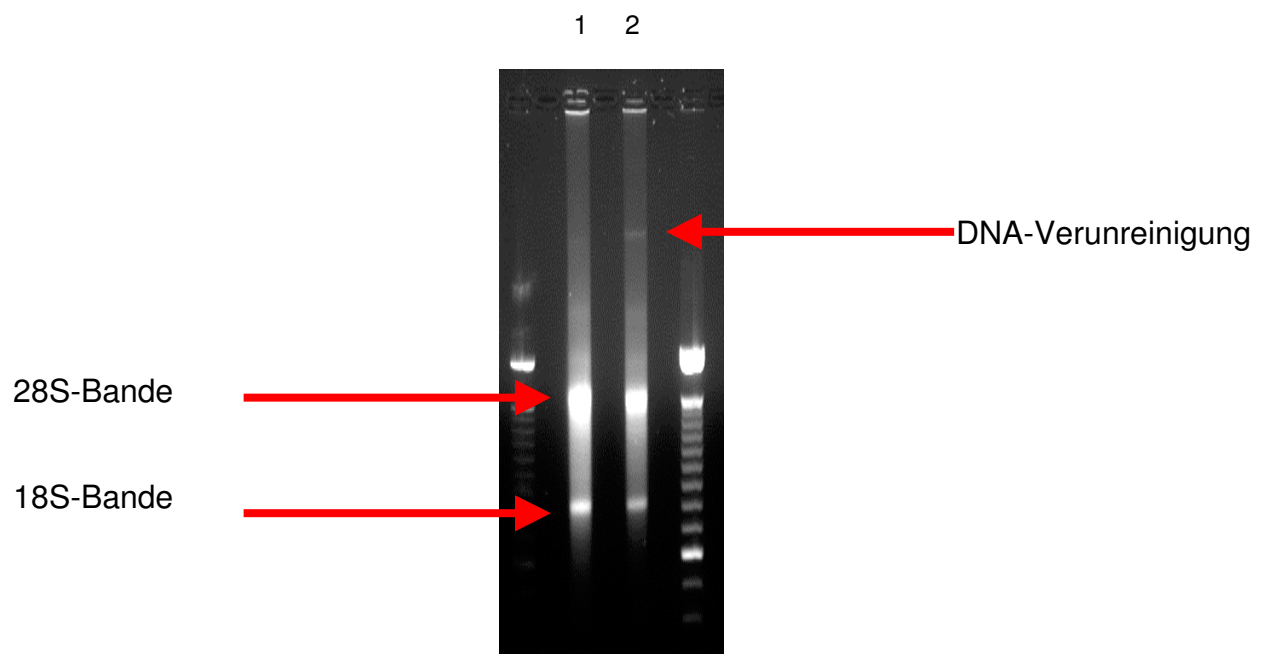
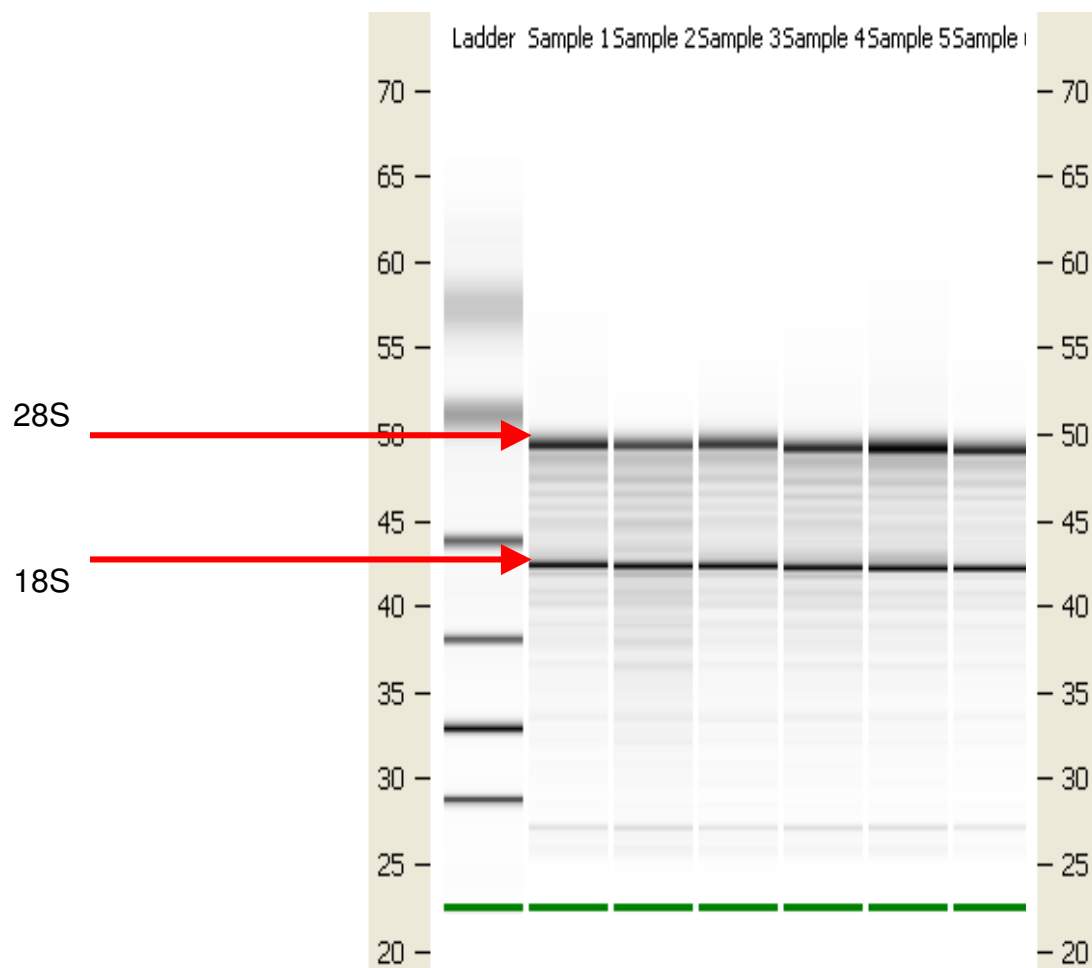


Abbildung 9

RNA-Integritätsnachweis zweier Trizol-isolierten kardialen RNA Proben (1, 2) vor DNA-Verdau mittels Gelelektrophorese. Probe 2 zeigte eine DNA-Verunreinigung.

Der Bioanalyzer zeigte für unsere Trizol-isolierten RNA RIN-Werte von 8 an. Die Integrität der RNA konnte auch durch die scharfe Abgrenzbarkeit der 28S- und der 18S-Banden nachgewiesen werden (Abb. 11). Die RNA war intakt.

**Abbildung 10**

Nachweis von intakter kardialer Trizol-isolierter RNA mittels Bioanalyzer nach DNA-Verdau (sample 1 bis 5). 28S und 18S waren scharf abgrenzbar.

Die Quantität der extrahierten Gesamt-RNA lag zwischen 400 und 600 ng/ μ l. Diese reine und intakte kardiale RNA wurde mittels Random-Hexamer-Primer-Reverse-Transkription in cDNA umgeschrieben.

4.2 Etablierung eines quantitativen Real-Time-PCR Assay für IRF-7

Um die Expression der IRF-7 mRNA messen zu können, musste ein geeigneter Assay etabliert werden. Voraussetzungen dafür sind Primer, die spezifisch für IRF-7 sind, und ein geeignetes PCR-Protokoll mit optimaler Annealing-Temperatur für die Primerbindung und optimaler Zyklenzahl, in der die Amplifizierung exponentiell verläuft. Abbildung 11 zeigt schematisch die Vorgehensweise zur Etablierung eines quantitativen Real-Time-PCR Assay für IRF-7.

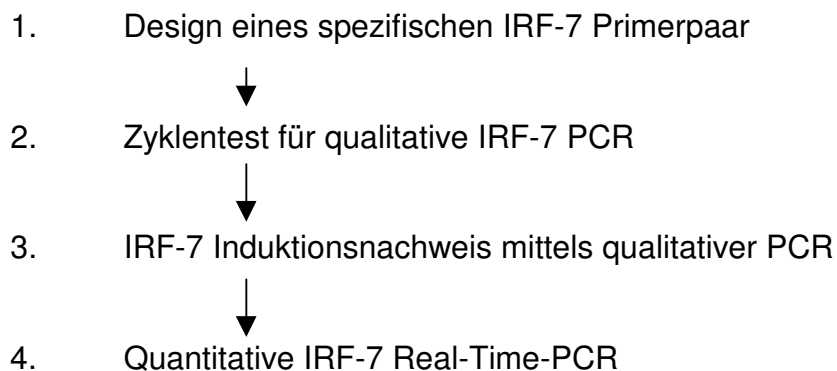


Abbildung 11

Schema zur Etablierung einer quantitativen IRF-7 Real-Time-PCR

4.2.1 IRF-7 Primertest

Abbildung 12 zeigt die hypothetische cDNA-Sequenz des murinen *IRF-7* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>). Mittels der im Exon 8 liegenden Sequenz 5-ggaggag tttcgggctc gga-3 und der im Exon 9 liegenden Sequenz 5-atgga cctgggtcag tggcc-3 wurden die IRF-7 BW fwd und IRF-7 BW bwd Primer designt. Zusätzlich wurden anhand der im Exon 8 liegenden Sequenz 5-gcggca agggtcacca cact-3 und der im Exon 9 liegenden Sequenz 5-tctagca ccaacagtct ctacg-3 die IRF-7 BWn fwd und IRF-7 BWn bwd Primer entworfen .

Die Primer-Spezifität für *IRF-7* wurde mittels des Suchalgorithmus BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) geprüft. Mit einer konventionellen PCR mit 40

Zyklen wurden die IRF-7 Primer getestet. Mittels der 2+4 Regel wurde eine Annealing-Temperatur von 66 °C errechnet. Als Proben fungierten cDNA von nicht-infizierten murinen Herzen und muriner Leber.

```

1  ctccggtacc aggggtccagc ctgtgacagc ccatccaggc tcggacgctg gattaacacc Exon1
61  tgtgacatca cgtgtgcgct cccgctacat ctgtagtcac atctacagcc accttggcag
121 aggaatctac actgagttct gaacctaggt gaccacaagt tctcaaacct catctgtgac
181 cctcaacacc ctaataacct ggtcacactt gtgaaactga aattcctacc tgttaccaac
241 acttghtaacg tttaaaacac atttgtgaaa cttggtcaca ctatctgtgg ctacaaccta
301 aaaccataga ggcacccaag gggccttatt tgcaatagct gactgctcca gtgactacaa
361 ggcatacacag agtagtagca tctactttga ttctcccaga ctgcctgtgt agacggagca
start1 421 atggctgaag tgaggggggt ccagcgagtg ctgtttggag actggctatt gggggaggtc Exon2
481 agcagcggcc agtacgagg gctgcagtgg ctgaacgagg ctgcacagat cttccgcgta
start2 541 ccctggaagc atttcggtcg tagggatctg atgaagaag atgcacagat cttcaagggc
601 tgggctgtgg cccgagggag gtggccacct agtggagtta acctgccacc cccagaggct Exon3
661 gaggctgctg agcgaagaga gcgaagagge tggagacca acttccgctg tgcactccac
721 agcacagggc gttttatctt gcgccaaagac aattcagggg atccagttga tccgcataag
781 gtgtacgaac ttagccggga gcttggatct actgtgggcc cagccacgga aaatagggaa Exon4
841 gaagtgagcc tcagcaatgc tctgcccaca caggggtgtgt ccccaggatc atttctggca Stop2
901 agagaaaatg ctgggtcca aacccaagc cctctgctt ctagtgatgc cggggacctc Exon5
961 ttgcttcagg ttctgcagta cagccacata ctggaatccg agtctggggc agaccccgtc Exon5*
1021 ccaccacagc ctctggcca ggagcaagac cgtgtttacg aggaacccta tgcagcatgg Exon6
1081 caggtggaag ctgtccccag tcccaggcct caacagccag ctctcaccga ggcagcctt Exon7
1141 ggggttctgg atgtgacat catgtacaag ggccgcacag tgctacaggc agtgggtgggg
1201 caccacagat gcgtgttct gtacagccc atggccccag cagtaagaac ttcagagccc Exon7*
1261 cagccggtga tctttcccag tctgtctgag ctcccagatc agaagcagct gcactacaca

IRF-7 BW3 fwd
1321 gagacgcttc tccagcatgt gtctcccggc cttcagctgg agcttcgagg accgtcactg
1381 tgggcccctgc gtatgggcaa gtgcaaggtg tactgggagg taggcagccc tatgggcact

IRF-7 BW3 bwd
1441 accggcccct ccaccccacc ccagctgctg gagcgcaacc gccacacccc catcttcgac
IRF-7 BW fwd
IRF-7 BWn
1501 ttcagcactt tcttccgaga actggaggag tttcgggctc ggaggcggca agggtcacca Exon8
fwd
1561 cactacacca tctacctggg ttttgggcaa gacttgtcag cagggaggcc caaggagaag
1621 accctgatcc tgggtgaaggt agagcctggg tgggccaagg gaaggtgtgg gctgttaggt neues
1681 aagaaagagt cttaacacat gtcctttcca cagctggagc catgggtatg caaggcatac Exon
1741 ctggagggcg tgcagcgtga ggggtgtgct tccctggaca gcagcagtct cggcttgtgc Exon9
IRF-7 BWn bwd
IRF-7 BW
1801 ttgcttagca ccaacagtct ctacgaagac atcgaacact tctcatgga cctgggtcag
bwd
stop1 1861 tggccttgac tcagaatccc aactcccaat aatagttca aaatc

```

Abbildung 12

Hypothetische cDNA-Sequenz der murinen IRF-7. Dargestellt sind die beiden Startcodons ATG und Exon 1, Exon 2, Exon 3, Exon 4, Exon 5, Exon 5*, Exon 6, Exon 7, Exon 7*, Exon 8 und Exon 9 sowie die Stopcodon der verschiedenen IRF-7 Isoformen (vgl. Abb. 5). Zusätzlich sind die Komplementärsequenzen der verwendeten IRF-7 Primer (BW3, IRF-7 BW und IRF-7 BWn) eingezeichnet. Zwischen den Exone 8 und 9 wurde das neu entdeckte IRF-7 Exon berücksichtigt (rote Schrift)

In der konventionellen PCR zeigte sich eine zusätzliche nicht erwartete zweite Bande (Abb.13), die größer war als die erwartete 266 Basenpaarlänge für das IRF-7 BW Primerpaar bzw. 206 Basenpaarlänge für das IRF-7 BWn Primerpaar.

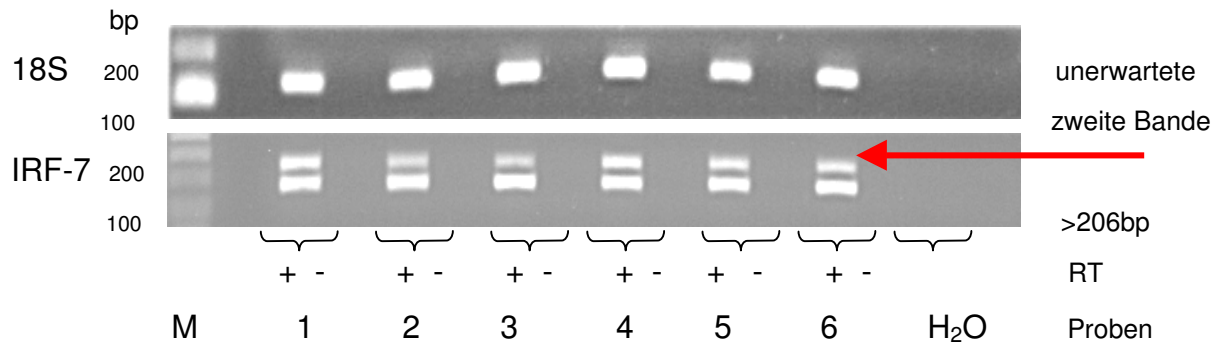


Abbildung 13

Repräsentatives Gel nach qualitativer IRF-7 PCR mit IRF-7 BWn fwd und IRF-7 BWn bwd Primer. Verwendet wurden 6 Proben von cDNA (RT+ und RT-) von nicht infizierten murinen Herzen der A.BY Maus am Tag 0 nach CVB3-Infektion. Es zeigte sich eine unerwartete zweite Bande mit >206bp. Als Housekeeping-Gen wurde das 18S rRNA Gen verwendet. Als Marker (M) wurde der 100bp DNA Marker benutzt.

