

Aus der Klinik für Kardiologie und Pulmologie der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Histologische Analyse des ANT1-überexprimierenden
Herzmuskelgewebes im Verlauf der Coxsackievirus B3-
induzierten Myokarditis

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Sylwia Anna Wika-Firgon

aus Starogard Gdanski

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. med. H.-P. Schultheiß
 2. Prof. Dr. G. Euler
 3. Prof. Dr. J. Kurreck

Datum der Promotion: 24.02.2012

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	6
1.1	Myokarditis.....	6
1.2	Verlauf der viralen Myokarditis im Mausmodell.....	8
1.3	Der Adeninnukleotid-Translokator.....	11
1.4	ANT und Myokarditis.....	14
1.5	Kardioprotektive Wirkung einer erhöhten ANT1-Expression.....	15
1.6	Zielsetzung der Arbeit.....	16
2	Material und Methoden	18
2.1	Methoden	18
2.1.1	Versuchstiere.....	18
2.1.1.1	Tierhaltung und Tierversuchsantrag.....	18
2.1.1.2	Transgenes Tiermodell.....	18
2.1.1.3	Versuchsdurchführung.....	18
2.1.2	Aufarbeitung des Gewebes.....	19
2.1.2.1	Entwässern und Paraffinieren von Gewebe.....	19
2.1.2.2	Schneiden.....	20
2.1.3	Färbungen.....	20
2.1.3.1	Hämatoxilin-Eosin-Färbung.....	20
2.1.3.2	Elastika-van-Gieson-Färbung.....	21
2.1.3.3	Sirius-Red-Färbung.....	22
2.1.3.4	TUNEL-Färbung.....	23
2.1.4	Auswertung.....	24
2.1.4.1	Mikroskopische Auswertung.....	24
2.1.4.2	Statistische Auswertung.....	24
2.2	Material	25

3	Ergebnisse	27
3.1	Nicht infizierte Mäusegruppe (Gruppe 1)	28
3.1.1	Grundstruktur der murinen Herzen.....	28
3.1.2	Myokardialer Gehalt an kollagenen Fasern.....	30
3.1.3	Myokardialer Kollagengehalt.....	32
3.1.4	Myokardiale Apoptoserate.....	34
3.2	Mit 5×10^5 pfu CVB3/Tier infizierte Mäusegruppe und nicht infizierte Kontrollgruppe (Gruppen 2.1 und 2.2)	36
3.2.1	Entzündungsinfiltrate in mit 5×10^5 pfu CVB3/Tier infizierter Mäusegruppe und nicht infizierter Kontrollgruppe (Gruppe 2.1 und 2.2).....	36
3.2.1.1	Myokardiale Entzündungsinfiltrate am 4. Tag der Infektion.....	37
3.2.1.2	Myokardiale Entzündungsinfiltrate am 8.Tag der Infektion.....	39
3.2.1.3	Myokardiale Entzündungsinfiltrate am 14. Tag der Infektion.....	41
3.2.1.4	Myokardiale Entzündungsinfiltrate am 28. Tag der Infektion.....	43
3.2.2	Myokardialer Gehalt an kollagenen Fasern in mit 5×10^5 pfu CVB3/Tier infizierter Mäusegruppe und nicht infizierter Kontrollgruppe (Gruppe 2.1 und 2.2).....	45
3.2.2.1	Myokardialer Gehalt an kollagenen Fasern am 4. Tag der Infektion.....	45
3.2.2.2	Myokardialer Gehalt an kollagenen Fasern am 8. Tag der Infektion.....	48
3.2.2.3	Myokardialer Gehalt an kollagenen Fasern am 14. Tag der Infektion.....	50
3.2.3	Myokardialer Kollagengehalt in mit 5×10^5 pfu CVB3/Tier infizierter Mäusegruppe und nicht infizierter Kontrollgruppe am 14. Tag der Infektion (Gruppe 2.1 und 2.2).....	53

4	Diskussion.....	56
4.1	Grundstruktur des murinen Herzens der Wildtyp- und der ANT1-überexprimierenden Tiere und deren Veränderungen im Verlauf der Coxsackievirus B3-induzierten Myokarditis.....	56
4.2	Kardiale extrazelluläre Matrix und ihre Veränderungen bei den Wildtyp- und ANT1-überexprimierenden Mäusen im Verlauf der Coxsackievirus B3-induzierten Myokarditis.....	62
4.3	Apoptoseausmaß bei den Wildtyp- und ANT1-überexprimierenden Mäusen unter Basalen- und Belastungsbedingungen.....	66
5	Zusammenfassung.....	73
6	Literaturverzeichnis.....	75
7	Publikationsverzeichnis.....	87
	Danksagung.....	88
	Lebenslauf.....	89
	Eidesstattliche Versicherung.....	91
	Abkürzungen.....	92
	Abbildungsverzeichnis.....	94
	Tabellenverzeichnis.....	96

1. Einleitung

Herzinsuffizienz und andere kardiovaskuläre Erkrankungen sind die weltweit häufigsten Todesursachen. Damit kommt der Behandlung, aber auch der Prävention von Herzerkrankungen immense volksgesundheitliche und volkswirtschaftliche Bedeutung zu. Unter Herzinsuffizienz wird pathophysiologisch das Unvermögen des Herzens verstanden, die Gewebe mit genügend Blut und damit genügend Sauerstoff zu versorgen um den Gewebestoffwechsel in Ruhe oder unter Belastung sicherzustellen. (1-3). Die häufigsten Ursachen der Herzinsuffizienz sind die koronare Herzerkrankung, die arterielle Hypertonie, primäre und sekundäre Kardiomyopathien, angeborene und erworbene Vitien und systemische Erkrankungen (z.B. Vaskulitiden). Unter den primären Kardiomyopathien spielt die dilatative Kardiomyopathie (DCM) die wichtigste Rolle. Die dilatative Kardiomyopathie ist hämodynamisch definiert als systolischer Pumpfehler mit Kardiomegalie und eingeschränkter Ejektionsfraktion. Strukturell kennzeichnen die Herzerkrankung die Dilatation des linken und zum Teil des rechten Ventrikels, Hypertrophie der Myozyten und interstitielle Fibrose. Die dilatative Kardiomyopathie ist mit einer Prävalenz von 36,5 auf 100 000 Einwohner und einer Inzidenz von 6 pro 100 000 Einwohner die häufigste Herzmuskelerkrankung (4). Die Prognose ist ungünstig. Etwa 20% aller Patienten mit DCM versterben innerhalb eines Jahres, 50% nach 5 Jahren, 70% nach 10 Jahren (5). Zahlenmäßig sind Myokarditiden und chronischer Alkoholkonsum die häufigsten Ursachen der Erkrankung.

1.1 Myokarditis

Die Myokarditis ist eine entzündliche Herzmuskelerkrankung, die die Herzmuskelzellen, das Interstitium und die Herzgefäße befallen kann. Das Krankheitsbild kann durch eine Vielzahl infektiöser Erreger (Viren, Bakterien, Pilze, Protozoen), physikalische oder chemische Noxen sowie Medikamente ausgelöst werden. In westlichen Ländern steht die Virusmyokarditis an erster Stelle (6). Hierbei spielen die Enteroviren, insbesondere die Coxsackie-B-Viren, eine entscheidende Rolle (7). Klinisch verlaufen die Virusmyokarditiden größtenteils asymptomatisch oder als Begleiterscheinung der im Vordergrund stehenden systemischen Infektion. Andererseits kann sich die Herzerkrankung auch durch ernste Symptome wie Herzinsuffizienz, Herzrhythmusstörungen oder sogar durch den plötzlichen Herztod bemerkbar machen.

Die Diagnose Myokarditis kann anhand von Myokardbiopsien mit histologischen und immunhistologischen Aufarbeitungen gestellt werden (8-11). Die Beurteilung der Biopsiepräparate beruht auf den „Dallas-Kriterien“(9). Hier wird anhand der ersten Myokardbiopsie zwischen der akuten Myokarditis, die durch entzündliche Infiltrate mit angrenzender Myokardnekrose charakterisiert wird, und der Borderline Myokarditis mit entzündlichen Infiltraten jedoch ohne Myozytennekrose bzw. keiner Myokarditis unterschieden. Die zweite Biopsie erlaubt die Unterteilung der Myokarditiden in persistierende, abheilende oder abgeheilte. Die histologische Charakterisierung der Virusmyokarditis wird heutzutage durch immunhistologische Untersuchungsverfahren gestützt. Dank der beiden Methoden ist es möglich, bei bis zu 50% aller Patienten mit dem klinischen Verdacht auf eine Myokarditis oder eine dilatative Kardiomyopathie eine intramyokardiale Entzündung zu diagnostizieren (12). Weitere Untersuchungsmöglichkeiten ergeben sich durch die Polymerase-Ketten-Reaktion und die *In-Situ*-Hybridisierung. Mit den modernen Methoden lassen sich bei bis zu 20-25% aller Patienten mit Myokarditis oder dilatativer Kardiomyopathie virale Nukleinsäuren nachweisen (13,14).

Die Virusmyokarditis kann verschiedene Verläufe nehmen. Das klinische Bild und der Schweregrad der Herzerkrankung variieren je nach Invasivität und Virulenz des Erregers, der Reaktion des Immunsystems, dem Erkrankungsalter und der genetischen Prädisposition. Bei einem kleinen Teil der Patienten verläuft die Virusmyokarditis als fulminante Myokarditis, wobei die direkte Folge der Virusinfektion eine ausgeprägte Myozytolyse ist. Dabei ist eine entzündliche Immunreaktion nicht nachweisbar.

Wenn der Organismus mit einer suffizienten Immunantwort reagiert, die mit der Aktivierung von natürlichen Killerzellen, zytotoxischen Lymphozyten und der lymphozytären Expression von Zytokinen wie Interferon gamma verbunden ist, verläuft die Infektion inapparent und die Myokarditis heilt innerhalb weniger Wochen aus.

Subakute oder chronische Verläufe treten auf, wenn das Immunsystem nicht in der Lage ist, das Virus vollständig zu eliminieren. In diesem Fall kann es zur Schädigung der Kardiomyozyten und Entwicklung von Kardiomyopathie kommen. Der Prozess wird einerseits durch virale Proteine, wie die Protease2A, verursacht, die zelluläre Proteine der Kardiomyozyten wie z.B. Dystrophin oder Sarkoglykan schädigen (15-16). Andererseits können Autoimmunreaktionen, die durch das virale Protein ausgelöst werden, die Herzmuskelzellen zerstören (17, 18, 19, 20, 21, 22). Die Folge ist eine chronische Aktivierung von T-Lymphozytenvermittelter Zytotoxizität, die nicht nur

gegen Viren und viral infizierte Zellen mit Virusantigenen auf der Zellmembran, sondern auch gegen die Kardiomyozyten selbst gerichtet ist. Dieser Prozess wird „Molekulares Mimikry“ genannt. Die durch die virale Infektion und die damit verbundene Autoimmunreaktion geschädigten Herzmuskelzellen sterben ab und das kontraktile Myokard wird durch fibrotisches Gewebe ersetzt. Die strukturellen Veränderungen des Herzmuskels bei der Virusmyokarditis verlaufen in folgender Reihenfolge: Zuerst beobachtet man die Hypereosinophilie der Kardiomyozyten und ein seröses Exsudat mit einzelnen Entzündungszellen. Später zerfallen die Myokardiozyten schollig, lösen sich teilweise auf (Myozytolyse) und werden von einem T-Lymphozytären Infiltrat mit eingewanderten Histozyten umsäumt. Das Endstadium der chronisch verlaufenden Myokarditis zeigt das Bild einer erheblichen interstitiellen Myokardfibrose mit kompensatorischer Herzmuskelhypertrophie. Anhand aktueller Studien schätzt man, dass ca. 12% aller Patienten mit klinischem Verdacht auf Myokarditis und ca. 40% der Patienten mit bioptisch gesicherter Myokarditis eine dilatative Kardiomyopathie entwickeln (12).

1.2 Verlauf der viralen Myokarditis im Mausmodell

Unser Wissen über den Verlauf der virusinduzierten Myokarditis gründet größtenteils auf Untersuchungen zur Myokarditis im Tiermodell. Darunter ist das Mausmodell das am besten definierte.

Grundsätzlich findet die Herzschädigung während der viralen Myokarditis auf zwei Arten statt: Direkt durch die virusinduzierte Zytotoxizität und durch die Immunantwort, deren Ziel es ist, das Virus zu eliminieren. Kawaii et al. (23) unterteilte den Verlauf der virusinduzierten Myokarditis in drei Phasen: akute (0.-3. Tag p.i.) subakute (4.-14. Tag p.i.) und chronische (>15. Tag p.i.). Die Entwicklung und Schwere der Myokarditis ist von vielen Faktoren abhängig: Vom Genotyp des Virus (24,25), Mausstamm (24,25), Alter (26), Geschlecht (27,28,29) und Immunstatus der Maus (30,31). Je nach dem, wie die oben genannten Faktoren zusammengestellt werden, kann die Myokarditis schon während der akuten Phase mit dem Tod enden, aber auch nach der subakuten Phase ausheilen oder auch einen chronischen Verlauf nehmen.

Während der ersten akuten Phase der virusinduzierten Myokarditis im Mausmodell findet eine direkte durch das Virus verursachte Herzschädigung statt. Die Phase ist durch eine virusinduzierte Zytotoxizität mit fokalen Nekrosen der Myofibrillen

und Abwesenheit von Entzündungszellinfiltraten charakterisiert (32). Erst ab dem 3. Tag p.i. bilden sich einzelne Infiltratherde. Während der ersten Phase im Verlauf der Myokarditis steigt auch die Expression von proinflammatorischen Zytokinen wie Interleukin 1 β (IL-1 β), Tumor Nekrose Faktor α (TNF- α) und Interferon γ (IFN- γ) an (33,34).

Die subakute Phase, die vom 4. bis zum 14. Tag p.i. verläuft, ist die wichtigste Zeit in der Virusbekämpfung. Sie zeichnet sich durch Infiltrate aus Entzündungszellen und Induktion von Zytokinen aus. Die Entzündungszellinfiltrate setzen sich größtenteils aus Makrophagen, T-Lymphozyten und Fibroblasten und wenigen B-Lymphozyten und Plasmazellen zusammen. Die Rolle der Zytokine im Verlauf der Myokarditis ist charakterisiert durch die Regulation der Immunantwort.

Während der subakuten Phase versucht der Organismus das Virus auf viele Wege zu bekämpfen. Eine der ersten Zellarten, die in das virusinfizierte Gewebe einwandern und mittels Phagozytose versuchen die virusbefallenen Zellen zu eliminieren, sind die Makrophagen. Diese Zellen des Abwehrsystems werden durch den Übertritt des Virus in das Interstitium und durch das Interleukin 2 aktiviert.

Weiterhin nehmen die Natürlichen Killer Zellen (NK), die durch Interleukin 2 aktiviert werden, in der Virusbekämpfung teil. Sie hemmen die Virusreplikation, indem sie das Perforin freisetzen und dadurch die infizierten Kardiomyozyten lysieren (35,36). Studien mit einer verminderten Natürlichen-Killer-Zell-Immunantwort zeigten bei der virusinduzierten Myokarditis einen Anstieg des Virustiters und der Schwere der Erkrankung (37).

Eine sehr bedeutende Rolle in der Viruselimination während der subakuten Phase der Myokarditis spielen die T-Lymphozyten. Sie verursachen die schwersten pathologischen Veränderungen im Myokard (38). Die zytotoxischen T-Zellen erkennen die Virusproteine, die durch die *Major-Histocompatibility-Complexes Class I* (MHC I) auf der Kardiomyozytenoberfläche präsentiert werden und lysieren die Herzmuskelzellen. Während der Myokarditis wird die Expression von MHC I auf der Kardiomyozytenoberfläche unter dem Einfluss von IFN- γ erhöht (39). IFN- γ und TNF- α erhöhen auch die Expression von „intercellular adhesion molecules“, die Zell-zu-Zell-Kontakte, die für die Lyse der Kardiomyozyten von den Zytotoxischen-T-Zellen unumgänglich sind, ermöglichen (40).

Weiterhin sind auch die T-Helfer-Zellen ein Teil der Immunantwort auf die Virusinfektion im Myokarditis-Mausmodell. Während der viralen Myokarditis können sich

aus den TH0-Zellen unter dem Einfluss von Zytokinen TH1- oder TH2-Zellen differenzieren (41). TH2-Zellen sezernieren IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 und induzieren die humorale Immunantwort sowie die Downregulation lokaler Entzündungen. TH1-Zellen sezernieren IFN-gamma, Lymphotoxin (LT) und IL-2 und sind verbunden mit einer verstärkten zellulären Immunantwort durch die Aktivierung proinflammatorischer Mechanismen (42).

Ebenfalls haben die neutralisierenden Antikörper einen Anteil an der Viruselimination. Studien an BALB/c Mäusen, die mit dem Encephalomyokarditis Virus (EMCV) infiziert wurden, zeigten das Maximum des Virustiters am 4. Tag p.i. Zu diesem Zeitpunkt waren keine neutralisierenden Antikörper nachweisbar. Ab dem 8. Tag p.i. stiegen die neutralisierenden Antikörper rapide an und am Tag 14. p.i. erreichten sie ihr Maximum. Der Anstieg der neutralisierenden Antikörper fiel mit dem Abfall des Virustiters zusammen. Er war am Tag 8 p.i. noch hoch, ab diesem Tag fiel er jedoch rapide ab und war am Tag 10 p.i. nicht mehr nachweisbar (43).

Die chronische Phase der viralen Myokarditis im Mausmodell fängt ab dem 15. Tag p.i. an. Es wurde vielfach untersucht, warum bei manchen Mäusen die Myokarditis mit der subakuten Phase endet und bei anderen die Erkrankung einen chronischen Verlauf annimmt. Hierbei werden zwei Aspekte, die zu der Entwicklung von chronischer Myokarditis führen könnten, diskutiert: Persistenz der viralen RNA und die Entwicklung von Autoimmunität gegen Herzgewebe.

Die persistierende virale RNA wird als Ursache für die chronische Phase von Myokarditis angenommen. Diese Annahme wurde durch die Studie von Klingel et al. bestätigt, in der es bei drei verschiedenen, immunkompetenten Mausstämmen, in denen enterovirale RNA persistierte, zu einem chronischen Verlauf der Myokarditis kam. Wohingegen DBA/1-Mäuse, die virale RNA früh eliminierten, nicht zur Chronifizierung neigten (44). Die Persistenz der viralen RNA führt jedoch nicht zwangsläufig zu einem chronischen Verlauf der Myokarditis (45).

Andererseits wird auch die Entwicklung von Autoantikörpern gegen Herzgewebe als Ursache der chronischen Myokarditis diskutiert. Um diese Hypothese zu untersuchen wurde Mäusen kardiales Myosin injiziert. Das führte zur Ausbildung von Myokarditis, jedoch ohne Virusbeteiligung. Dabei konnten Autoantikörper isoliert werden, die mit den CVB3-Kapsidproteinen reagierten und kardiale Läsionen verursachten (46, 47, 48, 49).

Intensive Untersuchungen auf diesem Feld haben eine besondere Rolle in der Pathogenese der Virusmyokarditis und der dilatativen Kardiomyopathie, die oft das Endstadium der chronischen Myokarditis darstellt, den Anti-Adeninnukleotid-Translokator-Antikörpern zugeschrieben (22).

1.3 Der Adeninnukleotid-Translokator

Der Adeninnukleotid-Translokator (ANT) ist ein Transporter, der eine zentrale Rolle in der Energieversorgung der Zelle einnimmt (50). Seine Hauptfunktion liegt in dem ADP/ATP-Austausch über die innere Mitochondrienmembran. Dabei wird energiereiches ATP aus dem Mitochondrium heraus transportiert und dem Mitochondrium wird ADP zugeführt. Dadurch ist der ANT ein Regulator zwischen energieliefernden und energieverbrauchenden Prozessen in der Zelle. Außer der Beteiligung am Energiestoffwechsel der Zelle nimmt ANT als multifunktionelles Protein am Apoptoseprozess und der intrazellulären Kommunikation teil.

Der ANT ist das höchstexprimierte mitochondriale Protein (50). Der ANT-Proteinanteil in der Mitochondrienmembran hängt mit der oxidativen Phosphorylierungsrate des Gewebes zusammen. Im Herzen beträgt er etwa 14% des mitochondrialen Gesamtproteins, in Nierenmitochondrien ca. 6,5% und in Lebermitochondrien ca. 3% (51). Das Mitochondrium besitzt neben dem ANT viele weitere Carriersysteme wie z.B. den Phosphat-Carrier, den Dicarboxylat-Carrier und den Pyruvat-Carrier. Alle zeigen deutliche strukturelle Gemeinsamkeiten. Sie setzen sich aus drei etwa 100 Aminosäure starken Einheiten zusammen, von denen jede zwei transmembrane Segmente enthält (Abbildung 1) (52). Die sechs transmembranen Segmente werden über hydrophile Schleifen verbunden. Zusätzlich ragen auf der Matrixseite hydrophobe Schleifen in die Membranregion hinein.

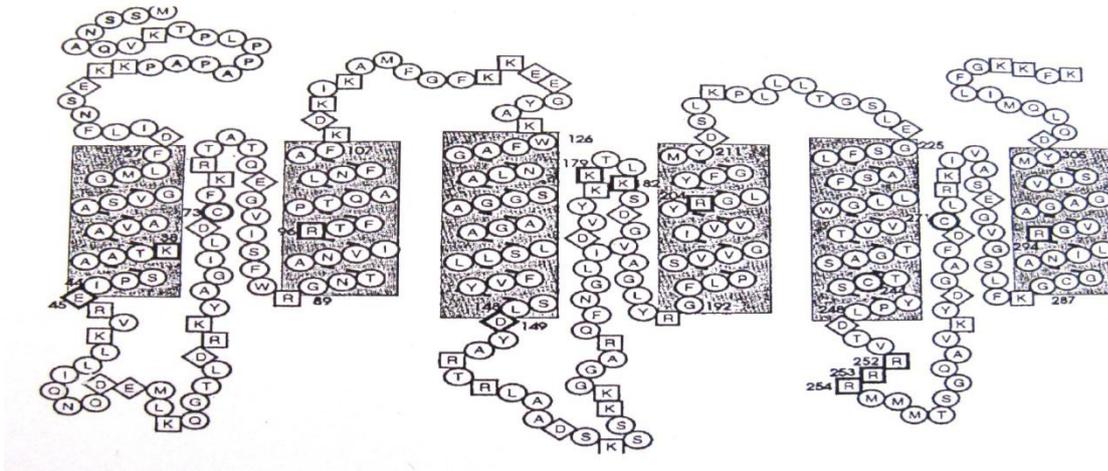


Abbildung 1: Modell der Sekundärstruktur des ANT der Hefe (Referenz)

Der ANT ist ein Dimer, das aus zwei identischen 32 kDa schweren Untereinheiten aufgebaut wird. Er besitzt ein nukleotidbindendes Zentrum, welches abwechselnd der Zytosol- und der Matrixseite zugewandt ist. Die Hauptfunktion des ANT ist wie oben bereits erwähnt der ADP/ATP-Austausch durch die innere Mitochondrienmembran. Dabei katalysiert das Protein folgende Reaktion: $\text{ADP}^{3-}_{\text{Cytosol}} + \text{ATP}^{4-}_{\text{Matrix}} \rightleftharpoons \text{ADP}^{3-}_{\text{Matrix}} + \text{ATP}^{4-}_{\text{Cytosol}}$. Um den Austausch gewährleisten zu können, nimmt das dreifach positiv geladene Substratzentrum auf der Zytosolseite ein ADP auf und entlässt es nach einer Konformationsänderung auf der Matrixseite. Hier wiederum nimmt das Zentrum ATP auf und schleust es auf die Zytosolseite. Die Konformationsänderung kann nur nach der Nukleotidbindung geschehen. Deswegen sind der Transport von ADP und ATP ins bzw. aus dem Mitochondrium fest aneinander gekoppelt (53). Zusätzlich besitzt das Zentrum hohe Substratspezifität, sodass andere Nukleotide wie AMP, GDP und GTP nicht von diesem Transportsystem über die Mitochondrienmembran transportiert werden (54).

Der ANT ist im humanen System von vier (ANT1-4) und bei Nagetieren von drei unabhängigen Genen (ANT1, 2 und 4) kodiert (55, 56, 57). Alle ANT-Isoformen werden gleichzeitig exprimiert, jedoch ist die Expression der unterschiedlichen Isoformen gewebespezifisch (Tab. 2). ANT1 ist die vorherrschende Isoform im Herzen, Skelettmuskel und Gehirn, wird aber auch in geringem Maße in anderen Organen exprimiert. Es wird angenommen, dass ANT1 und ANT2 gegenläufig reguliert werden, da in demselben Maße wie der ANT1-Gehalt abnimmt, der ANT2-Anteil zunimmt und umgekehrt. ANT3 spielt eine untergeordnete Rolle (55, 56, 57).

Tabelle 1: Verteilungsmuster der ANT-Isoformen in verschiedenen humanen Geweben (Dörner et al., 1996)

Gewebe	ANT1 (%)	ANT2 (%)	ANT3 (%)
Skelettmuskel	69 ± 6	20 ± 5	11 ± 3
Herz	68 ± 5	25 ± 5	7 ± 3
Gehirn	56 ± 6	27 ± 6	17 ± 5
Niere	29 ± 6	56 ± 9	15 ± 7
Milz	23 ± 3	56 ± 9	21 ± 6
Leber	15 ± 6	63 ± 11	22 ± 10
Fibroblast	14 ± 1	57 ± 3	29 ± 3
Lymphozyt	16 ± 5	77 ± 5	7 ± 4

ANT1 und ANT2 treten in jedem Mitochondrium koexistent, aber in verschiedener Verteilung auf. ANT1 befindet sich in der peripheren inneren Mitochondrienmembran, während ANT2 in der peripheren und in der Cristae-Membran vorkommt. Die unterschiedliche Lokalisation der beiden ANT-Isoformen weist auf unterschiedliche Funktionen innerhalb der Mitochondrienmembran hin.