Nach Isolierung, Klonierung und anschließender Sequenzierung der unerwarteten zweiten Bande mit >206bp und Vergleich dieser Sequenz (Abb.14) mit der IRF-7 cDNA Sequenz der NCBI Gendatenbank, konnte als Ergebnis dieser Dissertation ein neues IRF-7 Exon, das in der Literatur noch nicht beschrieben wurde, identifiziert werden. Es liegt zwischen Exon 8 und 9.



Abbildung 14

Nukleotidsequenz des neuen IRF-7 Exon (rot dargestellt). Es liegt zwischen Exon 8 und Exon 9. Dargestellt sind die Komplementärsequenzen des IRF-7 BW Primerpaar.

Neue IRF-7 Primer wurden entworfen. Anhand der im Exon 6 liegenden Sequenzen 5-gagacgcttc tccagcatgt gt-3 und 5-agctgctg gacgcgaacc gc-3 wurde das IRF-7 BW3 Primerpaar entwickelt. Das Primerpaar IRF-7 BW3 fwd und IRF-7 BW3 bwd zeigte nur ein Fragment in der erwarteten Größe von 162 bp.

Im weiteren Verlauf der Dissertationsarbeit wurde deshalb das IRF-7 BW3 Primerpaar für die quantitative IRF-7 Real-Time-PCR verwendet. Als Housekeeping Gen wurde das 18S Gen (Fragmentgröße 120 bp) verwendet.

4.2.2 Zyklentest für den qualitativen IRF-7 Assay

Da nur in der exponentiellen Phase der Amplifizierung eine Beschreibung von Unterschieden in der mRNA Expression sinnvoll ist, wurde die qualitative IRF-7 PCR mit unterschiedlicher Zyklenzahl getestet. Der Zyklentest ergab eine deutlich sichtbare Bande für IRF-7 bei 36 Zyklen mit dem in Abb.13 gezeigten IRF-7 BWn Primerpaar (Produkt: 206 bp). Bei 40 Zyklen war die zusätzliche Bande oberhalb der erwarteten Bande bei 206bp sehr gut sichtbar (Abb. 15).

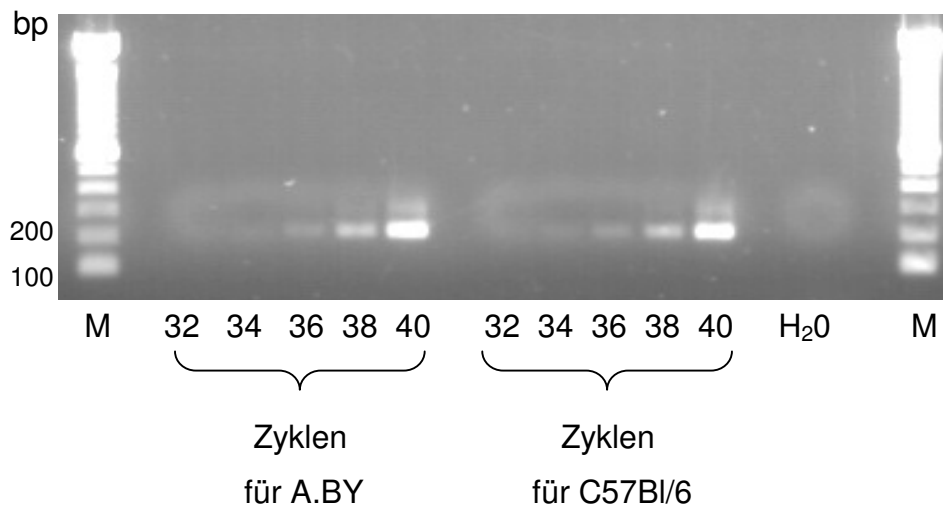


Abbildung 15

Zyklentest für qualitative IRF-7 PCR mit IRF-7 BWn Primerpaar. Als Proben fungierten cDNA von nicht-infizierten Herzen der A.BY und C57Bl/6 Mäuse. Bei 36 Zyklen deutlich sichtbare Bande für beide Mausstämmen, bei 40 Zyklen sichtbare zweite Bande.

4.2.3 Qualitative PCR zur Untersuchung der IRF-7 Expression in den beiden Mausmodellen der akuten und chronischen Myokarditis

Qualitative PCRs wurden mit dem IRF-7 BW3 Primerpaar und der Zyklenzahl 36 durchgeführt. Damit konnte die Induzierbarkeit des IRF-7 auf mRNA Ebene in beiden Myokarditismodellen nachgewiesen werden. Die mRNA Expression des IRF-7 war an den Tagen 4, 8 und 12 nach Infektion stärker als die Expression an den Tagen 0 und 28. Am Tag 28 nach Infektion schien die mRNA-Expression mit der am Tag 0 übereinzustimmen. Abb. 1 zeigt das Ergebnis der qualitativen IRF-7 PCRs. Verwendet wurde cDNA der Serien 8, 9 und 10. Als Housekeeping-Gen fungierte 18S, das redundant ist und seine Expression im Laufe der Infektion nicht ändert.

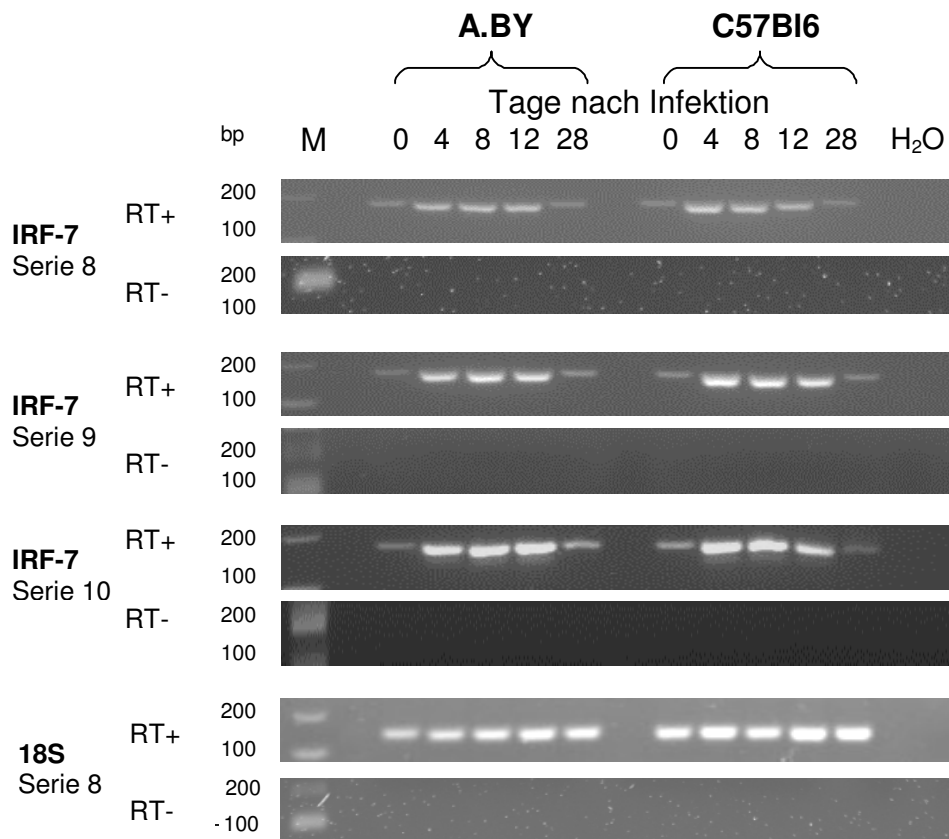


Abbildung 16

Untersuchung der *IRF-7* Expression mittels qualitativer PCR. Verwendet wurde das Primerpaar IRF-7 BW3 und eine Zyklenzahl von 36. Als Proben fungierten cDNA der Serien 8,9,10 von A.BY und C57BI/6 an verschiedenen Tagen nach CVB3-Infektion. Als Housekeeping-Gen agierte 18S.

4.2.4 Etablierung der quantitativen IRF-7 Real-Time-PCR zur Untersuchung der IRF-7 Expression in den beiden Mausmodellen der akuten und chronischen Myokarditis

4.2.4.1 Standardkurven für IRF-7 mRNA und 18S rRNA

Die Quantitäten der IRF-7 Standardreihe bestand aus 1 pg, 0,1 pg, 0,01 pg, 1 ng, 0,1 ng, 0,01 ng und 1 fg IRF-7 cDNA bzw. 18S cDNA. Damit wurde eine RT-qPCR durchgeführt. Abb. 17 zeigt das quantitative Amplifikationsergebnis für die IRF-7 Standardreihe. Umso höher die Quantität der Probe, desto früher, d.h. bei einer niedrigeren Zykluszahl, erfolgt die Veränderung des Fluoreszenzsignals. Der grüne Balken markiert den von der TaqMan 7500 Software berechneten CT-Wert.

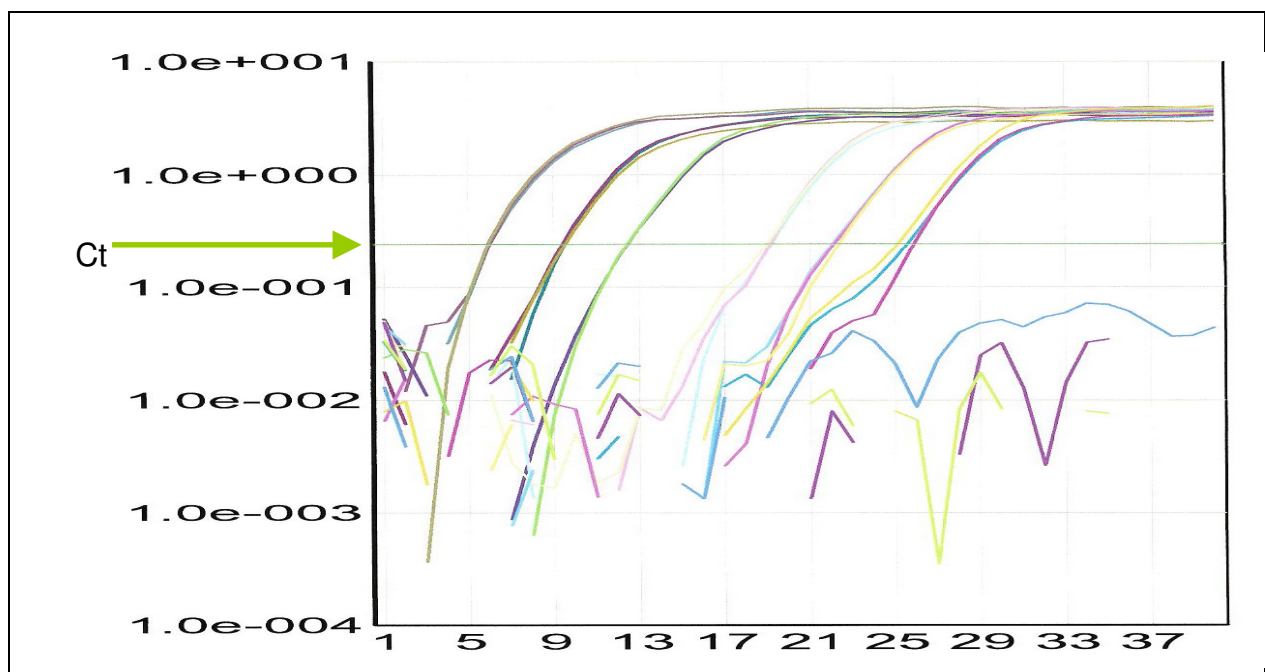


Abbildung 17

RT-qPCR der IRF-7 Standardreihe. Verwendet wurden 1 pg, 01 pg, 0,01 pg, 1 ng, 0,1 ng, 0,01 ng und 1 fg IRF-7 cDNA. X-Achse gibt die PCR-Zykluszahl an. Y-Achse entspricht der Quantität der Amplifikate. Die Werte für 1ng wurden aus dieser Graphik herausgenommen. Der grüne Pfeil markiert den jeweiligen Ct-Wert.

Nach Durchführung der quantitativen Real-Time-PCR mit der IRF-7 und 18S Standardreihe, wurden die gemessenen Ct-Werte gegen den entsprechenden Logarithmus der Gesamtkopienzahl aufgetragen.

Der Vorteil dieser Standardkurven-Methode liegt darin, dass Kontrollen und Proben gegen die gleichen Standards gemessen werden, und der begangene Fehler überall gleich bleibt, und nicht ins Gewicht fällt. Die ideale Steigung beträgt $-3,3$, der ideale Regressionskoeffizient, der als Maß für die Genauigkeit der experimentellen Daten fungiert, nimmt den Wert 1 an. Die Steigung der IRF-7 Standardkurve betrug $3,337098$ (Abb. 18). Damit war die Effizienz dieser Standardreihe nahezu 100%. Pro Zyklus wurden die IRF-7 Amplifikate somit praktisch jeweils verdoppelt. Der Regressionskoeffizient entsprach $0,998740$.

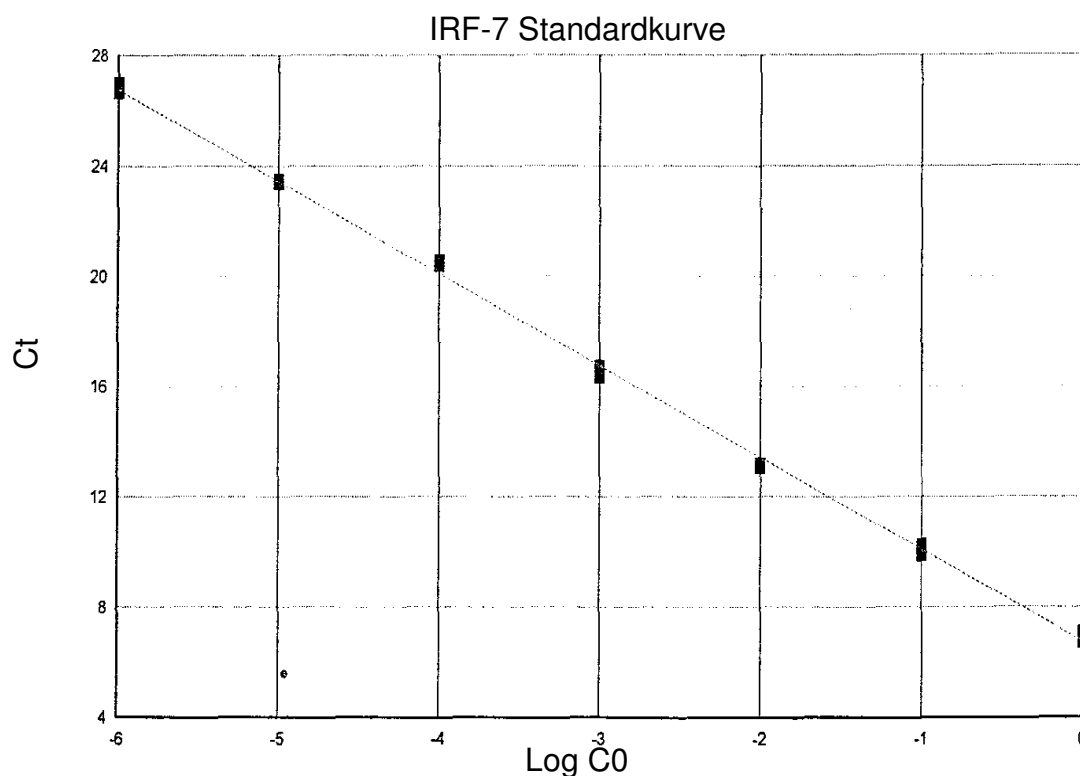


Abbildung 18

IRF-7 Standardkurve mit einem Slope von $-3,337098$. Die jeweiligen Ct-Werte der IRF-7 RT-qPCR wurden gegen den entsprechenden Logarithmus der Gesamtkopienzahl aufgetragen.