Der ANT ist ein Bestandteil der *Mitochondrial Permeability Transition Pore* (MPTP), wo er eine zentrale Rolle in der Regulation des Apoptoseprozesses spielt (58). Mit der Öffnung dieser Pore ist die Freisetzung von proapoptotischen Proteinen verbunden, die den programmierten Zelltod vorantreiben. Die Aktivität des ANT innerhalb der MPTP wird durch viele proapoptotische Proteine, beispielsweise Bax, und antiapoptotische, wie z.B. Bcl-2, beeinflusst (59). Auch virale Proteine interagieren mit dem ANT, um den Apoptosevorgang zu initiieren oder zu blockieren (60).

Weiterhin ist ANT an der intrazellulären Kommunikation beteiligt. Dabei wird der Transporter, ähnlich wie bei der Apoptoseregulation, als Bindungspartner für Proteine der Signaltransduktion wie z.B. BART (61), ein Bindungspartner des *ADP-ribosylation like 2 factors* (ARL2), und Transkriptionsregulatoren wie z.B. Ikappa b-alpha (62), die inhibierende Untereinheit von NF-kappa beta, involviert.

1.4 ANT und Myokarditis

Der Nachweis ANT-spezifischer Autoantikörper im Serum von Patienten mit Myokarditis und dilatativer Kardiomyopathie lenkte das wissenschaftliche Augenmerk auf die Rolle des ANT-Rezeptors in der Pathogenese der beiden Erkrankungen (63,64). Daraufhin folgende Untersuchungen ergaben, dass bei Patienten mit Myokarditis und dilatativer Kardiomyopathie die kardiale ANT-Transportkapazität deutlich reduziert ist (65,66,67), was sich durch ein vermindertes zytosolisches und ein erhöhtes mitochondriales ATP/ADP-Verhältnis äußerte. Die gestörte ANT-Aktivität hängt mit der Verschiebung des ANT-Isoformenmusters zusammen. Der ANT-Isoformenshift in Herzen von Patienten mit Myokarditis und dilatativer Kardiomyopathie war durch einen erhöhten ANT1- (von 68,2% auf 84,7%), einen erniedrigten ANT2- (von 24,9% auf 10,6%) und einen kaum veränderten ANT3-Anteil (von 7% auf 4,7%) charakterisiert (68). Die veränderte Isoformenexpression ist für die Myokarditis und dilatative Kardiomyopathie spezifisch, weil sie bei Herzerkrankungen anderer Ätiologie wie z.B. ischämischer und hypertropher Kardiomyopathie oder Herzklappenfehlern nicht beobachtet wurde.

Zusammenfassend führt die veränderte ANT-Isoformenzusammensetzung zu einer Veränderung der funktionellen Eigenschaften des ANT-Gesamtproteins und ist für die erniedrigte ANT-Austauschkapazität verantwortlich (69). Weiterführende Untersuchungen der Funktion des ANT im Herzen mit Myokarditis und dilatativer Kardiomyopathie ergaben, dass der ANT in diesen Herzen eine erniedrigte Affinität zum ATP-Substrat aufweist. Zudem war die maximale ANT-Transportkapazität um 55% reduziert, was im Endeffekt zu dem gestörten ATP/ADP-Verhältnis innerhalb der Kardiomyozyten führt. Außerdem lässt die Expressionsverschiebung von ANT2 zu ANT1 und die daraus resultierende Verminderung der ANT-Transportkapazität den Schluss ziehen, dass die maximale Austauschkapazität von ANT2 höher als die von ANT1 ist. Die Abnahme von ANT2 um 14,3% konnte durch eine Zunahme von ANT1 um 16,5% nicht in ausreichendem Maße kompensiert werden.

Weiterführende Untersuchungen des ANT bei dilatativer Kardiomyopathie zeigten die Deformierung der myokardialen Mitochondrien (70) und die Reduzierung der Aktivität der Atmungskettenkomplexe (71).

1.5 Kardioprotektive Wirkung einer erhöhten ANT1-Expression

Bei Erkrankungen wie dem Sengers-Syndrom (72) oder der autosomal-dominanten, progressiven, externen Ophthalmoplegie (adPEO) (73, 74), die mit hypertropher Kardiomyopathie assoziiert werden können, konnte ein Zusammenhang mit einer erniedrigten ANT1-Expression oder Mutationen im ANT1-Gen gezeigt werden. Daraus ergab sich die Frage, ob die Überexpression von ANT1 eine kardioprotektive Wirkung haben könnte. Forschungsergebnisse zeigten, dass Mutationen in ANT1-Gen und daraus resultierende ANT-Funktionsstörungen eine eingeschränkte oxidative Phosphorylierung und vermehrte Schädigung der mitochondrialen DNA verursachen (75).

Im Rahmen der Untersuchungen an ANT1-knockout-Mäusen wurden ebenfalls biochemische und physiologische Charakteristika einer hypertrophen Kardiomyopathie mit mitochondrialer Proliferation und gestörter oxidativer Phosphorylierung gezeigt (76). Dabei wurde ein Anstieg von mitochondrialen reaktiven Sauerstoffmolekülen (ROS) und eine vermehrte Expression von entgiftenden Enzymen wie Superoxiddismutase und Glutathion-Peroxidase beobachtet, die als Indikatoren für erhöhten oxidativen Stress gelten (77). Der oxidative Stress führte auch zu einer erhöhten Mutationsrate der mitochondrialen DNA (78).

Einen kardioprotektiven Effekt der ANT1-Überexpression beobachtete man bei dem Preconditioning, einem Anpassungsprogramm des Organismus das nach einer Belastung wie kurze Hypothermie- oder Ischämiephase induziert wird (79). Im Rahmen des Prozesses wird ein Teil von Genen überexprimiert. Dazu zählt auch der ANT1. Hierbei gehört der ANT1 zu einem Schutzmechanismus des Organismus zur Vermeidung beziehungsweise Reduzierung von Gewebsschäden während einer erneuten Phase von Ischämie ggf. Hypothermie.

Eine weitere positive Wirkung durch kardiale ANT1-Überexpression hat der Transfer von ANT1 mittels viraler Vektoren in ANT1-defiziente Skelettmuskelzellen. Dabei kommt es durch die Erhöhung des mitochondrialen Exportes von ATP zur Rückbildung der histopathologischen Veränderungen, die mit der mitochondrialen Myopathie verbunden sind (80).

Darüber hinaus ergaben Untersuchungen an hypertonieinduzierten hypertrophen Rattenherzen mit Überexpression von ANT1 hochsignifikante kardioprotektive Ergebnisse. Die Ratten wiesen eine erhöhte mitochondriale ANT-Aktivität, eine

Aktivitätserhöhung der Atmungskettenkomplexe II-IV mit einer effektiveren elektrischen Kopplung und einer erhöhten Stabilität der mitochondrialen Membran auf. Im Gegensatz zur normalen ANT1-Expression zeigten Tiere mit vermehrter ANT1-Expression unter hypertonen Bedingungen keine kardiale Hypertrophie und keine Störung des Energiehaushaltes. Während die hypertonen Ratten mit normaler ANT1-Expression massive Fibroseentwicklung aufwiesen, war bei den ANT1-überexprimierenden Ratten kaum Fibrose nachzuweisen. Auch in Hinblick auf die Apoptose zeigte sich bei den ANT1-überexprimierenden Ratten eine kardioprotektive Wirkung. Anders als die Ratten mit unveränderter ANT1-Expression, die durch eine deutliche Zunahme apoptotischer Zellen und Erhöhung der Apoptosemarker Caspase 3 und Cytochrom C im Zytosol charakterisiert waren, zeigten die ANT1-transgenen Ratten eine fast vollständige Verhinderung der Apoptose und Normalisierung der Apoptosemarker (81).

Weiterhin ergaben Untersuchungen an an Diabetes mellitus erkrankten Mäusen eine kardioprotektive Wirkung der ANT1-Überexpression. Die ANT1-überexprimierenden Diabetes-Mäuse entwickelten im Verlauf der Erkrankung im Gegenteil zu genetisch unveränderten ebenfalls an Diabetes mellitus erkrankten Mäusen keine diabetische Kardiomyopathie. Die ANT1-Überexpression schützte im Verlauf der Diabetes mellitus die genetisch veränderten Mäuse vor ventrikulärer Gewichtsabnahme, Störung der systolischen und diastolischen Herzfunktion und letztendlich vor Entwicklung der Herzinsuffizienz, die bei den Wildtyp-Tieren beobachtet wurde (82).

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Wie dargestellt, konnte man im ANT1/REN-Rattenmodell die deutliche kardioprotektive Wirkung der Adeninnukleotid-Translokator-1-Überexpression zeigen. Die Auswirkung der erhöhten ANT1 Expression auf das Herz machte sich in einer Verbesserung der Herzfunktion, Aufhebung der Störung des Energiehaushaltes, Erniedrigung der Apoptoserate und Hemmung der Fibroseentwicklung bemerkbar. In unserer Arbeit wollen wir untersuchen, ob man die kardioprotektive Wirkung der ANT1-Überexpression auch auf inflammatorische Herzerkrankungen übertragen kann, wobei unser Augenmerk sich auf die histologischen Veränderungen der Herzstruktur richtete. Zur Beantwortung dieser Frage wurden C57BL/6 Wildtyp Mäuse und ANT1-

überexprimierende Mäuse mit dem Coxsackievirus B3 infiziert. Die daraus resultierende Myokarditis wurde am 4., 8., 14. und 28. Tag ihres Verlaufs beobachtet und die Mäuseherzen auf strukturelle Veränderungen auf mikroskopischer Ebene untersucht.

Ziel der vorliegenden Studie war die Beantwortung folgender Frage:

Welche strukturellen Veränderungen im Verlauf der Coxsackievirus B3-induzierten Myokarditis zeigen die ANT1-überexprimierenden Mäuse im Vergleich zu Mäusen mit unveränderten ANT1 Expression?

2. Material und Methoden

2.1 Methoden

2.1.1 Versuchstiere

2.1.1.1 Tierhaltung und Tierversuchsantrag

Alle untersuchten Mäuse wurden entsprechend den Richtlinien und mit dem Einverständnis der zuständigen Behörde gehalten. Die Unterbringung der Mäuse erfolgte im Tierstall der Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin der Freien Universität Berlin. Die Tiere wurden auf staubfreiem Weichholzgranulat in durchsichtigen Polycarbonatkäfigen des Typs Makrolon III gehalten. Die Raumtemperatur lag konstant bei $22\pm 2^\circ\text{C}$, die relative Luftfeuchtigkeit lag bei $55\pm 5\%$ und die Belichtung erfolgte in einem 12-Stunden-Hell-Dunkel-Rhythmus. Nahrung und Wasser standen den Tieren *ad libitum* zur Verfügung. Der Gesundheitszustand der Mäuse wurde täglich überwacht und protokolliert.

Behördliche Genehmigung für die Durchführung der Experimente wurde gemäß § 8 Abs.1 des Tierschutzgesetzes am 21.04.2005 mit der Genehmigungsnummer G0060/05 erteilt und lag bei Versuchsbeginn vor.

2.1.1.2 Transgenes Tiermodell

Zur Evaluierung der Auswirkung einer erhöhten ANT1-Expression wurden Mäuse des Stammes C57BL/6 mit herzspezifischer ANT1-Überexpression ausgewertet. Die herzspezifische Überexpression wurde durch die Einführung des ANT1-Gens hinter einem α -Myosin-Heavy-Chain Promotor (α MHC) erreicht.

2.1.1.3 Versuchsdurchführung

An dem Versuch nahmen insgesamt 115 Tiere teil, davon waren 57 Wildtyp-Tiere und 58 ANT1-überexprimierende Tiere. Alle aus dem C57BL/6 Stamm. Davon wurden 66 (29 Wildtyp- und 37 ANT1-überexprimierende Tiere) 6,5 Wochen alte Männchen mit 5×10^5 pfu CVB3 in 200 μl PBS infiziert und die Strukturveränderungen der Herzen 4, 8, 14 und 28 Tage nach der Infektion analysiert. Dafür wurden die Versuchstiere mit CO_2 betäubt und daraufhin durch Genickbruch getötet. Die Tiere wurden aufgeschnitten und die Organe entnommen.

2.1.2 Aufarbeitung des Gewebes

2.1.2.1 Entwässern und Paraffinieren von Gewebe

Die Mäuseherzen wurden unter sterilen Bedingungen am Gefäßstiel entnommen. Anschließend wurden die Vorhöfe entfernt und die Ventrikel mit einem horizontalen Schnitt geteilt. Frischgewebe wurde für 24h in Paraformaldehyd bei Raumtemperatur in Eppis fixiert, anschließend in 70% vergälltem Ethanol gespült und in 70%igem Ethanol gelagert. Die Proben wurden in durchlässige Plastikbehälter überführt und im Automaten ASP 300 mit folgendem Standardprogramm entwässert:

Tabelle 2: Entwässern und Paraffinieren von Gewebe

Pos.	Reagenz	Temp.	Zeit
1	Formalin 5%	40 °C	30 min
2	Ethanol 70%	40°C	30 min
3	Ethanol 70%	40°C	30 min
4	Ethanol 96%	40°C	30 min
5	Ethanol 96%	40°C	30 min
6	Ethanol 100%	40°C	30 min
7	Ethanol 100%	40°C	30 min
8	Xylol	42°C	30 min
9	Xylol	42°C	30 min
10	Xylol	42°C	30 min
11	Paraffin	61°C	30 min
12	Paraffin	61°C	30 min
13	Paraffin	61°C	30 min

Anschließend wurden vorgewärmte Metallformen entsprechend der Probengröße mit etwas Paraffin gefüllt. Jede Probe wurde mit einer vorgewärmten Pinzette aus der Kassette entnommen und mittig in die Metallkassette gelegt. Anschließend wurde die Metallform auf die Eisschale gestellt, um das Paraffin kurz anziehen zu lassen, so dass die Probe nicht mehr verrutschen konnte. Danach wurde das Unterteil der Kassette auf die Metallform gelegt. Die Metallform mit Probe und Kassettenunterteil blieb bis zur Erkaltung des Paraffins auf der Eisschale liegen. Nach dem Erkalten des Paraffins wurden Blöckchen aus der Metallform entnommen.

2.1.2.2 Schneiden

Die Paraffingewebeblöcke wurden vor dem Schneiden auf einer Eisschale gekühlt. Anschließend wurden sie in das Microtom eingespannt und 4 µm dünn geschnitten. Die Schnitte wurden zur Entfaltung auf die Oberfläche eines 44° C warmen Wasserbades überführt. Danach wurden die verschiedenen Schnittstufen auf silanisierte Objektträger aufgezogen und im Trockenschrank bei 46° C getrocknet. Bis zur Färbung wurden die Objektträger bei Raumtemperatur gelagert.

2.1.3 Färbungen

2.1.3.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Mit Hilfe der Hämatoxylin-Eosin-Färbung lassen sich zelluläre Bestandteile darstellen. Dabei werden Kerne blau und Zytoplasma in verschiedenen Rottönen angefärbt.

4 µm dicke Paraffinschnitte wurden mit Xylol entparaffiniert und mit absteigender Alkoholreihe gewässert.

Tabelle 3: Bewässern von Gewebe für die HE-Färbung

	Schritt	Zeit
1	Xylol	5 min
2	Xylol	5 min
3	Ethanol 100%	5 min
4	Ethanol 96%	5 min
5	Ethanol 70%	5 min

Anschließend wurden die Präparate kurz in Wasser und *Aqua dest* gespült und für 8 min in Hämatoxylin inkubiert. Nach 1 min Waschen unter fließendem Leitungswasser wurden die Schnitte kurz in HCL-ALK eingetaucht. Es erfolgte das Bläulen unter fließendem Leitungswasser (10 min) und anschließend eine 10-15-minütige Gegenfärbung mit Eosin. Danach wurden die Präparate 1 min lang mit Leitungswasser gespült. Nach dem Spülen wurden die Schnitte in der aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und anschließend eingedeckt.

Tabelle 4: Entwässern von Gewebe für die HE-Färbung

	Schritt	Zeit
1	Ethanol 70%	1 min
2	Ethanol 96%	1 min
3	Ethanol 96%	1 min
4	Ethanol 100%	1 min
5	Xylol	3 min

2.1.3.2 Elastika-van-Gieson-Färbung

Die Elastika-van-Gieson-Färbung ermöglicht eine brillante Differenzierung zwischen Kernen, Bindegewebe, Muskulatur und elastischen Fasern in Gewebeschnitten. Dabei werden die Zellkerne schwarz-braun, elastische Fasern Schwarz und kollagene Fasern rot angefärbt. Dafür wurden 4 µm dicke Paraffinschnitte entparaffiniert, gewässert und mit Wasser und *Aqua dest* gespült.

Tabelle 5: Bewässern von Gewebe für die EvG-Färbung

	Schritt	Zeit
1	Xylol	5 min
2	Xylol	5 min
3	Ethanol 100%	5 min
4	Ethanol 96%	5 min
5	Ethanol 70%	5 min
6	Wasser	1 min
7	<i>Aqua dest</i>	1 min

Anschließend wurden die Präparate für 10 min in Elastin nach Weigert eingestellt. Es erfolgte das Spülen in Leitungswasser für 1 min. Danach fand die Färbung mit Weigert A&B für 5 min and anschließende Spülung in fließendem Leitungswasser statt. Die Gegenfärbung erfolgte mit Pikrofuchsin-Lösung (2 min). Danach wurden die Präparate über 1 min mit 70%igem Ethanol gewaschen, anschließend in der aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und eingedeckt (Tab. 4).

2.1.3.3 Sirius-Red-Färbung

Die Sirius-Red-Färbung dient zur Darstellung von kollagenen und retiikulären Fasern im extrazellulären Raum von Gewebe. Strukturen, die Kollagen enthalten, werden rot angefärbt. Damit kann man eine Aussage über das Ausmaß von fibrotischen Veränderungen und die Lokalisation von Kollagenakkumulationen treffen.

Die 4 µm dicken Schnitte wurden mit Xylol entparaffiniert und in der absteigender Alkoholreihe und *Aqua dest* bewässert.

Tabelle 6: Bewässern von Gewebe für die Sirius-Red-Färbung

	Schritt	Zeit
1	Xylol	10 min
2	Ethanol 100%	2 min
3	Ethanol 90%	2 min
4	Ethanol 70%	2 min
5	Ethanol 30%	2 min
6	<i>Aqua dest</i>	Kurz spülen
7	<i>Aqua dest</i>	5 min

Es erfolgte die Färbung der Kollagenfasern mit Sirius-Red-Färbung 1 Stunde auf dem Schüttler. Danach wurden die Schnitte zur Entfernung der überflüssigen Farbe für 2 min in 0,01 N HCL eingestellt. Anschließend erfolgte die Entwässerung der Präparate mit Ethanol in ansteigender Reihe und Entfernung des Alkohols durch Xylol.

Tabelle 7: Entwässern von Gewebe für die Sirius-Red-Färbung

	Schritt	Zeit
1	Ethanol 90%	2 min
2	Ethanol 100%	2 min
3	Xylol	5 min

Danach wurden die Präparate mit Corbit-Balsam eingedeckt.

2.1.3.4 TUNEL-Färbung

Die TUNEL-Färbung (*The terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling*) wird genutzt um die Rate der apoptischen Zellen feststellen zu können. Bei der TUNEL-Färbung werden DNA-Fragmente angefärbt, die im Rahmen der Apoptose gebildet werden.

Für die Färbung wurde der *In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein* (Roche) verwendet. Die histologischen Schnitte von 4 µm Dicke wurden entparaffiniert, bewässert und anschließend 2-mal für 5 min in TBS gewaschen.

Tabelle 8: Bewässern von Gewebe für die TUNEL-Färbung

	Schritt	Zeit
1	Xylol	10 min
2	Ethanol 100%	5 min
3	Ethanol 95%	5 min
4	Ethanol 70%	5 min
5	Ethanol 15%	5 min
6	Wasser	5 min

Das Demaskieren erfolgte mit Proteinase K für 15 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurde 2-mal mit TBS je 5 min gewaschen. Weiterhin fand die Blockierung mit 0,1M Tris/HCL ph 7,5, 3% BSA, 20% fötales Kälberserum für 30 min in feuchter Kammer statt. Anschließend wurde 1-mal für 5 min mit TBS gewaschen. Die positive Kontrolle wurde durch DNase I für 10 min in der feuchten Kammer durchgeführt und danach 2-mal je 5 min in TBS gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation aller Proben, bis auf die Negativkontrolle, mit der *TUNEL reaction mixture*, die aus 25 µl *Enzyme Solution-nucleotide mixture in reaction puffer* und 450 µl *Label Solution-Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)* bestand. Die *Terminal deoxynucleotidyl transferase* katayliert die Bindung des markierten Nukleotids zu dem freien 3'-OH DNA-Ende. Die Negativkontrolle wurde nur mit der *Label solution* inkubiert. Die Inkubation in der feuchten Kammer verlief 60 min lang, in Dunkelheit und bei 37 °C. Anschließend erfolgte, ebenfalls in Dunkelheit, das Waschen in TBS 2-mal für jeweils 5 min. Daraufhin wurden die Proben eingebettet und im Kühlschrank aufbewahrt.

2.1.4 Auswertung

2.1.4.1 Mikroskopische Auswertung

Die mikroskopische Auswertung der mit Hämatoxilin-Eosin-, Elastika-van-Giesson- und Sirius-Red-Färbung behandelten Gewebspräparate erfolgte unter dem Lichtmikroskop unter 40x Vergrößerung. Das Ausmaß der Entzündungsinfiltrate wurde anhand der 1 bis 4 Skala ausgewertet. Dabei bedeute 1-keine, 2-wenig, 3-viele und 4-extrem viele Entzündungszellinfiltrate.

Die, mittels der TUNEL-Färbung anschaulich gemachte, apoptische Zellen wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop unter 40x Vergrößerung ausgewertet. Hierbei nutzte man ebenfalls die 1-4 Skala, wobei 1-keine, 2-wenig, 3-viele und 4-extrem viele apoptische Zellen bedeutete.

Die mikroskopisch erfassten Gesichtsfelder wurden mittels der Digitalkamera in das Bildverarbeitungsprogramm Leica Qwin importiert.

2.1.4.2 Statistische Auswertung

Die statistische Berechnungen wurden mit dem Student t Test oder, falls den Messwerten keine Gaußverteilung zugrunde lag bzw. es eine kleine Probenzahl gab, mit dem Mann-Whitney U Test ausgeführt. P-Werte, die kleiner als 0,05 waren, wurden als statistisch signifikant angesehen. Alle Kennziffern wurden für die beschriebene Statistik als Mittelwert und *Standard error of the mean* angegeben.

2.2 Material

Rotationsmikrotom Leica 2155

Wasserbett Leica HI 2110

Ausgießstation Leica EG 11404

Objektträger: Knittel Glass/ Waldemar Knittel Glasbearbeitungs GmbH

Hämatoxin–Eosin–Färbung:

Autostainer Leica XL

Xylol Isomere >98% Carl Roth GmbH+Co.

Absteigende Alkoholreihe: Ethanol 100%, Ethanol 96%, Ethanol 70%

Hämalaunlösung sauer nach Mayer Carl Roth GmbH+Co.

HCL-ALK: 70% ALK+2 Tropfen HCL

Eosin G-Lösung 0,5% wässrig Carl Roth GmbH+Co.

Aufsteigende Alkoholreihe: Ethanol 70%, Ethanol 96%, Ethanol 100%

Elastika-van-Gieson-Färbung:

Autostainer Leica XL

Elastin nach Weigert: Resorcin-Fuchsin nach Weigert Waldeck GmbH&Co KG Devison

Weigert A&B Waldeck GmbH&Co KG Devison

Pikro-Fuchsin van Gieson Waldeck GmbH&Co KG Devison

Sirius-Red-Färbung:

Sirius Red Farblösung

HCL

Corbit Balsam

TUNEL-Färbung:

In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein (Roche)

TBS

Proteinase K 10-20 µg/ml Tris/HCL pH 7,4-8

0,1 M Tris

HCL ph 7,5

3% BSA

20% fötales Kälberserum
Pipetten Eppendorf Reference
Feuchte Kammer Julabo TWB5
DNase I
Dunkelkammer

Mikroskopische Auswertung:

Lichtmikroskop Olymp BX 51
Fluoreszenzmikroskop Leica DMRE
Bildbearbeitungsprogramm bei der TUNEL-Färbung Leica Qwin
Digitalkamera Olympus CAMEDIA C- 40200M
Bildverarbeitungsprogramm Für die HE-, EvG- und Sirius-Red-Färbung: Olympus DP-
Soft Version 3.2

Statistische Auswertung:

GraphPad Prism4

3. Ergebnisse

Das untersuchte Mäusekollektiv umfasste insgesamt 115 Tiere. Davon waren 57 Wildtyp-Mäuse und 58 ANT1-überexprimierende Tiere. Die Mäuse wurden in drei Gruppen unterteilt. Erste Gruppe (Gr. 1) setzte sich aus 28 nicht infizierten Wildtyp (n=15) und ANT1-überexprimierenden (n=13) Mäusen im Alter von 25 Monaten zusammen. Die zweite Gruppe (Gr. 2.1) beinhaltete 66 mit 5×10^5 pfu Coxsackievirus B3/Maus infizierte Mäuse (WT n=29 und ANT1 n=37). Die Tiere wurden im Alter von 6,5 Wochen infiziert. Die Mäuse aus der 2.1 Gruppe wurden im Verlauf der Myokarditis, die durch die Coxsackievirus B3-Infektion ausgelöst wurde, zu vier verschiedenen Zeitpunkten untersucht: am 4., 8., 14. und 28. Tag der Infektion. Die dritte Tiergruppe (Gr. 2.2) wurde aus 21 nicht infizierten Mäusen (WT n=13 und ANT n=8) gebildet und diente für die infizierte Mäuse aus der Gruppe 2.1 als Kontrollgruppe. Die Mäuse aus der 2.2 Gruppe waren bei der Tötung 6 Wochen alt. Die 2.2 Kontrollgruppe war für die 2.1 Mäusegruppe und für alle Untersuchungszeitpunkte der Myokarditis möglich, weil bei den nicht infizierten Kontrolltieren keine Veränderungen der Herzstruktur innerhalb von wenigen Tagen zu erwarten waren.