Die Steigung der 18S Standardreihe betrug $-3,330474$ (Abb. 19). Die Effizienz dieser Standardreihe war ebenfalls nahezu 100%. Der Regressionskoeffizient entsprach $0,999041$.

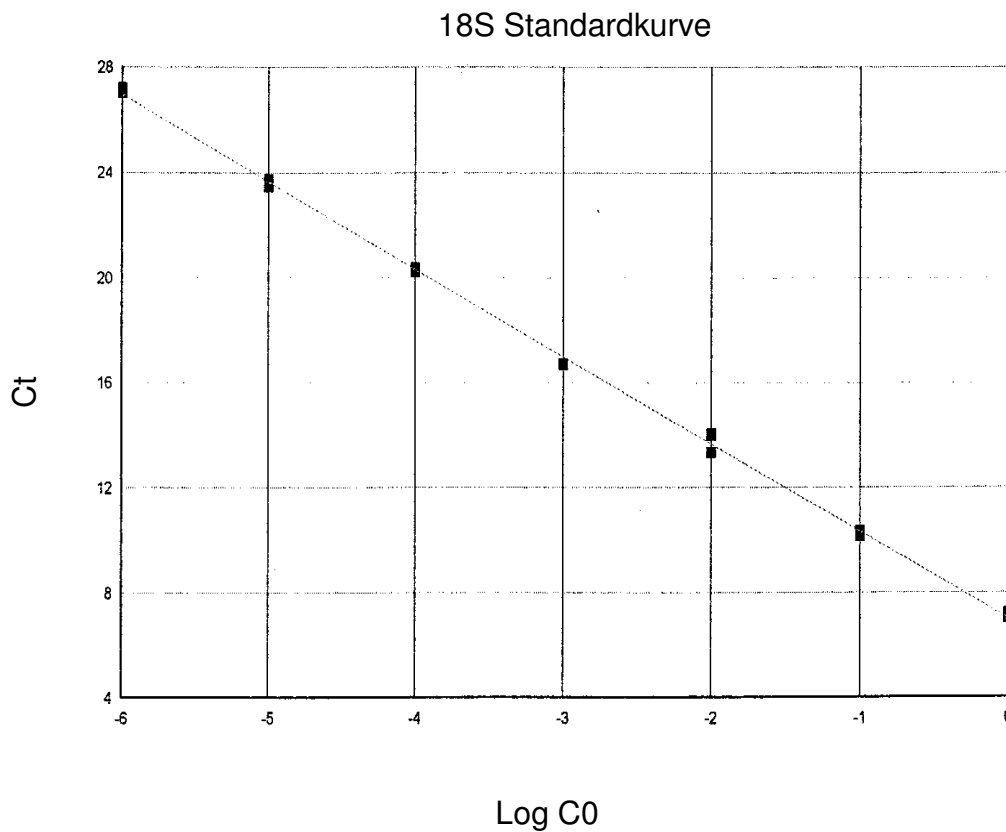


Abbildung 19

18S Standardkurve mit einem Slope von $-3,330474$. Die jeweiligen Ct-Werte der 18S RT-qPCR wurden gegen den entsprechenden Logarithmus der Gesamtkopienzahl aufgetragen.

Abb. 20 zeigt RT-qPCR Ergebnisse von IRF-7 cDNA der Serien 8 bis 10, zusammen mit der RT-qPCR der IRF-7 Standardreihe. Die Quantität der IRF-7 RT-qPCR-Amplifikate spielte sich im Bereich von $0,1 \text{ ng}$ und 1 fg ab.

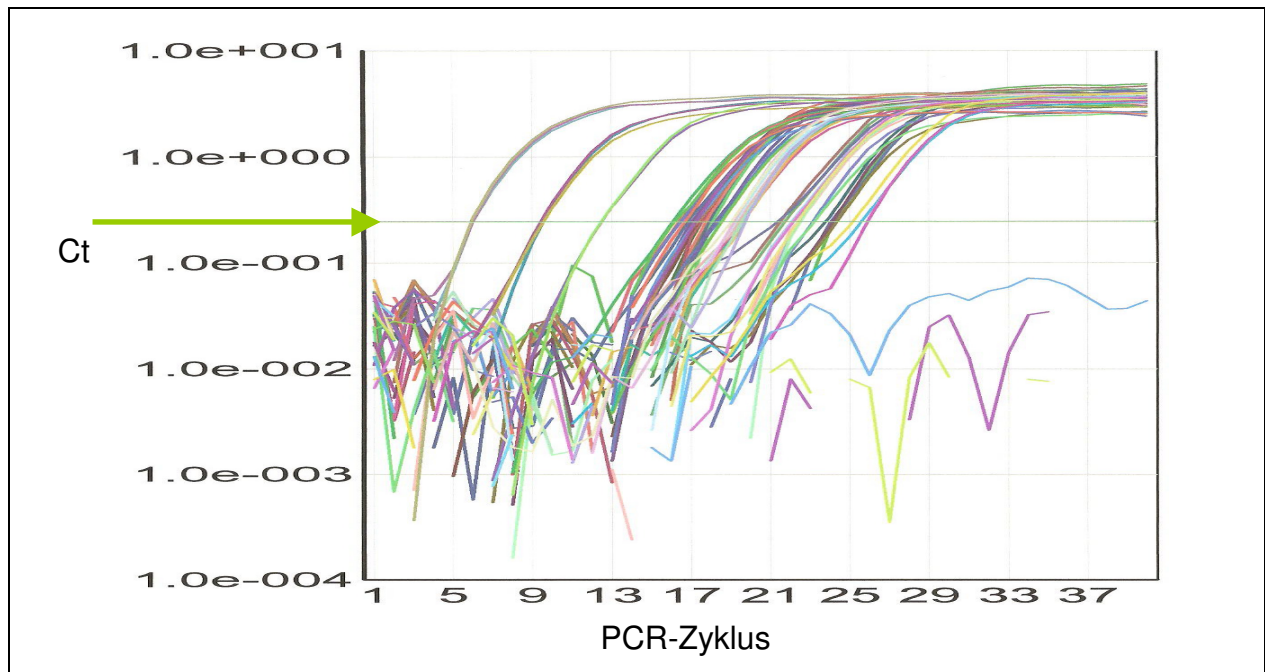


Abbildung 20

RT-qPCR für IRF-7 cDNA der Serien 8 bis 10 zusammen mit der IRF-7 Standardreihe. X-Achse gibt die PCR-Zyklenzahl an. Y-Achse entspricht der Quantität der IRF-7 Amplifikate. Der grüne Pfeil markiert den jeweiligen Ct-Wert.

4.2.4.2 Dissoziationskurven für IRF-7 und 18S

Anhand Dissoziationskurven für IRF-7 und 18S wurde die Spezifität des IRF-7 Assay nochmalig bestätigt. Abb. 21 zeigt die Dissoziationskurve für amplifizierte IRF-7 cDNA der Serien 8 bis 10. Der rote Balken markiert die genspezifische Schmelztemperatur des IRF-7 Amplikon bei 86°C. Es zeigte sich nur ein Maximum für die IRF-7 BW3 Primer. Dies bewies deren Spezifität für *IRF-7* und damit der selektiven Amplifikation von *IRF-7*.

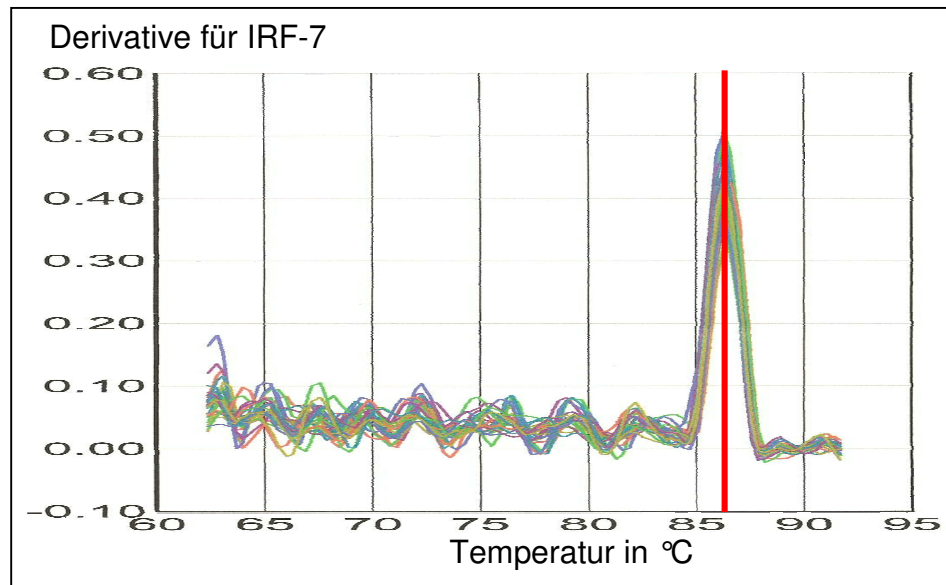


Abbildung 21

Dissoziationskurve für selektiv amplifizierte IRF-7 cDNA der Serien 8 bis 10. Es zeigt sich eine *IRF-7* spezifische Schmelztemperatur von 86°C.

Abb. 22 zeigt die Dissoziationskurve für amplifizierte 18S cDNA der Serien 8 bis 10. Die Schmelztemperatur des Housekeepinggens 18S lag bei 82°C. Die 18S Primer waren spezifisch für das 18S Gen.

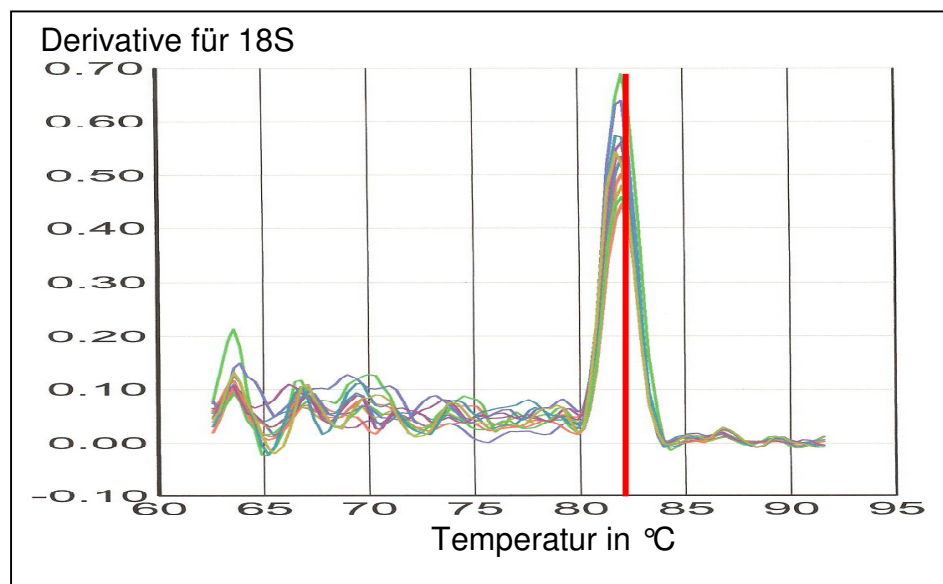


Abbildung 22

Dissoziationskurve für selektiv amplifizierte 18S cDNA der Serien 8 bis 10. Es zeigte sich eine *18S* spezifische Schmelztemperatur von 82°C.

4.3 Expression von IRF-7 mRNA in akutem und chronischem Myokarditismodell

	C57Bl/6	A.BY	
	rel18S	rel18S	
Tag 0	7.43E-06	2.83E-06	Tag 0
	2.32E-05	1.99E-06	
	1.52E-05	1.48E-05	
	1.46E-05	1.29E-05	
	1.92E-05	1.83E-05	
	2.40E-05	8.74E-06	
	1.53E-05	1.40E-05	
	1.27E-05	9.17E-06	
	1.27E-05	7.57E-06	
Tag 4	5.96E-04	3.04E-04	Tag 4
	6.61E-04	3.38E-04	
	7.77E-04	1.97E-04	
	7.05E-04	2.54E-04	
	1.08E-03	3.92E-04	
	1.28E-03	2.92E-04	
	7.99E-04	3.49E-04	
	5.53E-04	4.01E-04	
	5.53E-04	1.72E-04	
Tag 8	3.58E-04	4.90E-04	Tag 8
	4.81E-04	1.91E-04	
	7.19E-04	2.65E-04	
	4.71E-04	3.86E-04	
	5.48E-04	4.55E-04	
	1.04E-03	3.99E-04	
	1.04E-03	1.58E-04	
Tag 12	6.00E-05	1.03E-04	Tag 12
	7.52E-05	3.63E-04	
	1.84E-04	2.65E-04	
	1.08E-04	2.47E-04	
	2.24E-04	3.87E-04	
	4.94E-04	3.14E-04	
	4.94E-04	4.75E-04	
Tag 28	1.13E-05	1.38E-05	Tag 28
	7.74E-06	1.34E-05	
	1.84E-05	2.13E-05	
	2.28E-05	2.42E-05	
	1.97E-05	1.73E-05	
	1.58E-05	2.43E-05	
	1.58E-05	2.43E-05	
Tag 84	1.21E-05	1.31E-05	Tag 84

Tabelle 8

Mittelwerte der auf 18S rRNA standardisierten kardialen IRF-7 mRNA Expression (rel18S) nach IRF-7 RT-qPCR im CVB3-Infektionsverlauf in A.BY und C57Bl/6. Untersucht wurde cDNA zu den angebenen Zeitpunkten nach CVB3-Infektion.

Die mittels quantitativer Real-Time-PCR bestimmte IRF-7 mRNA-Expression wurde für jede Probe auf die Expression der 18S rRNA derselben Probe bezogen. Tab. 8 zeigt die auf 18S standardisierte IRF-7 Expression in A.BY und C57Bl/6 im CVB3-Infektionsverlauf.

4.3.1 Expression der IRF-7 mRNA im chronischem Myokarditismodell

Abb. 23 zeigt die IRF-7 mRNA Expression im Modell der CVB3-Myokarditis der A.BY-Maus („chronisches Myokarditismodell“) an. Es zeigten sich mittels GraphPad Prism Software Berechnungen keine abnorm gestreuten Werte.