Tabelle 9: Mäusegruppenaufteilung

Mäuse-Gruppen		Gruppe 1	Gruppe 2.1				Gruppe 2.2 (Kontrollgruppe)
		C57BL/6 WT/ANT Nicht infizierte Abschnitt 3.1.	C57BL/6 WT/ANT CVB3 infizierte Abschnitt 3.2.				
Tag der Infektion			4.	8.	14.	28.	
Färbungen	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	3.1.1.	3.2.1.1.	3.2.1.2.	3.2.1.3.	3.2.1.4.	3.2.1.1. 3.2.1.2. 3.2.1.3.
	Elastika-van-Gieson-Färbung	3.1.2.	3.2.2.1.	3.2.2.2.	3.2.2.3.		3.2.2.1. 3.2.2.2. 3.2.2.3.
	Sirius-Red-Färbung	3.1.3.			3.2.3.		3.2.3.
	TUNEL-Färbung	3.1.4.					

3.1 Nicht infizierte Mäusegruppe (Gruppe 1)

3.1.1 Grundstruktur der murinen Herzen

Zur Charakterisierung der Herzstruktur der Wildtyp-Tiere und der ANT1-überexprimierenden Tiere unter Basalbedingungen diente die Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Diese Färbung gilt in der Histologie als Übersichtsfärbung die neben Kernstrukturen und Zytoplasmabeschaffenheit unter anderem auch interstitielle Einlagerungen und kollagene Fasern unterscheiden lässt. Die Auswertung erfolgte unter dem Lichtmikroskop und konzentrierte sich außer auf die Beurteilung der Herzmuskelstruktur auf die Ausprägung von pathologischen Läsionen. Unter den Läsionen verstanden wir Einlagerungen von Entzündungszellen oder kollagenen Fasern, die Anhalt für frühere oder zur Zeit der Tötung stattfindende Herzmuskelschädigungen im Sinne von Entzündungen oder Belastungen geben könnten. Hierbei konnten wir keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen von Tieren feststellen (Tabelle und Diagramm 10). In beiden untersuchten Tiergruppen beobachteten wir keine bis kaum Läsionen: WT 1.200 ± 0.107 und ANT1 1.154 ± 0.104 . Die Signifikanzprüfung bewies mit $p=0.761$ eindeutig keine signifikanten Unterschiede zwischen den Wildtyp-Tieren und den ANT1-überexprimierenden Tieren bezüglich des Vorhandenseins von Läsionen.

Tabelle und Diagramm 10: Nicht infizierte Mäuse Gruppe 1, Hämatoxin-Eosin-Färbung

	Mean ± SEM		Signifikanz
	WT	ANT1	ANT1 vs WT
Läsionen	1.200 ± 0.107 N = 15	1.154 ± 0.104 N = 13	n.s. p = 0.761

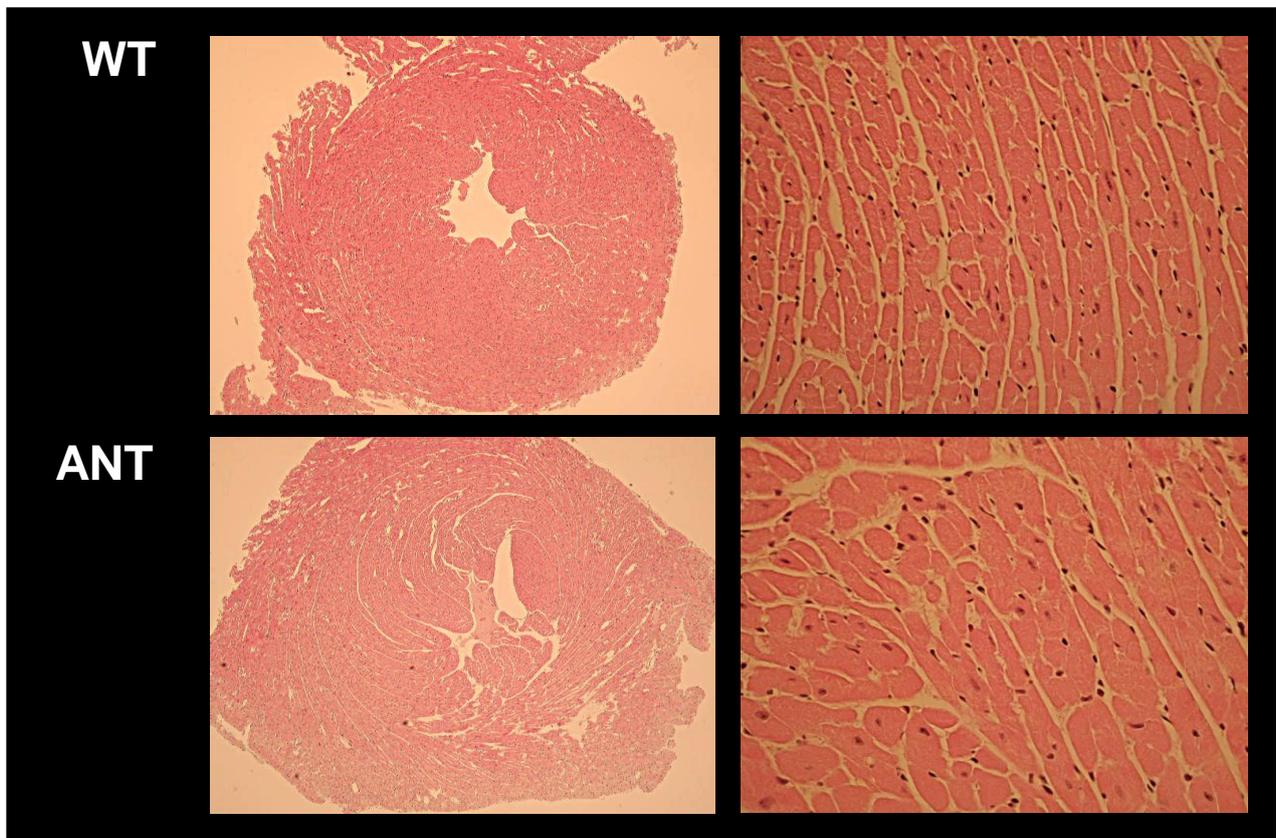
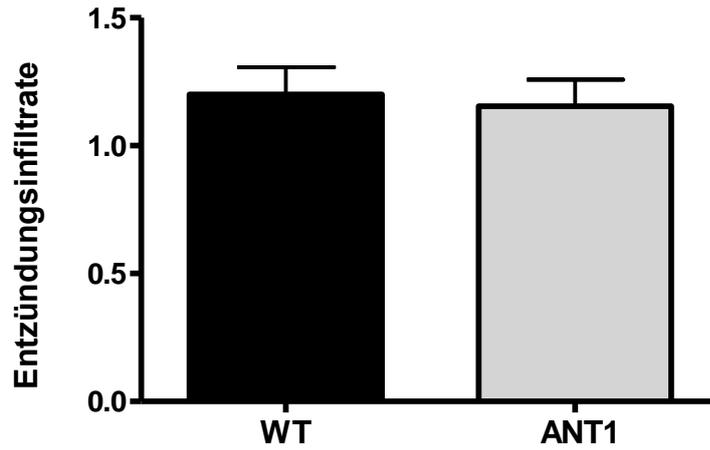


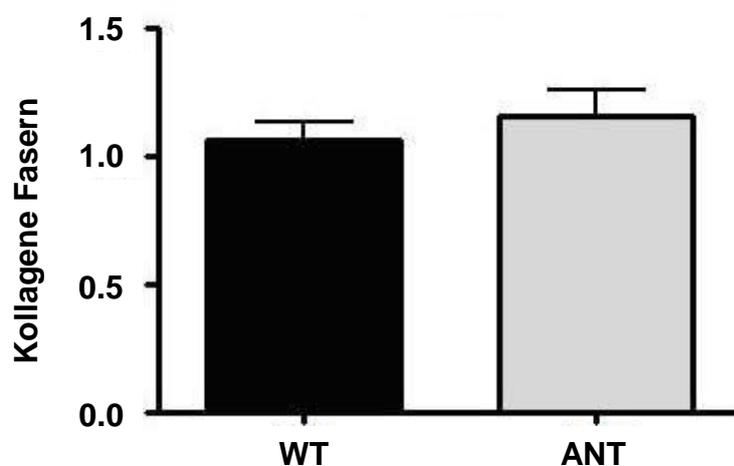
Abbildung 2: Nicht infizierte Mäuse Gruppe 1: WT- und ANT1-überexprimierende Tiere, Hämatoxin-Eosin-Färbung, links: 4x Vergrößerung, rechts: 40x Vergrößerung

3.1.2 Myokardialer Gehalt an kollagenen Fasern

Die Elastika-van-Gieson-Färbung ermöglicht eine brillante Differenzierung zwischen Kernen, Bindegewebe, Muskulatur und elastischen Fasern. Wir bedienten uns dieser Färbung um einen Überblick über die extrazelluläre Matrix, Kollagengehalt und dessen Verteilung im Herzen zu gewinnen. Dabei werteten wir mit unserer Skala den Kollagengehalt in der extrazellulären Matrix aus. Für die Wildtyp-Gruppe wurde der Score von 1.067 ± 0.067 ermittelt, während für die ANT1-Gruppe der Score bei 1.154 ± 0.104 lag (Tabelle und Diagramm 11). Hinsichtlich des Vorhandenseins von kollagenen Fasern und deren Ausmaßes im Mäuseherzen der Wildtyp-Tiere und der ANT1-überexprimierenden Tieren wurden dementsprechend keine signifikanten Unterschiede beobachtet $p=0.475$.

Tabelle und Diagramm 11: Nicht infizierte Mäuse Gruppe 1, Elastika-van-Gieson-Färbung

	Mean \pm SEM		Signifikanz
	WT	ANT1	
Kollagene Fasern	1.067 ± 0.067 N = 15	1.154 ± 0.104 N = 13	n.s. $p = 0.475$



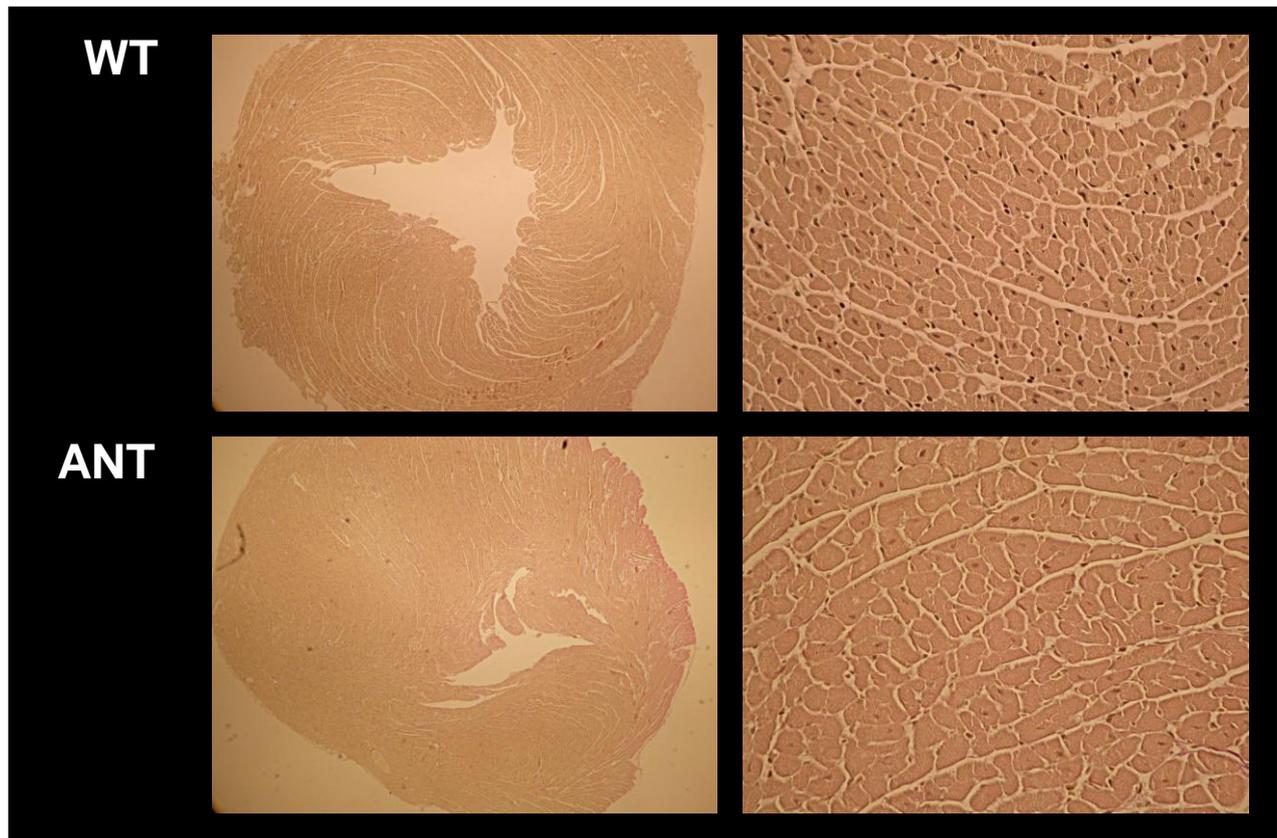
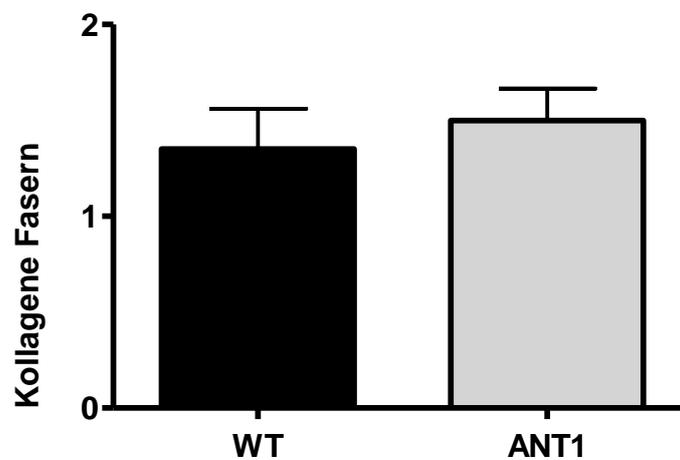


Abbildung 3: Nicht infizierte Mäuse Gruppe 1: WT- und ANT1-überexprimierende Tiere, Elastika-van-Gieson-Färbung, links: 4x Vergrößerung, rechts: 40x Vergrößerung

3.1.3 Myokardialer Kollagengehalt

Wie bereits dargestellt, gewannen wir den groben Überblick über die extrazelluläre Matrix, Kollagengehalt und dessen Verteilung im Herzen anhand der Standardfärbung Elastika-van-Gieson. Um noch genauer den Kollagengehalt beurteilen zu können erfolgte die Bestimmung des myokardialen Gesamtkollagens mittels Sirius-Red-Färbung. Die Färbung ist optimal für die Darstellung der kollagenen und retikulären Fasern im extrazellulären Raum von Gewebe geeignet. Die Auswertung hinsichtlich des Vorhandenseins des Kollagens innerhalb der extrazellulären Matrix von Wildtyp-Tieren ergab der Score von 1.350 ± 0.211 und bei den ANT1-überexprimierenden Tieren von 1.500 ± 0.167 (Tabelle und Diagramm 12). Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden $p=0.584$.

Tabelle und Diagramm 12: Nicht infizierte Mäuse Gruppe 1, Sirius-Red-Färbung			
	Mean \pm SEM		Signifikanz
	WT	ANT1	ANT1 vs WT
Kollagene Fasern	1.350 ± 0.211 N = 10	1.500 ± 0.167 N = 10	n.s. $p = 0.584$



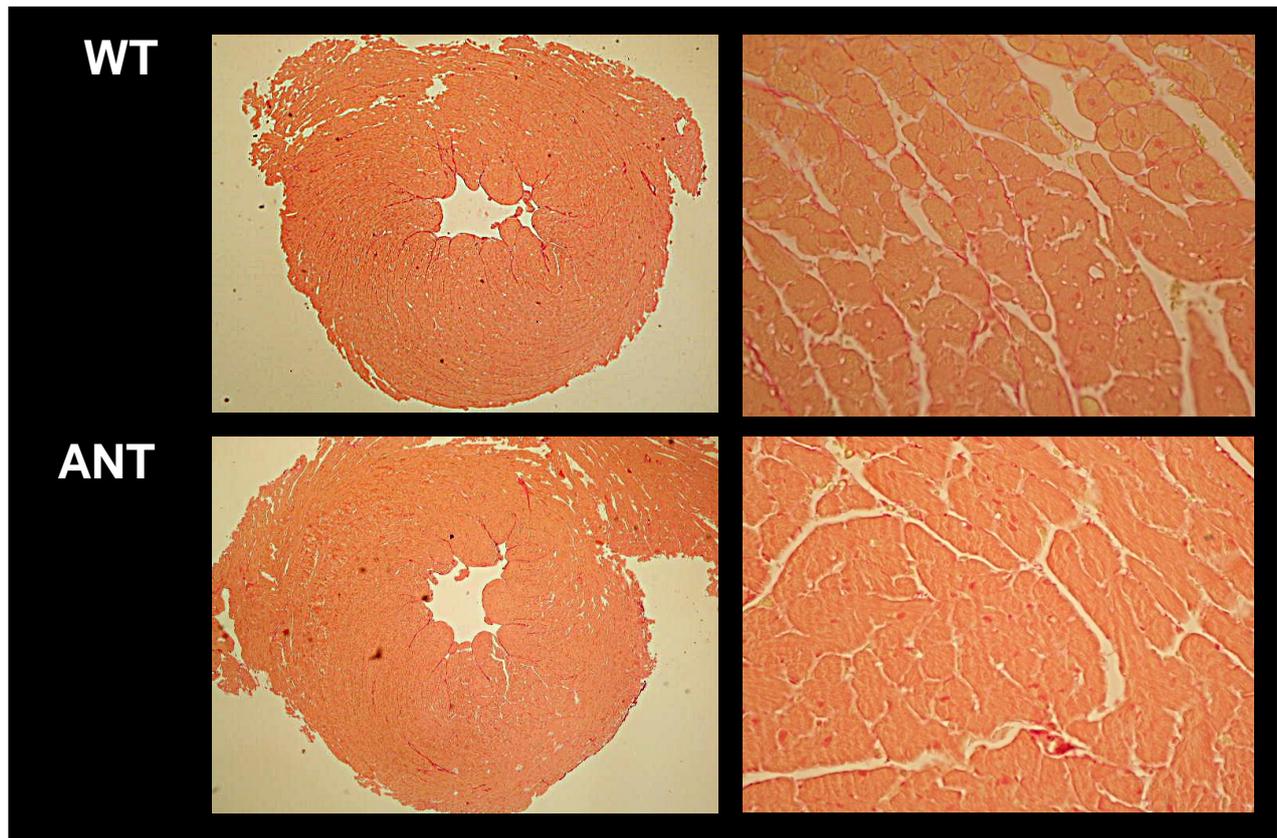


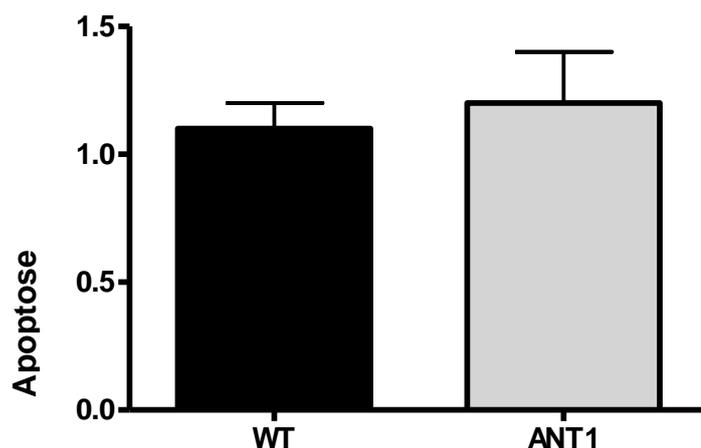
Abbildung 4: Nicht infizierte Mäuse Gruppe 1: WT- und ANT1-überexprimierende Tiere, Sirius-Red-Färbung, links: 4x Vergrößerung, rechts: 40x Vergrößerung

3.1.4 Myokardiale Apoptoserate

Zu der Grundcharakterisierung der Wildtyp-Tiere und ANT1-überexprimierenden Tiere wurde auch das Ausmaß der Apoptose im Herzen von den beiden Tiergruppen ausgewertet und miteinander verglichen. Hierbei machte man sich die TUNEL-Färbung zunutze, die die apoptischen Zellen anfärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop anschaulich macht. Für die Wildtyp-Gruppe wurde der Score von 1.100 ± 0.100 ermittelt, während für die ANT1-Gruppe der Score bei 1.200 ± 0.200 lag (Tabelle und Diagramm 13). Es stellten sich keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Apoptoserate zwischen den Wildtyp-Tieren und den ANT1-überexprimierenden Tieren $p=0.667$ dar.

Tabelle und Diagramm 13: Nicht infizierte Mäuse Gruppe 1, TUNEL-Färbung

	Mean \pm SEM		Signifikanz
	WT	ANT1	ANT1 vs WT
Apoptose	1.100 ± 0.100 N = 5	1.200 ± 0.200 N = 5	n.s. $p = 0.667$



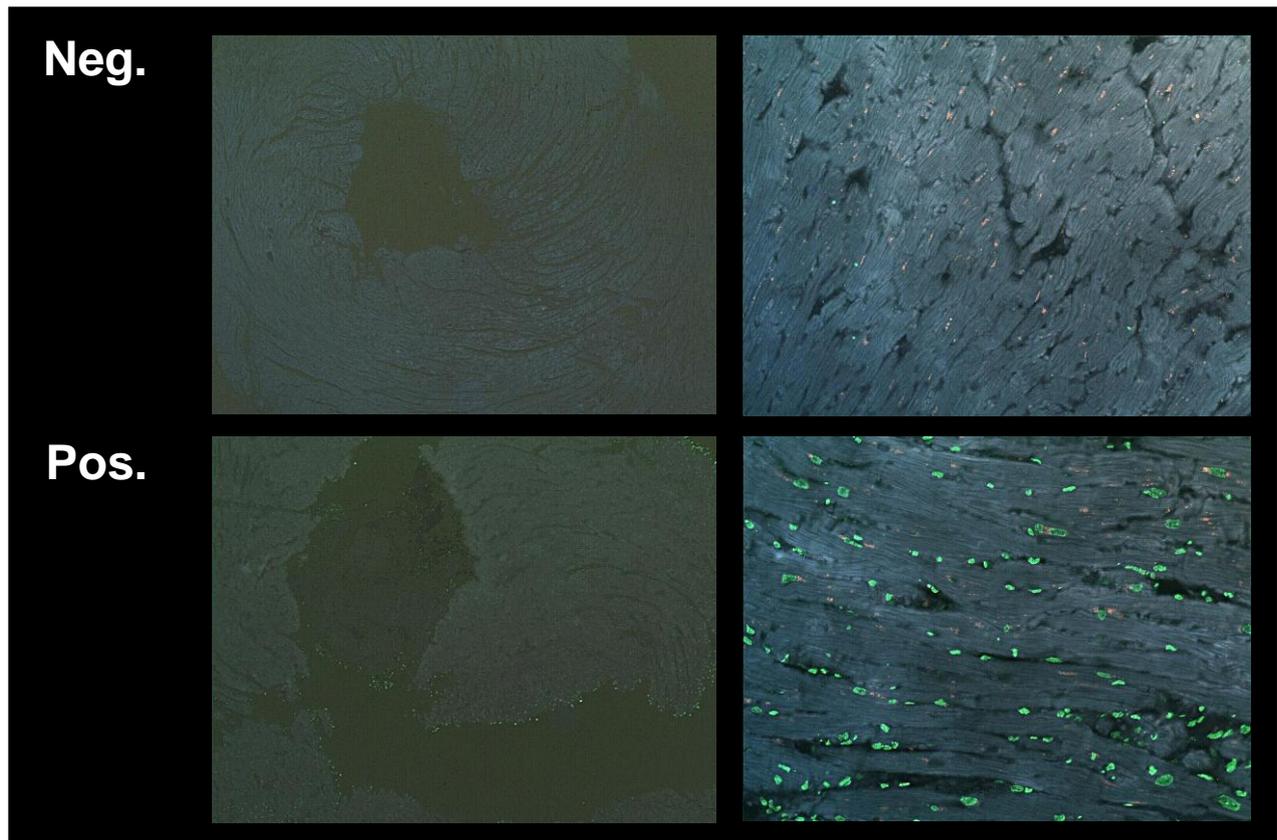


Abbildung 5: Positiv- und Negativ-Kontrolle in der TUNEL-Färbung, links: 4x Vergrößerung, rechts: 40x Vergrößerung



Abbildung 6: Nicht infizierte Mäuse Gruppe 1: WT- und ANT1-überexprimierende Tiere, TUNEL-Färbung, links: 4x Vergrößerung, rechts: 40x Vergrößerung

3.2 Mit 5×10^5 pfu CVB3/Tier infizierte Mäusegruppe und nicht infizierte Kontrollgruppe (Gruppen 2.1 und 2.2)

Kawaii et al. (23) unterteilte den Verlauf der virusinduzierten Myokarditis in drei Phasen: akute (0.-3. Tag p. i.), subakute (4.-14. Tag p. i.) und chronische (>15. Tag p. i.). Dabei bedeutet die akute Phase die Zeit der virusinduzierten Zytotoxizität ohne Ausbildung von Entzündungszellinfiltraten. Erst in der subakuten Phase findet die Immunantwort statt. Weil unsere Analyse das Augenmerk auf strukturelle Veränderungen im Verlauf der Myokarditis richtet und das Ausmaß der Immunantwort gemessen anhand der Ausbildung von Entzündungszellinfiltraten und Veränderungen der extrazellulären Matrix untersucht, modifizierten wir die Kawaii et al. Aufteilung. Dabei definierten wir den 4. Tag p. i., den ersten Tag, an dem Entzündungszellinfiltrate feststellbar sind, als frühe Phase der Myokarditis. Als Ecksteine der akuten Phase der viralen Herzmuskelentzündung wählten wir den 8. Tag p. i. als maximale Ausprägung der Immunantwort und den 14. Tag p. i. als Ende der akuten Phase der Entzündung. Als letzten Zeitpunkt unserer Analyse nahmen wir den 28. Tag p. i., an dem wir von völliger Ausheilung ausgingen.