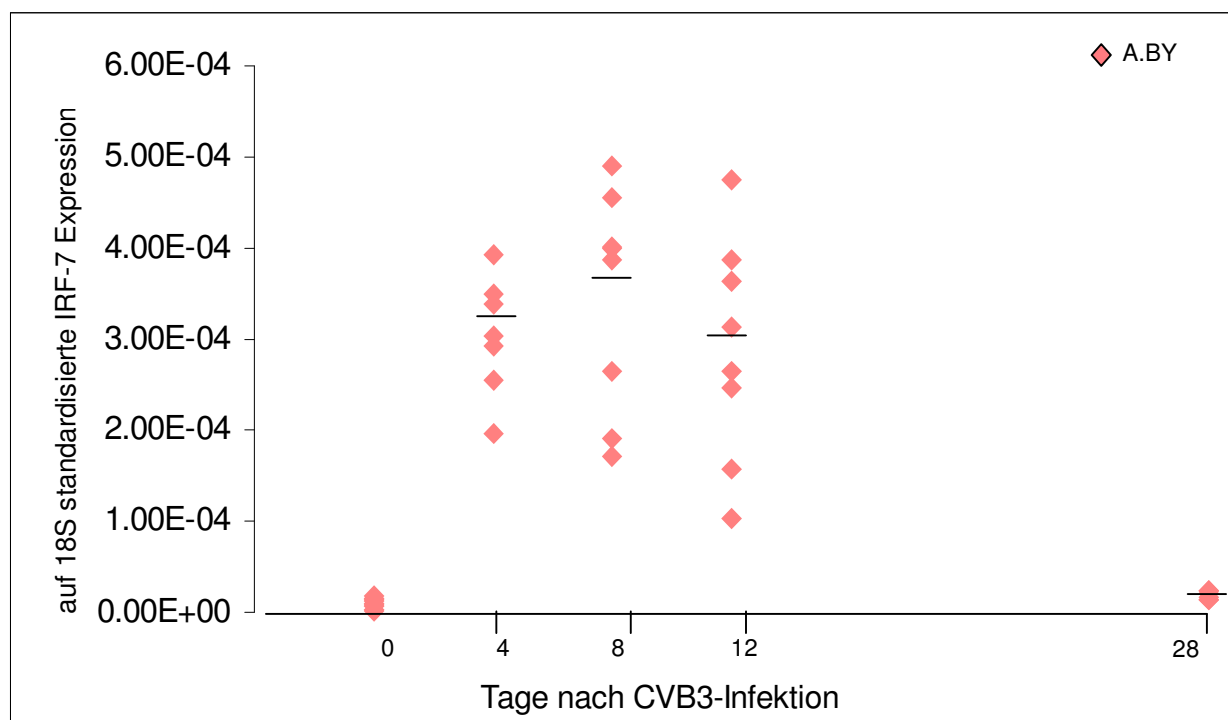


Abbildung 23

Auf 18S standardisierte kardiale IRF-7 mRNA Expression bei A.BY Mäusen im zeitlichen Verlauf der CVB3-Infektion. Die Rauten stellen die Werte einzelner Tiere dar. Der horizontale Strich stellt den Mittelwert dar.

Der IRF-7 Basalwert bei den A.BY betrug im Mittel $1,00 \times 10^{-5}$. Die IRF-7 Expression stieg in diesem Modell bis auf einen Mittelwert von $3,45 \times 10^{-4}$. Der Basalwert wurde an Tag 28 statistisch nachgewiesen nicht ganz erreicht. Er betrug $1,91 \times 10^{-5}$.

4.3.2 Expression von IRF-7 mRNA im akutem Myokarditismodell

Abb. 24 zeigt die IRF-7 mRNA Expression im Modell der CVB3-Myokarditis der C57Bl/6-Maus („akutes Myokarditismodell“) an.

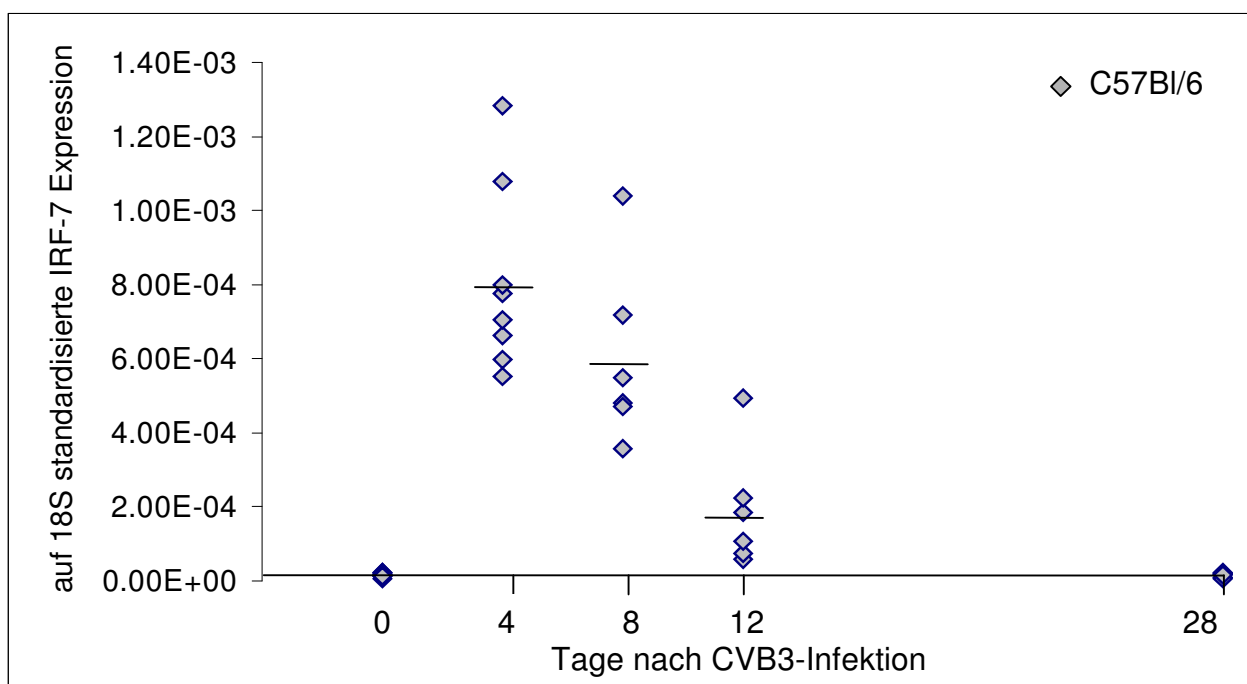


Abbildung 24

Auf 18S standardisierte kardiale IRF-7 mRNA Expression bei C57Bl/6 Mäusen im zeitlichen Verlauf der CVB3-Infektion. Die Rauten stellen die Werte einzelner Tiere dar. Der horizontale Strich stellt den Mittelwert dar.

Es zeigten sich mittels GraphPad Prism Software Berechnungen keine abnorm gestreuten Werte. Der IRF-7 Basalwert lag im akutem Myokarditismodell bei einem Mittelwert von $1,64 \times 10^{-5}$. Die höchste IRF-7 Expression betrug bei C57Bl/6 $8,07 \times 10^{-4}$. Der Basalwert wurde an Tag 28 annähernd erreicht. Er betrug $1,59 \times 10^{-5}$.

4.3.3 Vergleich der IRF-7 mRNA Expression in den untersuchten Myokarditismodellen

Abb. 25 zeigt IRF-7 Expressionsunterschiede in den untersuchten Myokarditismodellen vergleichend miteinander.

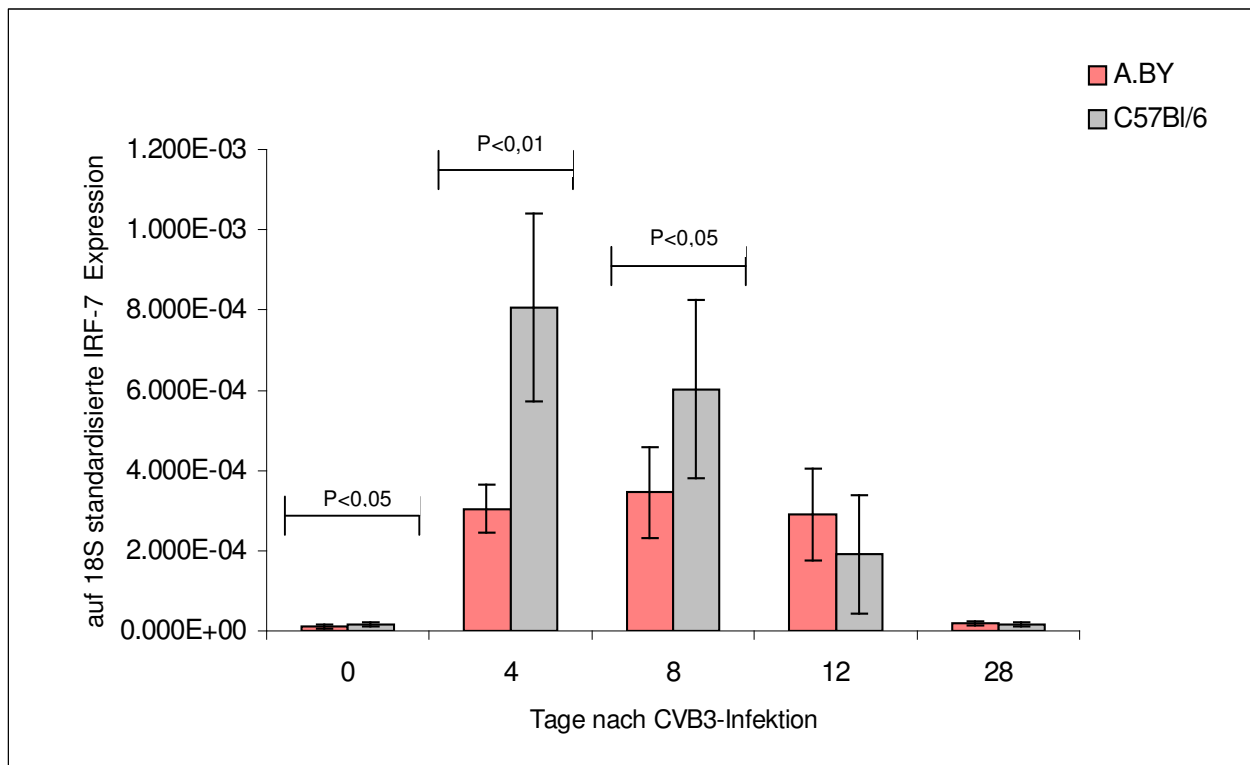


Abbildung 25

Vergleich der IRF-7 mRNA Expression in beiden Myokarditismodellen im CVB3-Infektionsverlauf. Angegeben sind die Mittelwerte der in Tabelle 8 gezeigten auf 18S standardisierten IRF-7 mRNA Expression. Die Fehlerbalken repräsentieren den SEM. Die Gruppenunterschiede wurden mit dem Wilcoxon H-Test analysiert.

Die Expressionsunterschiede zwischen beiden Mäusestämmen waren an den Tagen 0 und 8 nach CVB3-Infektion statistisch signifikant. Schon in der basalen IRF-7 Expression bestand ein signifikanter Unterschied zwischen den Myokarditismodellen. Am Tag 4 nach CVB3-Infektion zeigte sich ein hochsignifikanter Expressionsunterschied zwischen den murinen Myokarditismodellen. IRF-7 wurde am Tag 4 nach CVB3-Infektion im Modell der C57Bl/6 Maus 2,7 mal so hoch exprimiert wie im Modell der A.BY Maus. Am Tag 8 nach CVB3-Infektion betrug die IRF-7 Expression in C57Bl/6 noch das 1,8-fache der IRF-7 Expression in A.BY.

4.4 IRF-7 Induktion in beiden Myokarditismodellen im CVB3-Infektionsverlauf

	Mittelwert	A.BY	C57BI/6	Mittelwert	
Tag 0	1	0.28	0.45	1	Tag 0
		0.20	1.41		
		1.47	0.92		
		1.29	0.89		
		1.82	1.17		
		0.87	1.46		
		1.40	0.93		
		0.91	0.77		
		0.75			
Tag 4	30,25	30.27	36.26	49,04	Tag 4
		33.63	40.19		
		19.59	47.26		
		25.33	42.86		
		39.03	65.51		
		29.11	78.01		
		34.79	48.58		
			33.64		
Tag 8	34,34	39.89	21.74	36,63	Tag 8
		17.12	29.24		
		48.84	43.74		
		19.02	28.63		
		26.34	33.30		
		38.48	63.12		
		45.26			
		39.74			
Tag 12	28,78	15.72	3.65	11,60	Tag 12
		10.23	4.57		
		36.16	11.16		
		26.40	6.56		
		24.58	13.63		
		38.58	30.06		
		31.25			
		47.29			
Tag 24	1,9	1.38	0.68	0,97	Tag 24
		1.34	0.47		
		2.12	1.12		
		2.41	1.39		
		1.73	1.20		
		2.42	0.96		
		1.31	0.73		

Tabelle 9

Vergleich der IRF-7 mRNA Expression in den untersuchten Myokarditismodellen im Verlauf der CVB3-Infektion. Die IRF-7 mRNA-Expression ab Tag 4 wurde jeweils auf die basale Expression (Tag 0) bezogen, die auf 1 gesetzt wurde. Hieraus ergab sich der jeweilige Faktor der Induktion der IRF-Expression (Induktionsfaktor). Gezeigt sind neben den Einzelwerten auch die jeweiligen Mittelwerte.

Tabelle 9 zeigt den Induktionsfaktor der IRF-7 mRNA Expression im zeitlichem Verlauf der CVB3-Infektion für beide Myokarditismodelle. Im CVB3-Myokarditismodell der C57Bl/6 Maus wurde IRF-7 mRNA rascher und stärker induziert als im Myokarditismodell der A.BY Maus. Am Tag 4 nach Infektion steigerte sich die Induktion der IRF-7 mRNA Expression im Modell der C57Bl/6 Maus auf den 49-fachen Wert der Basalexpression. Die höchste Expressionsanstieg zeigte sich bei der C57Bl/6 Maus schon an Tag 4 nach CVB3-Infektion.

Im Myokarditismodell der A.BY Maus fand sich der höchste Expressionswert erst an Tag 8 nach CVB3-Infektion. Die maximale IRF-7 mRNA Expressionssteigerung betrug im Myokarditismodell der A.BY Maus das 34-fache des Basalwertes. Die maximale Expression der IRF-7 mRNA war im Myokarditismodell der C57Bl/6 Maus höher induzierbar als im Modell der A.BY Maus.

4.4.1 Induktion der IRF-7 mRNA-Expression im Myokarditismodell der A.BY Maus

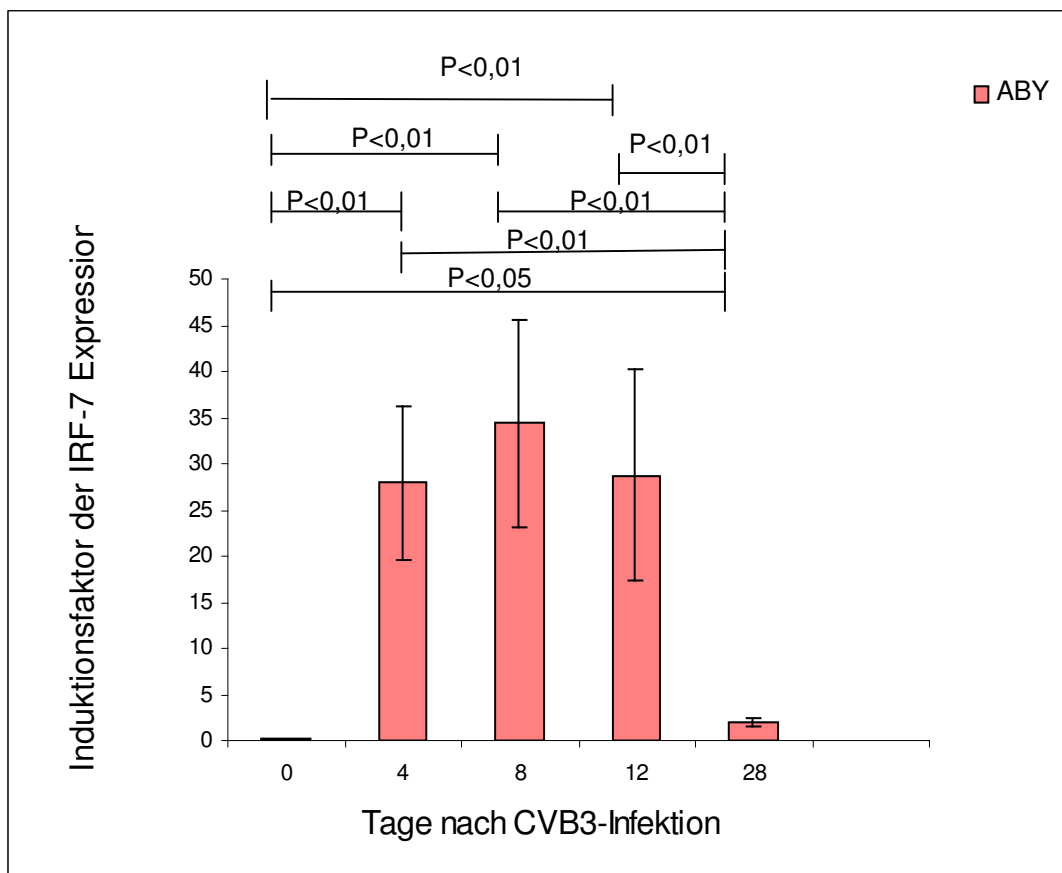


Abbildung 26

Induktionsgrad der kardialen IRF-7 mRNA Expression der A.BY Mäuse im CVB3-Infektionsverlauf. Die auf 18S standardisierte IRF-7 mRNA-Expression wurde auf den Mittelwert des Tag 0 von A.BY bezogen. Gezeigt wurden die Mittelwerte mit ihren jeweiligen SEM im zeitlichen CVB3-Infektionsverlauf. Die Unterschiede zwischen den Zeitpunkten wurden mit dem Wilcoxon-H-Test statistisch analysiert.

Die auf 18S normierte absolute IRF-7 Expression der A.BY Mäuse wurde auf den Tag 0 -Mittelwert in A.BY bezogen. Dies zeigt den Induktionsgrad in A.BY im Verlauf der CVB3-Infektion an. Mit Hilfe des Wilcoxon-H-Test wurde der Induktionsgrad des IRF-7 in A.BY multipel an allen Tagen nach Infektion auf Signifikanz getestet (Abb. 26). Es zeigte sich im Myokarditismodell der A.BY Maus eine hoch signifikante Induktion von IRF-7. Die relative Expressionshöhe blieb zwischen den Tagen 4 bis 12 nach Infektion ungefähr gleich. Am Tag 28 fällt die Expression hoch signifikant ab. Das Basalniveau von IRF-7 wurde jedoch am Tag 28 noch nicht erreicht.

4.4.2 Induktion der IRF-7 mRNA-Expression im Modell der C57Bl/6 Maus

Um den Induktionsgrad der IRF-7 Expression der C57Bl/6 Mäuse zu berechnen, wurde die auf 18S normierte absolute IRF-7 Expression der C57Bl/6 Mäuse auf den Mittelwert des Tag 0 in C57Bl/6 bezogen. Mit Hilfe des Wilcoxon-H-Test wurde der Induktionsgrad des IRF-7 in C57Bl/6 multipel an allen Tagen nach Infektion auf Signifikanz getestet. Abb. 27 zeigt das Ergebnis. Auch im Myokarditismodell der C57Bl/6 Maus zeigte sich eine hoch signifikante Induktion von IRF-7. Die IRF-7 Induktion der C57Bl/6 Mäuse erreichte schon an Tag 4 ihren höchsten Wert. Danach fiel die IRF-7 Expression sukzessive signifikant bis hoch signifikant ab. Am Tag 28 wurde der Basalwert annähernd erreicht.

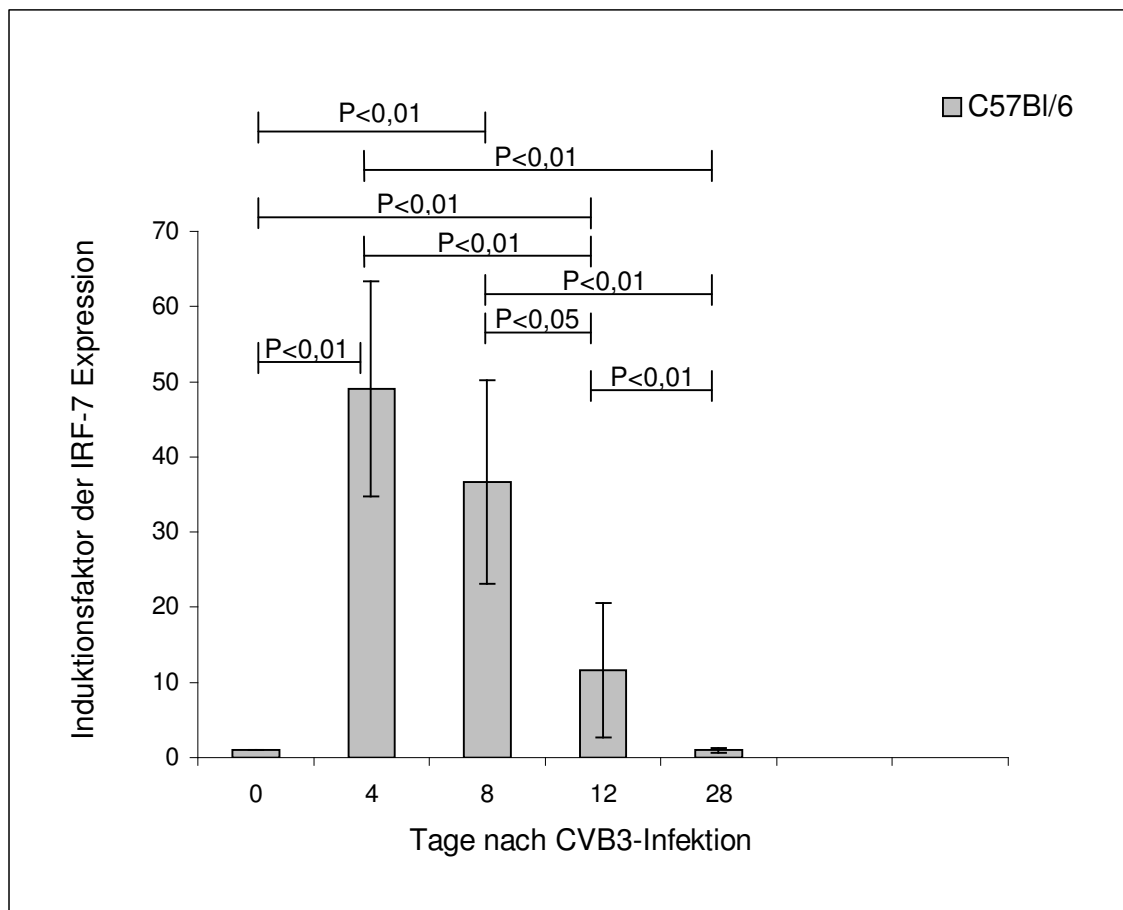


Abbildung 27

Induktionsgrad der kardialen IRF-7 mRNA Expression der C57Bl/6 Mäuse im CVB3-Infektionsverlauf. Die auf 18S normierte IRF-7 RT-qPCR Expression wurde auf den Mittelwert des Tag 0 der C57Bl/6 Maus bezogen. Gezeigt werden die Mittelwerte mit ihren jeweiligen SEM im zeitlichen CVB3-Infektionsverlauf. Verwendet wurde der Wilcoxon-H-Test.

4.4.3 Vergleich der Induktionsfaktoren der IRF-7 mRNA-Expression in beiden Myokarditismodellen im CVB3-Infektionsverlauf

Die IRF-7 Expression wurde im Myokarditismodell der C57Bl/6 Maus stärker und schneller induziert als im Myokarditismodell der A.BY Maus. An Tag 4 nach CVB3-Infektion zeigte sich ein hoch signifikanter Unterschied zwischen beiden Myokarditismodellen im Grad der Induktion. An Tag 12 nach CVB3-Infektion wurde ein stärkerer Abfall der IRF-7 mRNA-Expression im Modell der C57Bl/6 Maus ersichtlich, während im Modell der A.BY Maus die IRF-7 Expression noch erhöht blieb. An den Tagen 12 und 24 nach CVB3-Infektion zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Myokarditismodellen. Der Basalwert wurde im Modell der A.BY Maus nicht erreicht. IRF-7 wurde an Tag 28 nach CVB3-Infektion im Modell der C57Bl/6 Maus nicht mehr induziert. Abb. 28 zeigt den Vergleich des Induktionsfaktors der IRF-7 Expression in den beiden Myokarditismodellen im Verlauf der CVB3-Infektion.

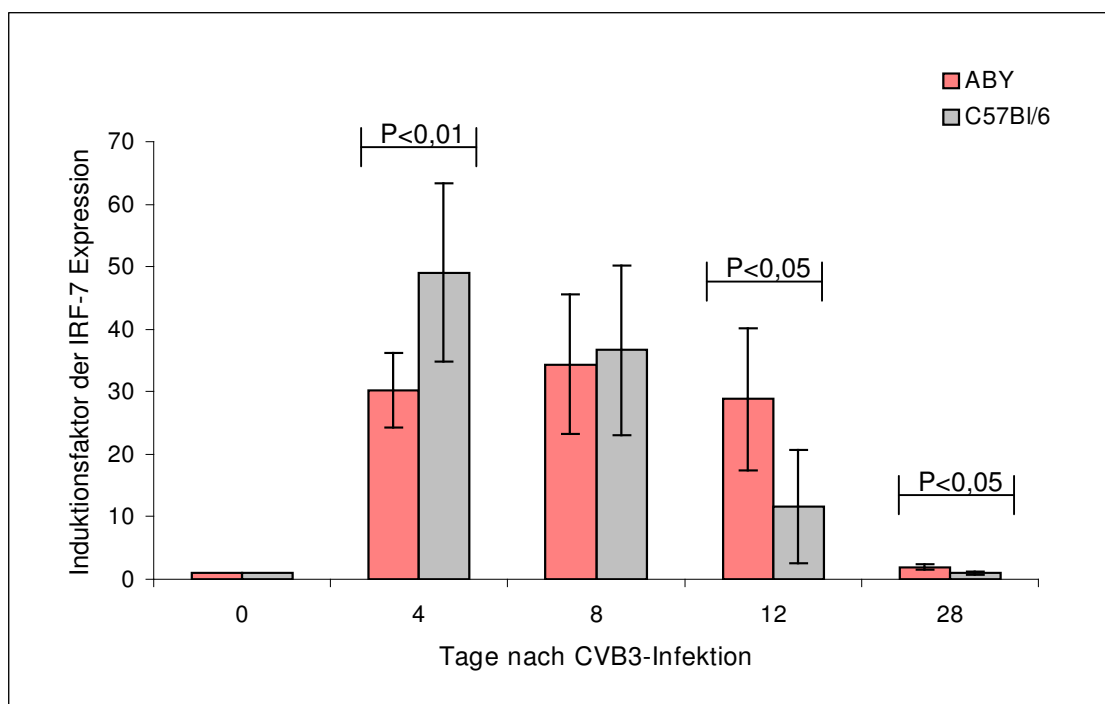


Abbildung 28

Induktionsgrade der kardialen IRF-7 mRNA Expression beider Myokarditismodelle im zeitlichen CVB3-Infektionsverlauf. Gezeigt werden die auf den Basalwert bezogenen Mittelwerte der IRF-7 RT-qPCR mit SEM für beide Myokarditismodelle. Verwendet wurde der Wilcoxon-H-Test. $P < 0,5$ gibt eine statistische Signifikanz an, $p < 0,01$ eine statistisch hohe Signifikanz an.

5. Diskussion

Die enterovirale Myokarditis ist eine potenziell lebensbedrohende Erkrankung. Die Entwicklung einer dilatativen Kardiomyopathie mit einer sehr schlechten Prognose stellt die Endphase der Myokarditis dar. Leider ist die Therapie der Myokarditis zum großen Teil nur supportiv. Diese Dissertation beschäftigte sich mit der Frage, warum einige Patienten eine chronische Myokarditis entwickeln und andere nicht. Die hier untersuchte Fragestellung bestand darin, mögliche Expressionsunterschiede von IRF-7, einem initialen Faktor in der virusvermittelten Signalkaskade, in zwei Mausmodellen mit unterschiedlichen Verlaufsformen der enteroviralen Myokarditis zu untersuchen. Die Entscheidung, ob eine CVB3-Infektion sich in einer akuten oder einer chronischen Verlaufsform der Myokarditis äußert, wurde in der unterschiedlich starken Induktion des IRF-7 vermutet. IRF-7 ist der Masterregulator der Expression der Typ I-Interferone, die wiederum eine herausragende Rolle in der frühen antiviralen Abwehr spielen. Die Ergebnisse dieser Arbeit wiesen einen unterschiedlichen Verlauf der IRF-7 mRNA Expression in den Myokarditismodellen der A.BY Maus und der C57Bl/6 Maus nach. Sie lieferten den Nachweis, dass IRF-7 mRNA im Myokarditismodell der A.BY Maus vermindert exprimiert wird im Vergleich zum Myokarditismodell der C57Bl/6 Mäuse. Zudem zeigten unsere Daten, dass der Zeitpunkt der stärksten IRF-7 Expression beim Myokarditismodell der A.BY Maus später eintritt als beim Modell der C57Bl/6 Maus. Damit könnten Ausmaß und Zeitpunkt der IRF-7 Induktion ein wichtiger differenzierender Faktor der Chronifizierung der Myokarditis sein.

Diese Arbeit bietet somit neue Einsichten in molekulare Pathophysiologie der viralen Myokarditis und liefert damit einen neuen Ansatz für eine kausale Therapie der enteroviralen Myokarditis.

5.1 Differentielle Expression von IRF-7 in Mausmodellen bei der chronischen und akuten enteroviralen Myokarditis

In der veröffentlichten Literatur wurde die Expression von *IRF-7* bei der Entwicklung einer akuten oder chronischen Myokarditis nach CVB3-Infektion noch nicht beschrieben. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass zwischen dem akutem und chronischem Myokarditisverlauf ein statistisch signifikanter Unterschied in der IRF-7 Expression besteht. IRF-7 wird im Modell der akuten Myokarditis stärker und rascher exprimiert als in der chronischen Verlaufsform.

Unsere Ergebnisse bieten einen neuen Einblick in den molekularen Mechanismus der innaten Immunantwort in der frühen Phase der CVB3-Infektion. In dieser Phase der CVB3-Infektion erfolgt die kardiale Induktion des IRF-7 rascher und robuster im Myokarditismodell der C57Bl/6 Maus als im Myokarditismodell der A.BY Maus. Die stärkste IRF-7 Expression erfolgt im Modell der C57Bl/6 Maus schon an Tag 4 nach CVB3-Infektion. Im Modell der A.BY Maus dagegen wird IRF-7 erst in der subakuten Phase, an Tag 8 nach CVB3-Infektion, am stärksten exprimiert. Diese Daten implizieren, daß IRF-7 eine Schlüsselrolle in der Entwicklung einer akuten oder chronischen Verlaufsform der Myokarditis haben könnte.