3.2.1 Entzündungsinfiltrate in mit 5×10^5 pfu CVB3/Tier infizierter Mäusegruppe und nicht infizierter Kontrollgruppe (Gruppe 2.1 und 2.2)

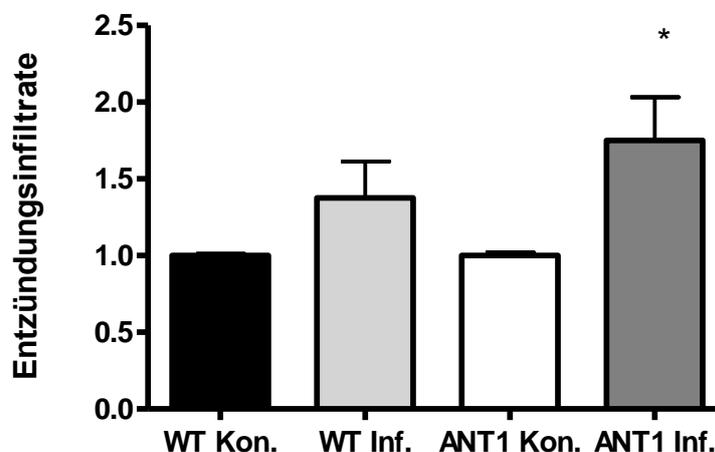
Die Herzmuskelentzündung macht sich unter anderem durch das Vorhandensein von Infiltraten aus Entzündungszellen wie T-Lymphozyten, Fibroblasten und Makrophagen bemerkbar. Die Entstehung und das Ausmaß der Läsionen wurden anhand der Hämatoxylin-Eosin-Färbung veranschaulicht und ausgewertet.

3.2.1.1 Myokardiale Entzündungsinfiltrate am 4. Tag der Infektion

Hinsichtlich des Vorhandenseins und Ausmaßes der Entzündungszellinfiltrate am 4. Tag p. i. wiesen sowohl die Wildtyp-Mäuse als auch die ANT1-überexprimierenden Tiere im Vergleich zu den nicht infizierten Kontrolltieren erwartungsgemäß erhöhte Werte auf. Hierbei wurde zwischen den nicht infizierten Kontrollen und den infizierten Wildtyp-Tieren nur eine tendenzielle Erhöhung der Infiltrate $p=0.132$ von 1.077 ± 0.077 auf 1.375 ± 0.239 festgestellt (Tabelle und Diagramm 14). Hingegen konnte bei den infizierten ANT1-überexprimierenden Tieren eine signifikante Zunahme der Entzündungsinfiltrate von 1.063 ± 0.062 auf 1.750 ± 0.281 $p=0.020$ im Vergleich zu nicht infizierten ANT1-überexprimierenden Mäusen beobachtet werden. Kein signifikanter Unterschied $p=0.375$ bestand zwischen den infizierten Wildtyp-Tieren und infizierten ANT1-überexprimierenden Mäusen.

Tabelle und Diagramm 14: 5×10^5 pfu CVB3/Tier infizierte Mäuse Gruppe 2.1 und nicht infizierte Kontrollgruppe 2.2, Hämatoxylin-Eosin-Färbung 4. d p. i.

	Mean \pm SEM				Signifikanz			
	WT Kon.	ANT1 Kon.	WT Inf.	ANT1 Inf.	ANT1 Kon. vs WT Kon.	WT Inf. vs WT Kon.	ANT1 Inf. vs ANT1 Kon.	WT Inf. vs ANT1 Inf.
Entzündungsinfiltrate	1.077 ± 0.077 N = 13	1.063 ± 0.062 N = 8	1.375 ± 0.239 N = 4	1.750 ± 0.281 N = 6	n.s. $p = 0.897$	ten. $p = 0.132$	s. $p = 0.020$	n.s. $p = 0.375$



* $p=0.008$ ANT1 Inf. vs ANT1 Kon.

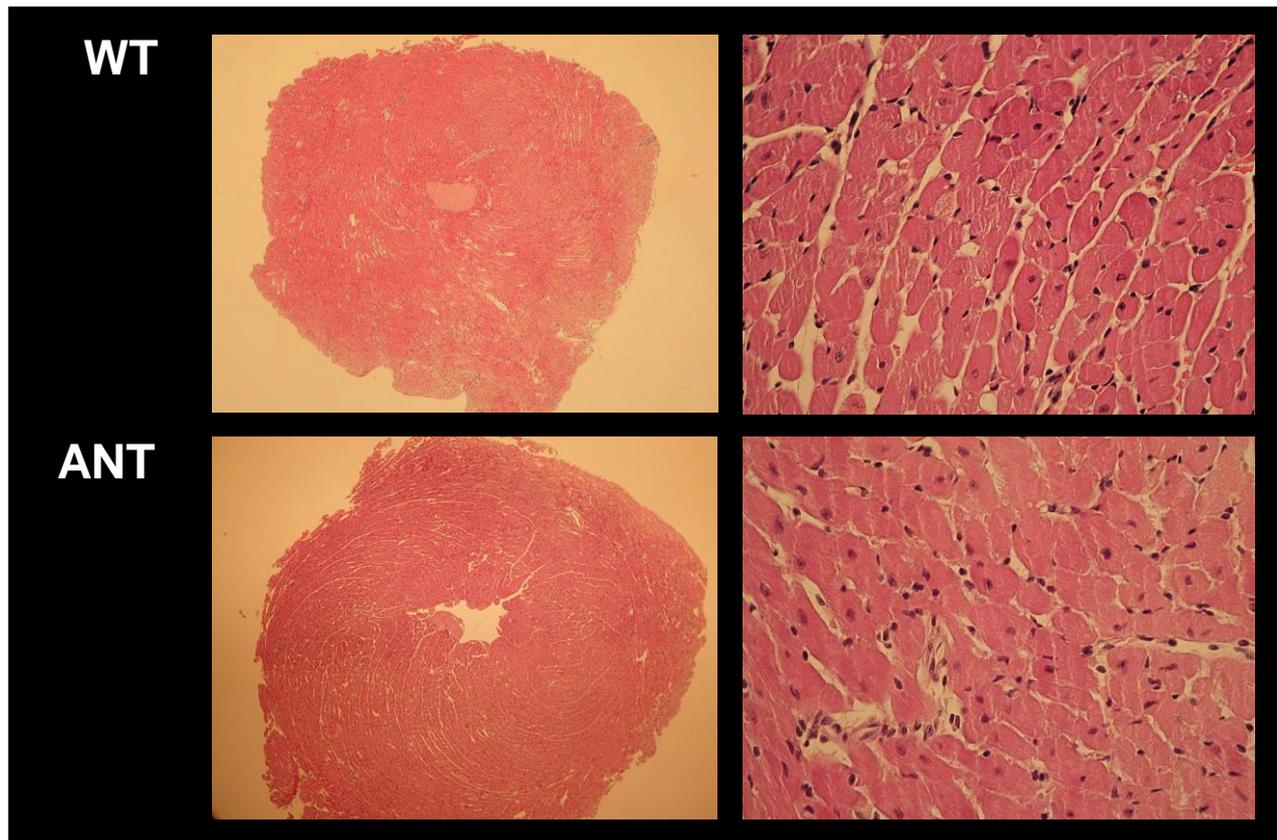
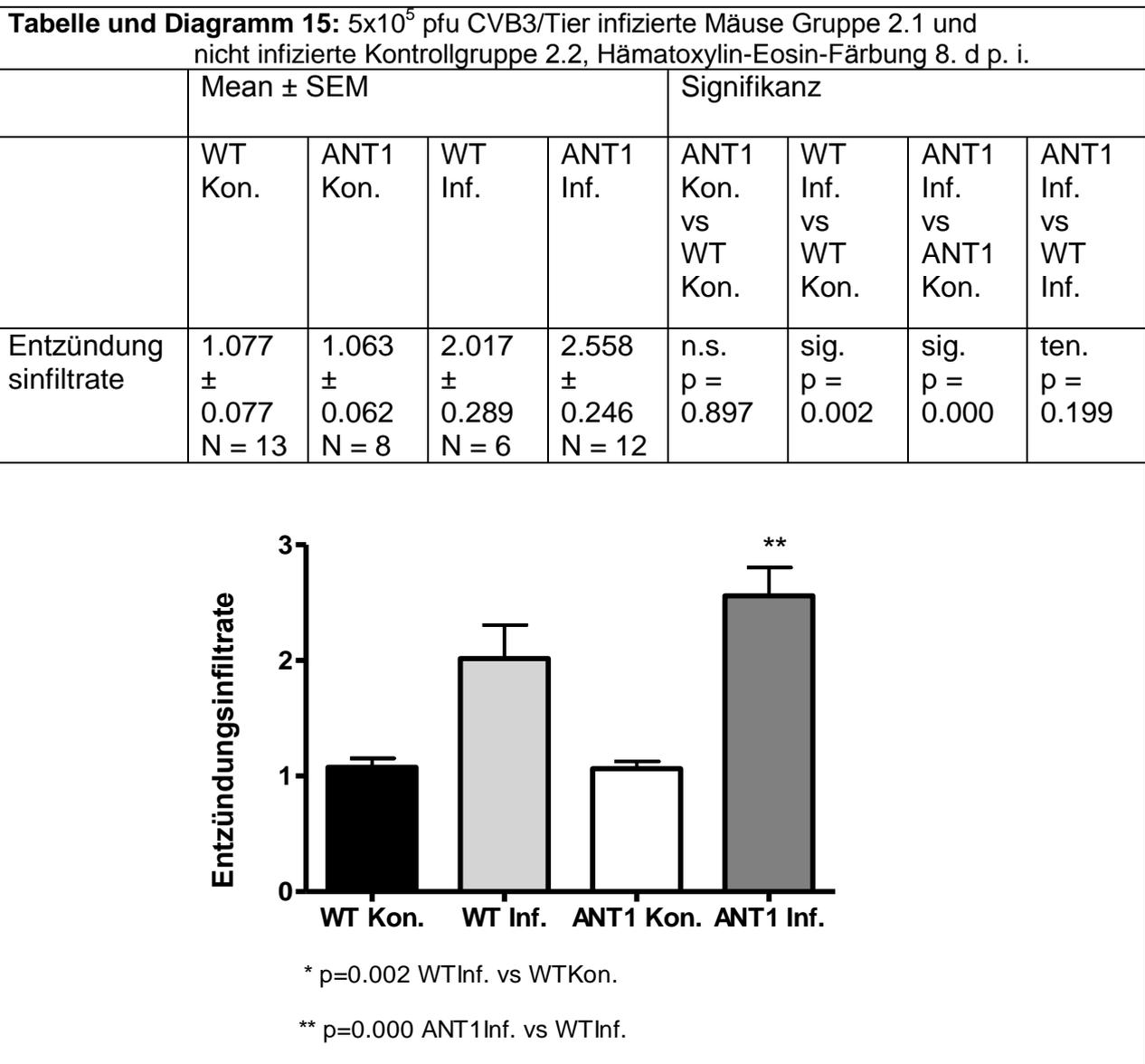


Abbildung 7: 5×10^5 pfu CVB3/Tier infizierte Mäuse Gruppe 2.1: WT- und ANT1-überexprimierende Tiere, Hämatoxylin-Eosin-Färbung 4. d p. i., links: 4x Vergrößerung, rechts: 40x Vergrößerung

3.2.1.2 Myokardiale Entzündungsinfiltrate am 8.Tag der Infektion

Im weiteren Verlauf der Myokarditis, am 8. Tag p. i. nahmen die Entzündungsinfiltrate sowohl bei den infizierten Wildtyp-Tieren als auch bei den ANT1-überexprimierenden Tieren weiterhin zu. Bei den ANT1-überexprimierenden Mäusen stiegen die Läsionen am 8. Tag p. i. im Vergleich zum 4. Tag p. i. von 1.750 ± 0.281 auf 2.558 ± 0.246 und zeigten in der Signifikanzprüfung eine tendenziell stärkere Zunahme $p=0.199$ der Entzündungszellinfiltrate als die Wildtyp-Tiere (Tabelle und Diagramm 15). Bei den Wildtyp-Mäusen sahen wir nämlich nur einen Anstieg der Läsionen von 1.375 ± 0.239 auf 2.017 ± 0.289 . Im Vergleich mit den Kontrolltieren wiesen am 8. Tag p. i. sowohl die Wildtyp-Tiere als auch die ANT1-überexprimierenden Tiere eine signifikante Zunahme der Entzündungsinfiltrate WT $p=0.002$ und ANT1 $p=0.000$ auf.