In beiden murinen Myokarditismodellen wurde IRF-7 stark induziert. Die Expression von IRF-7 im Myokarditismodell der C57Bl/6 Maus wird in der frühen Phase der CVB3-Infektion (Tag 4) um 43% stärker induziert als im Myokarditismodell der A.BY Maus, jeweils bezogen auf das Expressionsniveau in nichtinfizierten Kontrollen. Der Unterschied im Expressionsniveau beider Myokarditismodelle miteinander vergleichend, zeigte daß C57Bl/6 an Tag 4 nach CVB3-Infektion die 2,7-fache Expression der A.BY aufwies. Diese deutlich höhere kardiale IRF-7 Expression im Myokarditismodell der C57Bl/6 Maus war assoziiert mit lediglich einzelnen Myozytolyse und einzelnen mononukleäre Entzündungszellen (Schädigung Grad 1a). In den Herzen der A.BY-Mäuse an Tag 4 nach Infektion zeigten sich dagegen kleine Herde von Myozytolyse und einige wenige kleine Herde von Entzündungszellen (Schädigung Grad 2). In den in

dieser Arbeit untersuchten Mäuseherzen konnte die Tübinger Arbeitsgruppe signifikante Unterschiede bezüglich der myozytären Schädigung und Inflammation nachweisen (101). Sie zeigten, daß im Modell der A.BY Maus die Anzahl der pathologischen Veränderungen zu allen Zeitpunkten der Infektion signifikant höher lagen als im Modell der C57Bl/6 Maus. Während sich beim chronischen Modell bis Tag 28 gravierende histopathologische Veränderungen in Form großflächiger Nekrosen und ausgeprägter Entzündungszellinfiltration über beide Ventrikel (Grad 4) nachweisen ließen, bildeten sich beim Modell der C57Bl/6 Maus die histopathologischen Veränderungen bis Tag 28 weitgehend bis auf kleine Herde an Fibrose und evtl. einzelne mononukleäre Entzündungszellen zurück (Grad 1b). Das Maximum der IRF-7 Expression im Myokarditismodell der C57Bl/6 Maus war bereits an Tag 4 nach Infektion am höchsten. Die pathologischen Veränderungen waren dagegen erst an Tag 8 nach Infektion am stärksten ausgeprägt. Die Typ 1 INF-bedingte Aktivierung von Killerzellen und T-Zellen trat zeitverzögert auf. Da im Modell der A.BY Maus eine signifikant größere Anzahl von histopathologischen Veränderungen bestand, jedoch die Induktion von IRF-7, und damit vermutlich auch die Typ 1 Interferonantwort, aber signifikant geringer war als im Modell der C57Bl/6 Maus, müssten die histopathologischen Veränderungen zum großen Teil durch den CVB3 selbst verursacht worden sein. Wir vermuten, dass die rasche Induktion einer hohen IRF-7 Expression im Myokarditismodell der C57Bl/6 Maus zu einer robusten Typ 1 Interferonantwort und damit einer wirksamen Inhibition der CVB3-Replikation beigetragen habe. Die bereits ab Tag 4 deutlich erkennbaren und über den gesamten Analysezeitraum anhaltenden schweren histopathologischen Veränderungen im Myokarditismodell der A.BY Maus weisen auf eine unzureichende Virusabwehr im chronischem Modell hin (siehe Abschnitt 5.3), die durch eine ungenügende oder zu spät aktivierte Typ 1 Interferonantwort mitbedingt gewesen sein könnte.

Die anhaltend erhöhte IRF-7 Expression in der subakuten bzw. chronischen Phase der CVB3-Infektion der A.BY Maus - (noch am Tag 28 um 90% höher als der Kontrollwert) – scheint die Entwicklung einer chronischen Myokarditis nicht zu verhindern. In der subakuten bzw. chronischen Phase der CVB3-Infektion kann virale RNA und das virale Kapsidprotein VP1 im Herzen überleben (34, 35). Beim akutem Myokarditismodell der C57Bl/6 Maus ist laut Szalay die Viruslast am Tag 16 gleich Null (101). Währenddessen

ist beim Myokarditismodell der A.BY Maus zu diesem Zeitpunkt noch eine gleich hohe Virusreplikation wie an den Tagen 4 und 12 nach CVB3-Infektion nachzuweisen (101). Diese Viruspersistenz ist eine mögliche Erklärung für die noch signifikant erhöhte Induktion der IRF-7 Expression der A.BY Mäuse am Tag 28 nach CVB3 Infektion im Vergleich zum Tag 0.

5.2 Virusreplikation und kardiale IRF-7 Induktion

Ein Zusammenhang zwischen viraler Replikation während der CVB3-Myokarditis und der histopathologischen kardialen Veränderungen wurde mehrfach beschrieben. Klingel und Kollegen wiesen nach, dass eine Korrelation zwischen der viralen Replikation und der kardialen Läsionsbildung bei der akuten und der chronischen CVB3-Myokarditis existiert (102). In Abwesenheit einer CVB3-Replikation bilden sich keine neuen kardialen Entzündungsläsionen. Die Entwicklung einer chronischen Myokarditis ist abhängig von einer viralen Persistenz. Sie zeigten, dass in einem anderen Modell der akuten viralen Myokarditis (DBA Mäuse) die Anzahl der viralen positivsträngigen RNA im Vergleich zur Anzahl der negativsträngigen RNA, die als Template dienen, sehr stark erhöht ist. Im Gegensatz dazu ist in Modellen der chronischen viralen Myokarditis (A.BY, A.CA und SWR Mäuse) das Verhältnis der positiven und negativen RNA-Stränge in der chronischen Phase der CVB3-Infektion annähernd gleich. Die Viruspersistenz im chronischem Myokarditismodell ist folglich assoziiert mit einer eingeschränkten RNA-Synthese im Vergleich zum akutem Myokarditismodell. Die verminderte RNA-Synthese ist auch assoziiert mit einer verminderten Synthese von enteroviralen Kapsidprotein in den chronisch infizierten Myokardzellen (33).

Bestätigt wurde dies auch durch Szalay et al., die mittels Real-Time-PCR zeigten, dass am Tag 16 nach CVB3-Infektion im akutem Myokarditismodell (C57Bl/6) keine virale RNA im Myokard mehr nachgewiesen werden konnte. Bei den A.BY Mäusen dagegen konnte Szalay eine Persistenz des Coxsackievirus noch am Tag 28 nach Infektion nachweisen (103).

Mittels in situ Hybridisierung zum Nachweis viraler RNA konnten Klingel et al. zeigen, dass bis zu Tag 9 nach CVB3-Infektion bis zu 13% des kardialen Gewebes infiziert ist. Im Vergleich dazu zeigte sich während der chronischen Myokarditis am Tag 30 nach CVB3-Infektion nur 0,01% des kardialen Gewebes als infiziert was anscheinend ausreichend ist für das Weiterbestehen der myokardialen Inflammation. Laut Klingel überleben die infizierten Myozyten während der akuten viralen Replikation ungefähr 24 h (33).

Die in dieser Arbeit gezeigten Daten zum zeitlichen Verlauf der kardialen IRF-7 mRNA-Expression scheint einen Zusammenhang mit der kardialen Viruslast und myokardialen Schädigung nahelegen. Die geringere kardiale Viruslast und schnellere Viruselimination im Modell der C57Bl/6 Maus scheint mit einer robusteren Induktion von IRF-7 assoziiert zu sein. Im Unterschied hierzu scheint die höhere Viruslast und die Chronifizierung der Infektion im Modell der A.BY Maus mit einer vergleichsweise schwächeren IRF-7 Induktion assoziiert zu sein.

Die Expression von IRF-7 Protein wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Versuche der betreuenden Arbeitsgruppe einer Darstellung von IRF-7 mittels Western Blot unter Verwendung verschiedener kommerziell erhältlicher Antikörper waren nicht erfolgreich. Zum Zeitpunkt der Untersuchungen war jedoch auch der Nachweis von IRF-7 Protein in Gewebextrakten in der publizierten Literatur nicht beschrieben. Die Expression der Typ I Interferone als Zielgene von IRF-7 wurde in dieser Arbeit ebenfalls nicht untersucht. Es kann deshalb nur spekuliert werden, dass die kardiale Expression von Typ I Interferone im Modell der C57Bl/6 Maus stärker und rascher erfolgt als im Modell der A.BY Maus.

Honda wies 2005 bei IRF-7 Knock out Mäusen eine verminderte Induktion der Interferone während der HSV-1, VSV und EMCV-Infektion nach und bestätigte damit die essentielle Rolle des IRF-7 als Masterregulator der Interferone.

Unsere Ergebnisse zeigen zudem, daß die basale kardiale IRF-7 Expression in nicht infizierten Kontrollmäusen des Stamms C57Bl/6 um 64% höher war als in nicht infizierten Kontrollmäusen des Stamms A.BY. Die biologische Bedeutung dieses Unterschieds ist ungeklärt. Möglicherweise reflektiert die höhere basale Expression in C57Bl/6-Mäusen eine weniger straffe transkriptionelle Kontrolle der IRF-7 Expression als Grundlage einer schnelleren und stärkeren Induktion bei einer viralen Attacke. Möglicherweise spielen Polymorphismen in regulatorischen Bereichen des *IRF-7* Gens eine Rolle. Bekannt sind zwei verschiedene Promoterregionen für das *IRF-7* Gen. Ob eine unterschiedliche Utilisation dieser Promotoren für die unterschiedlich starke Induktion von IRF-7 in den beiden Stämmen eine Rolle spielt, ist denkbar.

Weiterhin stellt sich die Frage, von welchen kardialen Zelltypen in den hier untersuchten murinen Modellen IRF-7 exprimiert wurde. Für diese Arbeit wurde RNA aus dem Gesamtherzen isoliert. IRF-7 könnte somit von T-Zellen, B-Zellen, Granulozyten, Endothelzellen, Myozyten, Fibroblasten und/oder Makrophagen exprimiert worden sein. Sind migratorische Zellen für die erhöhte Expression von IRF-7 verantwortlich oder residente Zellen? Da sich zu einem frühen Zeitpunkt der kardialen Infektion noch keine größeren Infiltrate gebildet haben (siehe Kapitel 4.3), muß IRF-7 vermutlich von residenten kardialen Zellen (Myozyten, Fibroblasten, Endothelzellen) induziert worden sein. Ousman zeigte, dass im ZNS bei LCMV-Infektion IRF-7 sowohl von infiltrierenden Immunzellen als auch von residenten Zellen exprimiert wurde (104).

Im Unterschied zu der IRF-7 mRNA Expression zeigte IRF-3, das sehr früh im Verlauf der antiviralen Abwehr aktiviert wird (vgl. Abb. 6), auf Proteinebene keine Induktion der Expression (unveröffentlichte Ergebnisse der betreuenden Arbeitsgruppe).

5.3 Diskussion der angewandten Methoden

Zhang und Pagano (86) konnten schon 1997 die Induzierbarkeit von IRF-7 nachweisen. Prakash zeigt, dass IRF-7 auf transkriptionaler Ebene reguliert wird (105). Damit ist die Expression der IRF-7 mRNA nach CVB3-Infektion ein Ausdruck der Induktion des IRF-7 während der CVB3-Infektion. Deshalb wurde in dieser Arbeit die IRF-7 Expression auf mRNA Ebene untersucht. Ein sicherer Nachweis der IRF-7 Expression auf Proteinebene gelang in der betreuenden Arbeitsgruppe trotz umfangreicher mittels Western blot-Serien unter Verwendung verschiedener IRF-7 Antikörper nicht, so dass die RNA-Daten nicht auf Proteinebene bestätigt werden konnten. Bemerkenswert ist, dass zum Zeitpunkt dieser Arbeit in der publizierten Literatur ein Nachweis des nativen IRF-7 in Geweben oder Zellen nicht beschrieben war, was auf ungelöste und grundlegende methodische Schwierigkeiten hindeutet. Unsere Literaturrecherche zeigte, dass IRF-7 als Protein bisher nur in Zellkulturexperimenten nach Transfektion eines getaggtten Fusionsprotein nachgewiesen wurde (94, 86).

Im Bestreben, möglichst einfach umzusetzende, standardisierte und reproduzierbare Techniken zu nutzen, wurden wo möglich (DNA-Verdau, Reverse Transkription, PCR, TaqMan, Klonierung der cDNA), kommerzielle Kits eingesetzt.

Eine hohe Ausbeute und gute Qualität der RNA ist vom ersten Schritt der RNA-Isolierung abhängig. Da die RNA sehr instabil und empfindlich gegenüber endogenen RNAsen ist, musste die RNA-Isolierung schnell vonstatten gehen. Dafür wurde ein Teflon-Glas-Homogenisator benutzt, womit das Gewebezerkleinern und Homogenisieren der Herzen in einem einzigen Arbeitsschritt ermöglicht wurde. Dies reduzierte den Gewebeverlust, die Dauer der RNA Isolierung und die Kontaminationsgefahr. Die RNA-Reinheit, RNA-Qualität und RNA-Quantität wurden mit verschiedenen Methoden überprüft. Die Integrität der isolierten RNA wurde mittels des Bioanalyser analysiert. Die Quantität der isolierten RNA ist ausreichend, um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse mit denselben Proben zu gewährleisten. Der Erfolg des DNA-Verdau wurde mittels Gelelektrophorese der PCR RT⁻ Produkte evaluiert und bestätigt. Eine Amplifikation genomischer DNA konnte somit ausgeschlossen werden.

Die mittels des Suchalgorithmus BLAST designten IRF-7 BW und IRF-7 BWn Primer stellten sich als nicht spezifisch für das IRF-7 Amplikon dar. In der Gelelektrophorese nach der konventionellen PCR zeigten sich Doppelbanden. Diese beruhten sehr wahrscheinlich auf IRF-7 Spleissvarianten. Die IRF-7 BW3 Primer überspannten dagegen nicht alternative IRF-7 Exone, so dass nur ein Amplifikationsprodukt gebildet wurde. Beide IRF-7 BW3 Primer binden an das Exon 7* der genomischen DNA von IRF-7 und überbrückten kein Intron. Hiermit bestand die Möglichkeit einer Koamplifikation von genomischer DNA, die durch DNase-Verdau und negative RT⁻ Kontrollen ausgeschlossen werden konnte.

Als PCR Methoden stehen sowohl die konventionelle Gel-basierte PCRs, als auch die Real-Time-PCRs zur Verfügung. Real-Time-PCRs bieten im Vergleich zur konventionellen PCR eine exakte Quantifizierung, eine erheblich höhere Sensitivität (106) und insgesamt einen geringeren Arbeits-, Material- und Zeitaufwand. Eine gut etablierte, robuste und weit verbreitete Technik stellt die 1993 von Lee und Mitarbeitern entwickelte TaqMan-Real-Time-PCR (107) dar. Wir verwendeten die TaqMan-Real-Time-PCR mit interkalierenden Farbstoffen (SYBR-Green). Die Vorteile von Real-Time-PCR sind, dass die Qualität der Messung durch Erstellung einer Schmelzkurve einfach zu überprüfen ist und es kostengünstiger ist, weil keine spezifische Sonde verwendet wird. Der Nachteil der SYBR-Green Chemie ist, dass der Fluoreszenzfarbstoff an jede doppelsträngige DNA bindet, wie z.B. unspezifische PCR-Produkte oder Primerdimere. Um die Möglichkeit der Bildung von Primerdimere und unspezifischer Produkte auszuschließen, wurde für jede PCR eine Dissoziationskurve erstellt. Diese gibt an, ob das gemessene PCR-Produkt spezifisch amplifiziert wurde. In dieser Arbeit waren alle Dissoziationskurven spezifisch für ihr jeweiliges Amplifikat. Zudem kann auch mittels der Gelelektrophorese nachgewiesen werden, ob verschieden große PCR-Produkte amplifiziert wurden, wenn diese oberhalb der Markernachweisgrenze liegen.

Für die Quantifizierung der mRNA wurde die Standardkurvenmethode verwendet. Hier ist die Steigung der Standardkurven ausschlaggebend für die Effizienz der Messung. Die Standardkurven der jeweiligen Gene sollten auf allen 96-Well-Platten die gleiche

Effizienz haben. In dieser Arbeit zeigten die Standardkurven die gleiche PCR-Effizienz von 99,8% für IRF-7 bzw. 99,9% für 18S. Von jeder Probe wurde eine Dreifachbestimmung gemessen, um Ausreißer durch Pipettierfehler aufzudecken. Eine Quantifizierung mit der Standardkurvenmethode bietet eine Quantifizierung in einem dynamischen Bereich von 7 Zehnerpotenzen und damit den Vergleich von Proben mit sehr unterschiedlichen Mengen an Ausgangsmaterial. Mit einer Quantifizierung ohne Standard wären die Kosten und der Zeitaufwand verringert, die Vergleichbarkeit der Daten aber eingeschränkt. Die Standards dieser Arbeit liefen in den TaqMan-Real-Time-PCRs mit interkalierenden Farbstoffen (SYBR-Green) mit einer sehr hohen PCR-Effizienz und sind reproduzierbar.

5.4 IRF-7 Splice-Variante

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine neuartige alternative Splice-Variante des murinen IRF-7 in nichtinfizierten Herzen und in CVB3-infizierten Herzen der A.BY und C57Bl/6 Maus nachgewiesen werden. Diese IRF-7 Splice-Variante konnte in Leber und Aorta beider Mausstämme nicht detektiert werden. Somit muß von einer Herzspezifität ausgegangen werden.

Diese Splice-Variante behält das zwischen den Exon 8 und 9 liegende Intron bei. Zu einer Verschiebung des Leserahmens kommt es dabei nicht, da kein zusätzliches Stopcodon in dieser Splice-Variante vorhanden ist und die Nukleotidanzahl genau 25 zusätzlichen Aminosäuren entspricht. Auch bei Verwendung von anderen IRF-7 Primern (IRF-7 BWn) konnte dieses zusätzliche größere Amplifikat in der PCR entdeckt werden. Eine Verunreinigung der Proben mit genomischer DNA konnte durch Durchführung eines DNA-Verdau und durch die Kontrolle der Reversen Transkription ausgeschlossen werden. Die Sequenzierung und Vergleich der neuartigen PCR-Sequenz mit der IRF-7 cDNA Sequenz der NCBI Gendatenbank zeigten, dass es sich bei dem Amplifikat um eine IRF-7 Sequenz handelt. Da diese Sequenz genau dem zwischen den Exon 8 und 9 liegendem Intron entspricht, eine genomische DNA-Kontamination durch DNA-Verdau und Kontrolle der RT ausgeschlossen werden

konnte, lag somit offenbar eine alternative Splice-Variante der prä-mRNA mit Beibehaltung eines Intron vor. Im Rahmen dieser Arbeit wurde jedoch aufgrund der anderen Hauptfragestellung auf eine Klonierung und Charakterisierung der Vollängentranskripte mit dem neuen Exon 7* verzichtet. In der publizierten Literatur wurden bisher 7 verschiedenen Isoformen des murinen IRF-7 beschrieben. Entstanden sind diese entweder durch alternatives Spleißen, alternative Promotoren oder durch alternative Termination (100). Auch vom humanem IRF-7 sind 4 Isoformen (IRF-7 A, B, C und H) bekannt (85, 86).

5.5 Therapeutische Implikation

Kishimoto et al. beschrieb schon 1988, dass Interferon- α die virale Replikation bei CVB3-infizierten Mäusen inhibiert und die myokardiale Entzündung reduziert, wenn es kurz vor der Infektion gegeben wurde (108). Durch Behandlung von CVB3-infizierten Mäusen mit dem M-CSF an den Tagen 0 bis 14 nach Infektion, konnte die kardiale Erkrankung signifikant verbessert werden. Die Reduktion der myokardialen Pathologie und der viralen Titer korrelierte direkt mit der Interferon- α -Erhöhung im Serum, das durch M-CSF induziert wurde (109). Encephalomyokarditis-Virus-infizierte Mäuse, die mit Immunosuppressiva und Interferon- α behandelt wurden, haben eine höhere Überlebensrate als solche, die ohne Interferon- α , also nur mit Immunosuppressiva behandelt wurden (110). Auch Matsumori beschrieb einen hemmenden Effekt von rekombiniertem Interferon- α auf die CVB3-Infektion bei Mäusen. Er zeigte, dass Interferon-alpha A/D die Replikation des myokardialen Virus effektiv inhibiert und die Entzündungsantwort und den myokardialen Schaden signifikant reduzierte, wenn es einen Tag vor CVB3-Infektion oder simultan zur CVB3-Infektion subkutan den Mäusen verabreicht wird (111, 112).

Auch bei der humanen Myokarditis zeigten Interferon-Behandlungen positive Effekte. Eine Studie untersuchte den Effekt von Interferon- α auf die inflammatorische Kardiomyopathie (113) Verglichen mit den Patienten, die mit der konventionellen Therapie für chronische Herzinsuffizienz behandelt wurden, zeigten die Patienten, die

zusätzlich zur konventionellen Therapie auch mit einer Interferon- α Therapie behandelt wurden, Verbesserungen in der linksventrikulären Ejektionsfraktion. Die Nebeneffekte der Interferonbehandlung waren relativ mild. Patienten beklagten Grippeähnliche Symptome, Müdigkeit und ein allgemeines Krankheitsgefühl. Diese Nebenwirkungen der Interferonbehandlung verschwanden nach wiederholten Interferon-Injektionen und waren im Allgemeinen nach 10 Behandlungstagen nicht mehr vorhanden. Zudem wurde von Kühl et al. nachgewiesen, dass die für eine Periode von 24 Wochen verabreichte Gabe von Interferon- β für Patienten mit enteroviraler und/oder adenoviraler Myokarditis und eingeschränkter linksventrikulären Ejektionsfraktion, die kardiale Funktion bei etwa 60% der Fälle signifikant verbesserte und das virale Genom bei allen untersuchten Patienten vollständig eliminiert wurde (114). Interessant ist auch, dass Patienten mit einer fulminanten akuten Myokarditis eine signifikant bessere Überlebensrate haben als Patienten mit einer akuten nichtfulminanten Myokarditis (13). Eine ineffiziente Interferonantwort auf eine virale Infektion scheint die Chronifizierung der Infektion zu begünstigen.

Beim Menschen ließe sich eine frühe Interferon-Therapie nur bei der fulminanten akuten Myokarditis umsetzen, da diese Verlaufsform aufgrund ihrer heftigen Symptome im frühen Stadium erkannt wird (114). Aber auch eine zum späteren Zeitpunkt erfolgende Interferonbehandlung bewirkt eine Verbesserung der Hämodynamik und viralen Clearance (113). Komplette Wiederherstellung der kardialen Funktion erscheint jedoch nur möglich zu sein, solange noch keine virusinduzierten oder immunvermittelten irreversiblen myokardialen Schäden verursacht wurden.

6. Zusammenfassung

Die enterovirale Myokarditis ist eine potenziell lebensbedrohende Erkrankung. Die Endphase der Myokarditis ist die Entwicklung einer dilatativen Kardiomyopathie mit einer sehr schlechten Prognose. Die Therapie der dilatativen Kardiomyopathie ist zum großen Teil symptomorientiert.

Ziel dieser Dissertation war zu untersuchen, ob sich die kardiale Expression von IRF-7 in zwei Mausmodellen der CVB3-Myokarditis im Zeitverlauf nach Infektion unterscheidet. Untersucht wurden C57Bl/6-Mäuse, die das Virus eliminieren, und A.BY-Mäuse, die eine chronische Myokarditis mit viraler Persistenz entwickeln. IRF-7 ist entscheidend an der Regulation der antiviralen frühen Interferonantwort beteiligt.

Dafür wurde RNA aus gefrorenen Herzen dieser Mausstämme zu definierten Zeitpunkten nach CVB3-Infektion isoliert. Nach Bestimmung von Reinheit, Qualität und Quantität der RNA wurde die Expression der IRF-7 mRNA mittels Real-Time-PCR quantifiziert und die Expression jeweils auf die 18S rRNA als endogener Standard bezogen.

Die vorgelegten Ergebnisse zeigen, dass die kardiale IRF-7 mRNA Expression in beiden Mausmodellen am Tag 4 im Vergleich zu nichtinfizierten Mäusen stark induziert war. C57Bl/6 Mäuse zeigten am Tag 4 im Vergleich zu A.BY Mäusen jedoch eine 2,7-fache stärkere Expression, die bei C57Bl/6 Mäusen ab Tag 8 wieder abnahm. Während C57Bl/6 Mäuse bereits am Tag 4 das Expressionsmaximum erreichten, zeigten A.BY Mäuse die maximale IRF-7 Expression verzögert am Tag 8, wobei das Niveau der C57Bl/6-Maus nicht erreicht wurde. Die IRF-7 mRNA-Expression blieb bei der A.BY-Maus im Unterschied zu C57Bl/6-Maus bis Tag 28 (jeweils im Vergleich zu nichtinfizierten Kontrollen) deutlich erhöht. Als weiteres Ergebnis dieser Dissertation konnte zudem ein neues kardial exprimiertes IRF-7 Exon identifiziert werden.

Diese Ergebnisse zeigten bei der C57Bl/6-Maus, die zu einer Elimination von CVB3 imstande ist, eine schnellere und stärkere kardiale Induktion von IRF-7 als bei der A.BY-Maus. Eine schnelle und robuste kardiale IRF-7 Induktion scheint demnach eine Voraussetzung für eine effiziente Elimination des Virus zu sein.

Anhang

Referenzen

1. Saphir O. 1941. Myocarditis: a general review, with an analysis of 240 cases. *Arch Pathol.* 32:1000-1051
2. Gore I, Saphir O. 1947. Myocarditis: a classification of 1402 cases. *Am Heart J.* 34:827-830
3. Drory Y, Turetz Y, Hiss Y, Lev B, et al. 1991. Sudden unexpected death in persons less than 40 years of age. *Am J Cardiol.* 68:1388-1392
4. Aretz HT, Billingham ME, Edwards WD, et al. 1987. Myokarditis. A histopathologic definition and classification. *Am. J Cardiovas. Pathol.* 1:3-14
5. McManus BM, Kandolf R. 2000. Myokarditis. In *Atlas of Cardiovascular Pathologie for the clinician*, ed. BM McManus, pp. 168-183. Philadelphia: Curr. Med.
6. Morris SA, Tanowitz HB, Wittner M, et al. 1990. Pathophysiological insights into the cardiomyopathy of Chagas` disease. *Circulation* 82:1900-1909
7. Grist NR, Reid D. 1997. Organisms in myocarditis/endocarditis viruses. *J. Infect.* 34:155
8. Mahrholdt H, Wagner A, Deluigi C, et al. 2006. Presentation, Patterns of Myocardial Damage, and Clinical Course of Viral Myocarditis. *Circulation.* 114:1581-1590
9. Maisch B, Alter P, Karatolius K, et al. 2007. Das Herz bei viralen, bakteriellen und parasitären Infektionen. *Der Internist* 48:255-267
10. Maisch B, Portig I, Ristic AD et al. 2000. Definition of inflammatory cardiomyopathy (myocarditis): on the way to consensus – a status report. *Herz.* 25:200-209
11. Aretz HT. 1987. Myokarditis: the Dallas criteria. *Hum Pathol.* 18:619-624
12. Kim KS, Hufnagel G, Chapman NM, et al. 2001. The group B coxsackieviruses and myocarditis. *Rev. Med. Virol.* 11:355-368

13. McCarthy R, Boehmer J, Hruban R, et al. 2000. Long-Term Outcome of fulminant myocarditis as compared with acute (nonfulminant) myocarditis. *N Engl J Med.* 10:690-695
14. Esfaniarei M, McManus BM. 2008. Molecular Biology and Pathogenesis of Viral Myokarditis. *Annu. Rev. Path. Mech. Dis.* 3:127-155
15. Mendes L, Picard M, Dec G, et al. 1999. Ventricular remodeling in active myocarditis. Myocarditis Treatment Trial. *Am Heart J* 138:303-308
16. Feldman A, McNamara D. 2000. Myocarditis. *N Engl J Med.* 11.1388-1398
17. Kawai C. 1999. From Myocarditis to Cardiomyopathy: Mechanisms of Inflammation and Cell Death. *Circulation.* 99:1091-1100
18. Klingel K, Hohenadl C, Canu A, et el. 1992. 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* 89:314-318
19. Klingel K, Kandolf R. 1993. The role of enterovirus replication in the development of acute and chronic heart muscle disease in different immunocompetent mouse strains. *Scand J Infect Dis* 88:Suppl:79-85
20. Rabin ER, Hassan SA, Jenson AB, et al. 1964. Coxsackievirus B3 myocarditis in mice. An electron microscopic, immunofluorescent and virus-assay study. *Am. J. Pathol.* 44:775-797
21. Melnick JL, Godman GC. 1951. Pathogenesis of coxsackievirus infection; multiplication of virus and evolution of the muscle lesion in mice. *J. Exp. Med.* 93:247-266
22. Chow LH, Gauntt CJ, McManus BM. 1991. Differential effects of myocarditic variants of coxsackievirus B3 in inbred mice. A pathologic characterization if heart tissue damage. *Lab. Invest.* 64:55-64
23. McManus BM, Chow LH, Wilson JE, et al. 1993. Direct myocardial injury by enterovirus: a central role in the evolution of murine myocarditis. *Clin. Immunol.Immunopathol.* 68:159-169

24. Seko Y, Takahashi N, Yagita H, et al. 1997. Expression of cytokine mRNAs in murine hearts with acute myocarditis caused by coxsackievirus B3. *J. Pathol.* 183:105-108
25. Fuse K, Chan G, Liu Y, et al. 2005. Myeloid differentiation factor-88 plays a crucial role in the pathogenesis of Coxsackievirus B3-induced myocarditis and influences type I interferon production. *Circulation.* 112:2276-2285
26. Cho CT, Feng KK, McCarthy VP, et al. 1982. Role of antiviral antibodies in resistance against coxsackievirus B3 infection: interaction between preexisting antibodies and an interferon inducer. *Infect. Immun.* 37:720-727
27. Godeny EK, Gauntt CJ. 1986. Involvement of natural killer cells in coxsackievirus B3- induced murine myocarditis. *J. Immunol.* 137:1695-16702
28. Koike H, Kanda T, Sumino H, et al. 2001. Reduction of viral myocarditis in mice lacking perforin. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* 110:229-237
29. Kishimoto C, Kuribayashi K, Masuda T, et al. 1985. Immunologic behavior of lymphocytes in experimental viral myocarditis: significance of T lymphocytes in the severity of myocarditis and silent myocarditis in BALB/c-nu/nu mice. *Circulation* 71:1247-1254
30. Seko J, Tsuchimochi H, Nakamura T, et al. 1990. Expression of major histocompatibility complex class I antigen in murine ventricular myocytes infected with coxsackievirus B3. *Circ. Res.* 67:360-367
31. Seko J, Matsuda H, Kato K, et al. 1993. Expression of intercellular adhesion molecule-1 in murine hearts with acute myocarditis caused by coxsackievirus B3. *J. Clin. Invest.* 91:1327-1336
32. Huber SA, Stone JE, Wagner DH Jr, et al. 1999. Gamma & T cells regulate major histocompatibility complex class II(IA and IE)-dependent susceptibility to coxsackievirus B3-induced autoimmune myocarditis. *J. Virol.* 73:5630-5636
33. Klingel K, Schnorr S, Sauter M, et al. 2003. B2-Microglobulin-associated regulation of Interferon- γ and Virus-specific Immunoglobulin G confer resistance against the development of chronic Coxsackievirus myocarditis. *Am. J. Pathol.* 162:1709-1720

34. Kyo B, Matsumori A, Sato Y, et al. 1992. Cardiac persistence of cardioviral RNA detected by polymerase chain reaction in a murine model of dilated cardiomyopathy. *Circulation* 86:522-530
35. Li Y, Bourlet T, Andreotti L, et al. 2000. Enteroviral capsid protein VP1 is present in myocardial tissues from some patients with myocarditis or dilated cardiomyopathy. *Circulation* 101:231-23435.
36. Matsumori A, Yamada T, Suzuki H, et al. 1994. Increased circulating cytokines in patients with myocarditis and cardiomyopathy. *Br. Heart J.* 72:561-566
37. Gillespie JS, Cavanagh HM, Behan WM, et al. 1993. Increased transcription of interleukin-6 in the brains of mice with chronic enterovirus infection. *J. Gen. Virol.* 74:741-743
38. Gluck B, Schmidtke M, Merkle I, et al. 2001. Persistent expression of cytokines in the chronic stage of CVB3-induced myocarditis in NMRI mice. *J. Mol. Cell Cardiol.* 33:1615-1626
39. Baboonian C, Davies MJ, Booth JC, et al. 1997. Coxsackievirus B viruses and human heart disease. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 223:31-52
40. Dalldorf G. 1955. The coxsackie viruses. *Annu. Rev. Microbiol.* 9:277-296
41. Baboonian C, Treasure T. 1997. Meta-analysis of the association of enteroviruses with human heart disease. *Heart.* 78:539-543
42. Grumbach IM, Heim A, Pring-Akerblom P, et al. 1999. Adenoviruses and enteroviruses as pathogens in myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Acta Cardiol.* 54:83-88
43. Tam P. 2006. Coxsackievirus Myocarditis: Interplay between Virus and Host in the Pathogenesis of Heart Disease. *Viral Immunology.* 19:133-146
44. Nicholson-Weller A, Wang CE. 1994. Structure and function of decay accelerating factor CD55. *J. Lab. Clin. Med.* 123:485-491
45. Cohen CJ, Shieh JT, Pickles RJ, et al. 2001. The coxsackievirus and adenovirus receptor is a transmembrane component of the tight junction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:15191–15196
46. Coyne CB, Bergelson JM. 2006. Virus-induced Abl and Fyn kinase signals permit coxsackievirus entry through epithelial tight junctions. *Cell* 124:119-131

-
47. Noutsias M, Fechner H, Schultheiss HP, et al. 2001. Human coxsackieadenovirus receptor is colonized with integrins $\{\alpha\}\{\beta\}_3$ and $\{\alpha\}\{\beta\}_5$ on the cardiomyocyte sarcolemma and upregulated in dilated cardiomyopathy: implications for cardiotropic viral infections. *Circulation*. 104:275–280.
 48. Vincent T, Pettersson RF, Crystal RG, et al. 2004. Cytokine-mediated downregulation of coxsackievirus-adenovirus receptor in endothelial cells. *J. Virol*. 78:8047–8058.
 49. Pelletier J, Kaplan G, Racaniello VR, et al. 1988. Cap-independent translation of poliovirus mRNA is conferred by sequence elements within the 5′ noncoding region. *Mol. Cell Biol*. 8:1103-1112
 50. Wimmer E, Hellen CU, Cao X. 1993. Genetics of poliovirus. *Annu. Rev. Genet*. 27:353-436
 51. Ziegler E, Borman AM, Deliat FG, et al. 1995. Picornavirus 2A proteinase-mediated stimulation of internal initiation of translation is dependent on enzymatic activity and the cleavage products of cellular proteins. *Virology* 213:549-557
 52. Yalamanchili P, Datta U, Dasgupta A. 1997. Inhibition of host cell transcription by poliovirus: cleavage of transcription factor CREB by poliovirus-encoded protease 3C^{pro}. *J. Virol*. 71:1220-1226
 53. Chau D, Yuan J, Zhang H, et al. 2007. Coxsackievirus B3 proteases 2A and 3C induce apoptotic cell death through mitochondrial injury and cleavage of e14GI but not DAP5/p97/NAT1. *Apoptosis* 12:513-524
 54. Badorff C, Lee GH, Lampher BJ, et al. 1999. Enteroviral protease 2A cleaves dystrophin: evidence of cytoskeletal disruption in an acquired cardiomyopathy. *Nat. Med*. 5:320-326
 55. Van Kuppeveld FJ, Hoenderop JP, Smeets RL, et al. 1997. Coxsackievirus protein 2B modifies endoplasmatic reticulum membrane and plasma membrane permeability and facilitates virus release. *EMBO J*. 16:3519-3532
 56. Kandolf R, Hofschneider PH. 1985. Molecular cloning of the genome of a cardiotropic Coxsackie B3 virus: Full-length reverse-transcribed recombinant

- cDNA generates infectious virus in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 4818-4822
57. Chapman NM, Tu Z, Tracy S, et al. 1994. An infectious cDNA copy of the genome of a non-cardiovirulent coxsackie B3 strain: its complete sequence analysis and comparison to the genomes of cardiovirulent coxsackieviruses. *Arch. Virol.* 135:115-130
 58. Leslie KO, Schwarz J, Simpson K, et al. 1990. Progressive Interstitial Collagen Deposition in Coxsackievirus B3-induced Murine Myocarditis. *Am. J. Path.* 136: 683-692
 59. Tu Z, Chapman N, Hufnagel G, et al. 1995. The cardiovirulent phenotype of coxsackievirus B3 is determined at a single site in the genomic 5' non-translated region. *J. Virol.* 69:4607-4618
 60. Takeda K, Kaisho T, Akira S. 2003. Toll-like-receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 21:335-376
 61. Takeuchi O, Akira S. 2007. Recognition of viruses by innate immunity. *Immunological Reviews.* 220:214-224
 62. Iwasaki A, Medzhitov R. 2004. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* 5:987-995
 63. Hemmi H, et al. 2002. Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat. Immunol.* 3:196-200
 64. Oganessian G, et al. 2006. Critical role of TRAF3 in the Toll-like receptor-dependent and -independent antiviral response. *Nature* 439:208-211
 65. Hacker H, et al. 2006. Specificity in Toll-like receptor signaling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6. *Nature* 439:204-207
 66. Kawai T, et al. 2004. Interferon-alpha induction through Toll-like receptors involves a direct interaction of IRF-7 with MyD88 and TRAF6. *Nat. Immunol.* 5:1061-1068
 67. Honda K, et al. 2004. Role of a transductional-transcriptional processor complex involving MyD88 and IRF-7 in Toll-like receptor signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 15416-15421

-
68. Uematsu S, et al. 2005. Interleukin-1 receptor-associated kinase-1 plays an essential role for Toll-like receptor (TLR)7 – and TLR9-mediated interferon- α induction. *J. Exp. Med.* 201:915-923
 69. Hoshino K, et al. 2006. IKK- α is critical for INF- α production induced by TLR7 and 9. *Nature* 440:949-953
 70. Takeuchi O, Akira S. 2007. Signaling pathways activated by microorganisms. *Current Opinion in Cell Biology.* 19:185-191
 71. Yamamoto M, et al. 2002. Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN- β promoter in the TLR-signaling. *J. Immunol.* 169:6668-6672
 72. Sato S, et al. 2003. Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN- β (TRIF) associates with TNF receptor-associated factor 6 and TANK-binding kinase 1, and activates two distinct transcription factors, NF- κ B and IRF-3 , in the TLR signaling. *J. Immunol.* 171:4304-4310
 73. Schulz O, et al. 2005. TLR3 promotes cross-priming to virus-infected cells. *Nature* 433:887-892
 74. Uematsu S, Akira S. 2007. Toll-like Receptors and Type I Interferons. *J. Biol. Chem.* 282:15319-15324
 75. Kalinke U, et al. 2000. Type I interferons in anti-viral immune responses. *EMBL* 1-4
 76. Honda K, Takaoka A, Taniguchi T. 2006. Type I interferon gene induction by the interferon regulatory family of transcription factors. *Immunity* 25:349-360
 77. Stetson DB, Medzhitov R. 2006. Type I interferons in host defense. *Immunity* 25:373-381
 78. Taniguchi T, Takaoka A. 2002. The interferon- α/β system in antiviral responses: a multimodal machinery of gene regulation by the IRF family of transcription factors. *Immunology* 14:111-116
 79. Honda K, Yanai H, Taniguchi T, et al. 2005. IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature* 434:772-777
 80. Taniguchi T, Ogasawara K, Takaoka A, et al. 2001. IRF Family of Transcription Factors as Regulators of Host Defense. *Annu. Rev. Immunol.* 19:623-655

81. Harada H, Fujita T, Miyamoto M, et al. 1989. Structurally similar but functionally distinct factors, IRF-1 and IRF-2, bind to the same regulatory elements of IFN and IFN-inducible genes. *Cell* 58:729-739
82. Tanaka N, Kawakami T, Taniguchi T. 1993. Recognition DNA sequences of interferon regulatory factor 1 (IRF-1) and IRF-2, regulators of cell growth and the interferon system. *Mol. Cell. Biol.* 13:4531-4538
83. Hiscott J. 2007. Triggering the Innate Antiviral Response through IRF-3 Activation. *J. Biol. Chem.* 282:15325-15329
84. Harada H, Willison K, Sakakibara J, et al. 1990. Absence of the type I IFN system in EC cells: transcriptional activator (IRF-1) and repressor (IRF-2) genes are developmentally regulated. *Cell* 63:303-320
85. Au WC, Moore PA, Lowther W, et al. 1995. Identification of the interferon regulatory factor family that binds to the interferon-stimulated response element and activates expression of interferon-induced genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:11657-11661
86. Zhang L, Pagano JS. 1997. IRF-7, a new interferon regulatory factor associated with Epstein-Barr virus latency. *Mol. Cell. Biol.* 17:5748-5757
87. Watanabe N, Sakakibara J, Hovanessian A, et al. 1991. Activation of IFN- β promoter element by IRF-1 requires a post-translational event in addition to IRF-1 synthesis. *Nucleic Acids Res.* 16:4421-4428
88. Sato M, Hata N, Asagiri M, et al. 1998. Positive feedback regulation of type I IFN genes by the IFN-inducible transcription factor IRF-7. *FEBS Lett.* 441:106-110
89. Au WC, Moore PA, Lafleur DW, et al. 1998. Characterization of the interferon regulatory factor-7 and its potential role in the transcription activation of interferon A genes. *J. Biol. Chem.* 273:29210-29217
90. Lin R, Genin P, Mamane Y, et al. 2000. Selective DNA binding and association with the CREB binding protein coactivator contribute to differential activation of α/β interferon genes by interferon regulatory factors 3 and 7. *Mol. Cell. Biol.* 20:634-6353
91. Lin R, Mamane Y, Hiscott J. 2000. Multiple regulatory domains control IRF-7 activity in response to virus infection. *J. Biol. Chem.* 275:34320-34327

92. Caillaud A, Hovanessian AG, Levy DE, et al. 2005. Regulatory serine residues mediate phosphorylation-dependent and phosphorylation-independent activation of interferon regulatory factor 7. *J. Biol. Chem.* 280:17671-17677
93. Marie I, Smith E, Prakash A, et al. 2000. Phosphorylation-induced Dimerization of Interferon Regulatory Factor 7 unmasks DNA Binding and a Bipartite Transactivation Domain. *Mol Cell Biol.* 20(23):8803-8814
94. Prakash A, Levy DE. 2006. Regulation of IRF-7 through cell type-specific protein stability. *Biochem Biophys. Res. Com* 342:50-56
95. Marie I, Durbin JE, Levy DE. 1998. Differential viral induction of distinct interferon-alpha genes by positive feedback through interferon regulatory factor-7. *EMBO J.* 17:6660-6669
96. Zhang L, Pagano JS. 2000. Interferon regulatory factor 7 is induced by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1. *J. Virol.* 74:5748-5757
97. Smith E, Marie I, Prakash A. 2001. IRF-3 and IRF-7 phosphorylation in virus-infected cells does not require double-stranded RNA-dependent protein kinase R or I κ B kinase but is blocked by vaccinia virus E3L protein. *J. Biol. Chem.* 276:8951-8957
98. Lubyova B, Pitha PM. 2000. Characterization of a novel human herpesvirus 8-encoded protein, vIRF-3, that shows homology to viral and cellular interferon regulatory factors. *J. Virol.* 74:8194-8201
99. Zhu F, King S, Yuan Y. 2001. A Kaposi's sarcoma-associated herpesviral protein inhibits virus-mediated induction of type I interferon by blocking IRF-7 nuclear translocation. Submitted
100. Sen GC, Sarkar SN. 2005. Transcriptional signaling by double-stranded RNA role of TLR3. *Cytokine Growth Factor Rev.* 16:1-1499.
101. Szalay G, Sauter M, Hald J, et al. 2006. Sustained Nitric Oxide Synthesis contributes to Immunopathology in ongoing myocarditis attributable to Interleukin-10 Disorders. *The American J of Pathology.* 169:2085-2093
102. Klingel K, Hohenadl C, Canu A, et al. 1992. 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.* 89:314-318
103. Szalay G, Meiners S, Voigt A, et al. 2006. Ongoing Coxsackievirus Myocarditis is Associated with Increased Formation and Activity of Myocardial Immunoproteasomes. *Am. J. of Path.* 168:1542-1552
 104. Ousman S, Wang J, Campell I. 2005. Differentiale Regulation of Interferon Regulatory Factor 7 (IRF-7) and IRF-9 Gene Expression in Central Nervous System during Viral Infection. *J. of Virology.* 79:7514-7527
 105. Prakash A, Smith E, Chien-Kuo L, et al. 2005. Tissue-specific Positive Feedback Requirements for Production of Type I Interferon following Virus Infection. *J. of Biol. Chem.* 19:18651-18657
 106. Bustin SA. 2002. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J. Mol. Endocrinol.* 29:23-39
 107. Lee MS, Connell CR, Bloch W. 1993. Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res.* 21:3761-3766
 108. Kishimoto C, Crumpacker CS, Abelman WH. 1988. Prevention of murine Coxsackie B3 viral myocarditis and associated lymphoid organ atrophy with recombinant human leukocyte interferon alpha A/D. *Cardiovasc. Res.* 22:732-738
 109. Hiraoka Y, Kishimoto C, Takada H, et al. 1995. Colony-stimulating factors and Coxsackievirus B3 myocarditis in mice: macrophage colony-stimulating factor suppresses acute myocarditis with increasing interferon-alpha. *Am Heart J.* 130:1259-1264
 110. Kanda T, Nagaoka H, Kaneko K, et al. 1995. Synergistic effects of tacrolimus and human interferon-alpha A/D in murine viral myocarditis. *J Pharmacol Exp Ther.* 274:487-493
 111. Matsumori A. 2007. Treatment options in Myocarditis. *Herz.* 32:452-456
 112. Matsumori A, Tomioka N, Kawai C. 1988. Protective effect of recombinant alpha interferon on coxsackievirus B3 myocarditis in mice. *Am Heart J.* 115(6):1229-1232

113. Miric M, Vasiljevic J, Bojic M, et al. 1996. Long-term follow up of patients with dilated heart muscle disease treated with human leukocytic interferon-alpha or thymic hormones. *Heart*. 75:596-601
114. Kühl U, Pauschinger M, Schwimmbeck PL, et al. 2003. Interferon- β treatment eliminates cardiotropic viruses and improves left ventricular functions in patients with myocardial persistence of viral genomes and left ventricular dysfunction. *Circulation*. 107:2793-2798

Lebenslauf

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

Veröffentlichung (Posterpräsentation)

Orzechowski HD, Woodruff B, Lindenau S, Klingel K, Paul M. 2009.

Decreased transcriptional induction of Interferon-regulated factor-7 is associated with chronic enteroviral myocarditis in mice. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 104(6):524

Danksagung

Ich möchte mich hiermit bei Herrn Prof. Dr. med. Ivar Roots, Leiter des Instituts für Klinische Pharmakologie der Charite-Universitätsmedizin Berlin, für die Möglichkeit der Erstellung meiner Dissertation in seinem Institut bedanken.

Ein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn PD Dr. med. Hans-Dieter Orzechowski für die Themastellung, die engagierte und gewissenhafte Betreuung und seine stete Diskussions- und Hilfsbereitschaft. Auch für die mühevollen und zeitintensiven Arbeit des Korrekturlesens möchte ich mich ganz herzlich bedanken.

Bei Dr. rer. nat. Steffi Lindenau möchte ich mich herzlich für ihre ausdauernde Assistenz und kritische Begleitung während der Arbeit bedanken. Danke für das Engagement, die ständige Hilfsbereitschaft, die Anleitung, unermüdliche Geduld und vielen wertvollen Anregungen.

Bedanken möchte ich mich bei Frau Schwaneberg für die kompetente technische Hilfe beim Erlernen der molekularbiologischen Methoden.

Dank auch an die gesamte Arbeitsgruppe für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre.

Bei meiner Familie möchte ich mich ganz besonders herzlich bedanken für die uneingeschränkte, liebevolle und motivierende Unterstützung während der gesamten Erstellung dieser Dissertation.

Eidesstattliche Versicherung

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

„Untersuchungen der kardialen mRNA Expression von Interferon-reguliertem Faktor-7 in murinen Modellen der akuten und chronischen enteroviralen 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 Betreuer, 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.