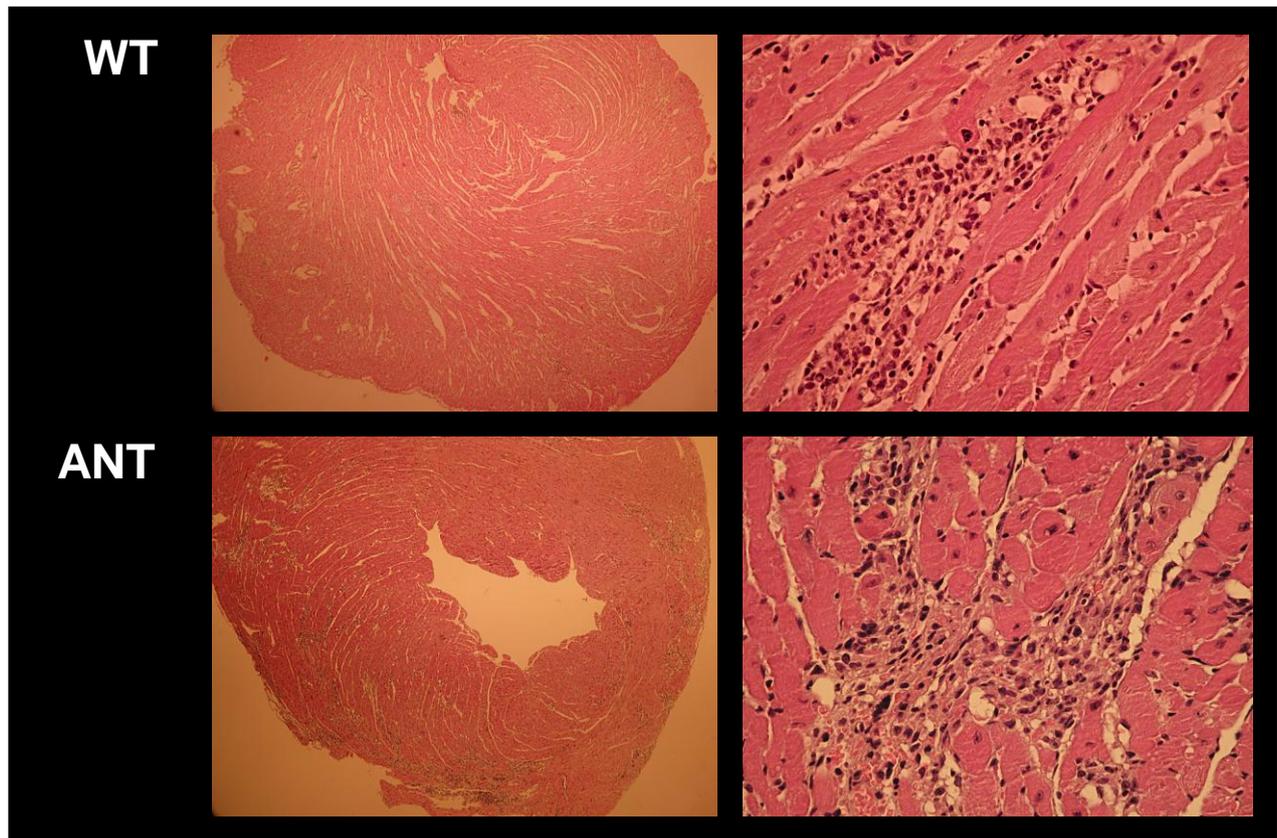


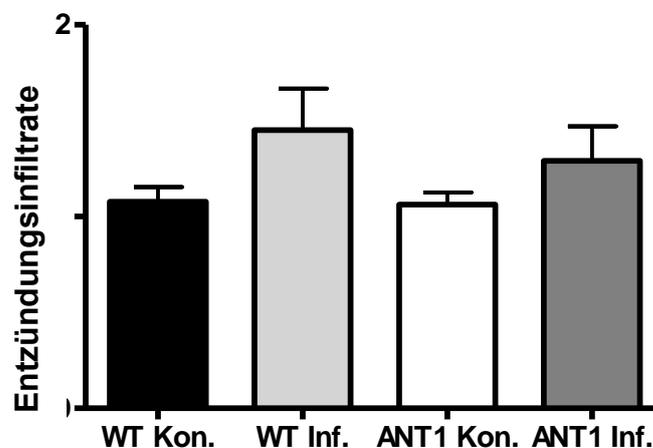
Abbildung 8: 5×10^5 pfu CVB3/Tier infizierte Mäuse Gruppe 2.1: WT- und ANT1-überexprimierende Tiere, Hämatoxylin-Eosin-Färbung 8. d p. i., links: 4x Vergrößerung, rechts: 40x Vergrößerung

3.2.1.3 Myokardiale Entzündungsinfiltrate am 14. Tag der Infektion

Am Tag 14 p. i. wurde eine Abnahme der Entzündungsinfiltrate beobachtet. Dabei fiel der Mittelwert bei den ANT1-überexprimierenden Tieren von 3.2200 ± 0.286 am Tag 8 p. i. auf 1.292 ± 0.179 am Tag 14 p. i. (Tabelle und Diagramm 16). Eine schwächere Abnahme der Infiltrate von 2.500 ± 0.354 am Tag 8 p. i. auf 1.450 ± 0.217 am Tag 14 p. i. stellte sich auch bei den Wildtyp-Tieren dar. Nach dem Abfall der Entzündungsinfiltrate zeigten die Wildtyp-Tiere und die ANT1-überexprimierenden Tiere im Vergleich keine signifikanten Unterschiede in Hinsicht auf die Infiltratentwicklung $p=0.576$. Das Infiltratmaß im Vergleich zu den Kontrolltieren ergab bei den ANT1-überexprimierenden Tieren keine signifikanten Unterschiede mehr. Wohingegen sich bei den Wildtyp-Tieren trotz der Abnahme an Infiltraten eine tendenzielle Erhöhung an Läsionen im Vergleich zu den Kontrolltieren beobachten ließ $p=0.193$.

Tabelle und Diagramm 16: 5×10^5 pfu CVB3/Tier infizierte Mäuse Gruppe 2.1 und nicht infizierte Kontrollgruppe 2.2, Hämatoxylin-Eosin-Färbung 14. d p. i.

	Mean \pm SEM				Signifikanz			
	WT Kon.	ANT1 Kon.	WT Inf.	ANT1 Inf.	ANT1 Kon. vs WT Kon.	WT Inf. vs WT Kon.	ANT1 Inf. vs ANT1 Kon.	ANT1 Inf. vs WT Inf.
Entzündungsinfiltrate	1.077 \pm 0.077 N = 13	1.063 \pm 0.062 N = 8	1.450 \pm 0.217 N = 10	1.292 \pm 0.179 N = 12	n.s. p = 0.897	ten. p = 0.193	n.s. p = 0.600	n.s. p = 0.576



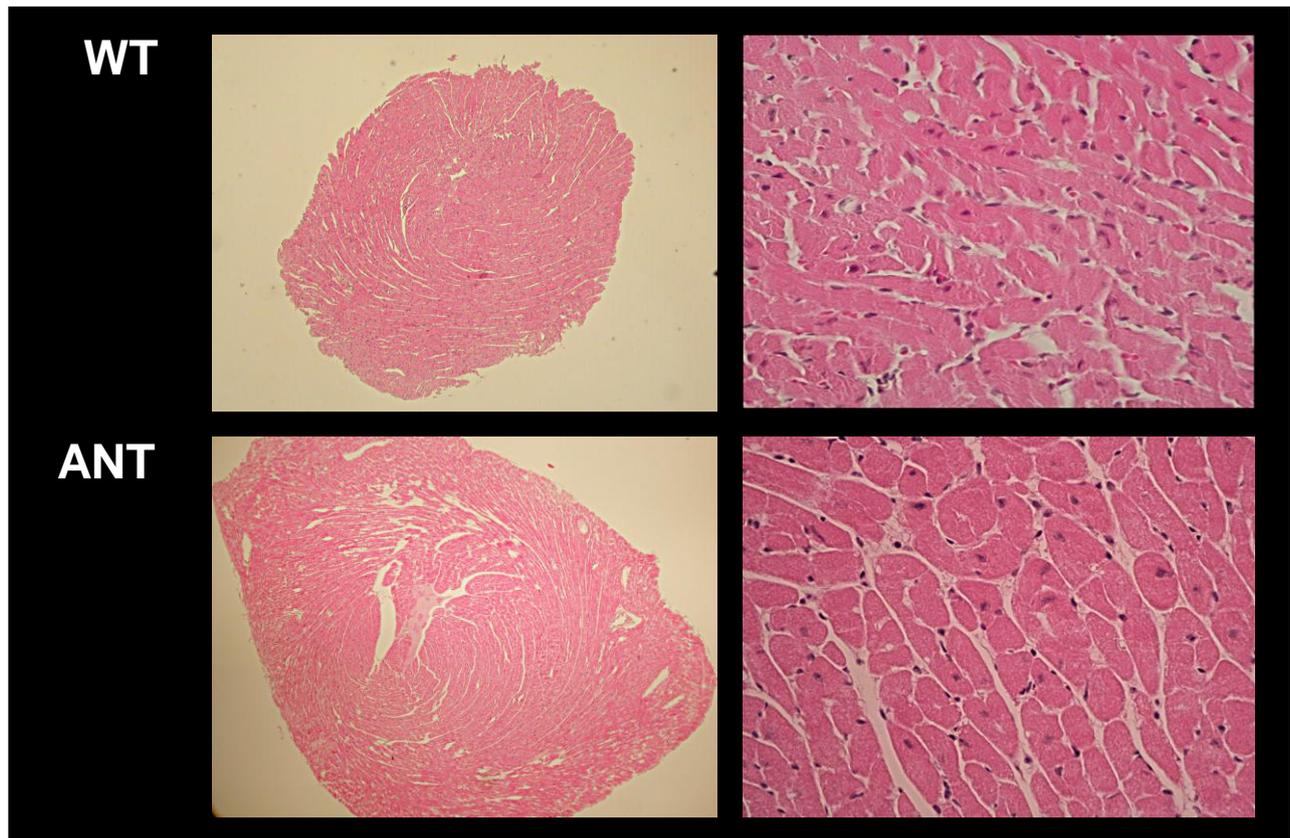


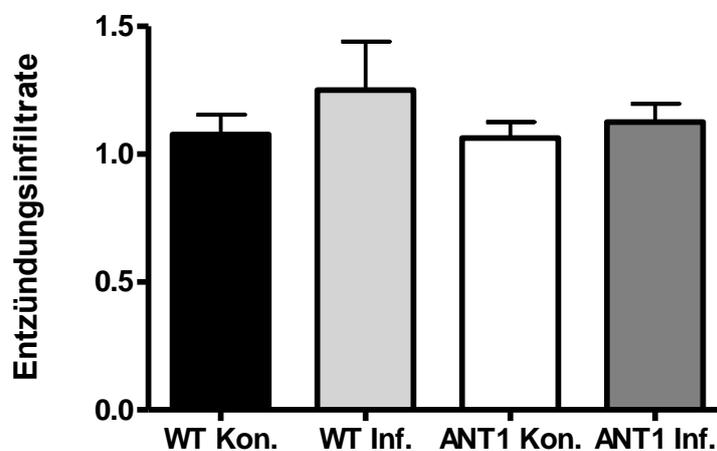
Abbildung 9: 5×10^5 pfu CVB3/Tier infizierte Mäuse Gruppe 2.1: WT- und ANT1-überexprimierende Tiere, Hämatoxylin-Eosin-Färbung 14. d p. i., links: 4x Vergrößerung, rechts: 40x Vergrößerung

3.2.1.4 Myokardiale Entzündungsinfiltrate am 28. Tag der Infektion

Im Verlauf der Myokarditis wurde eine völlige Rückbildung der Entzündungsinfiltrate sowohl bei den ANT1-überexprimierenden Tieren als auch bei den Wildtyp-Tieren am 28. Tag festgestellt. Bei den Wildtyp-Tieren nahmen die Entzündungszellinfiltrate von durchschnittlich 1.450 ± 0.217 am 14. Tag p. i. auf 1.250 ± 0.191 am 28. Tag p. i. ab (Tabelle und Diagramm 17). Damit unterschieden sich die infizierten Wildtyp-Tieren nicht mehr von deren nicht infizierten Kontrollen $p=0.336$. Ebenfalls in der ANT1-überexprimierenden Mäusegruppe kam es zu einem weiteren Abfall der Entzündungszellinfiltrate von 1.292 ± 0.179 am 14. Tag der Entzündung auf 1.125 ± 0.072 am 28. Tag p. i.. In der Signifikanzprüfung wiesen die ANT1-überexprimierenden Mäuse im Vergleich zu den nicht infizierten Kontrollen keinen signifikanten Unterschied mehr auf ($p=0.552$). Weiterhin bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den infizierten Wildtyp-Tieren und den infizierten ANT1-überexprimierenden Tieren ($p=0.918$).

Tabelle und Diagramm 17: 5×10^5 pfu CVB3/Tier infizierte Mäuse Gruppe 2.1 und nicht infizierte Kontrollgruppe 2.2, Hämatoxylin-Eosin-Färbung 28. d p. i.

	Mean \pm SEM				Signifikanz			
	WT Kon.	ANT1 Kon.	WT Inf.	ANT1 Inf.	ANT1 Kon. vs WT Kon.	WT Inf. vs WT Kon.	ANT1 Inf. vs ANT1 Kon.	ANT1 Inf. vs WT Inf.
Entzündung sinfiltrate	1.077 \pm 0.077 N = 13	1.063 \pm 0.062 N = 8	1.250 \pm 0.191 N = 9	1.125 \pm 0.072 N = 7	n.s. p = 0.897	n.s. p = 0.336	n.s. p = 0.522	n.s. p = 0.918



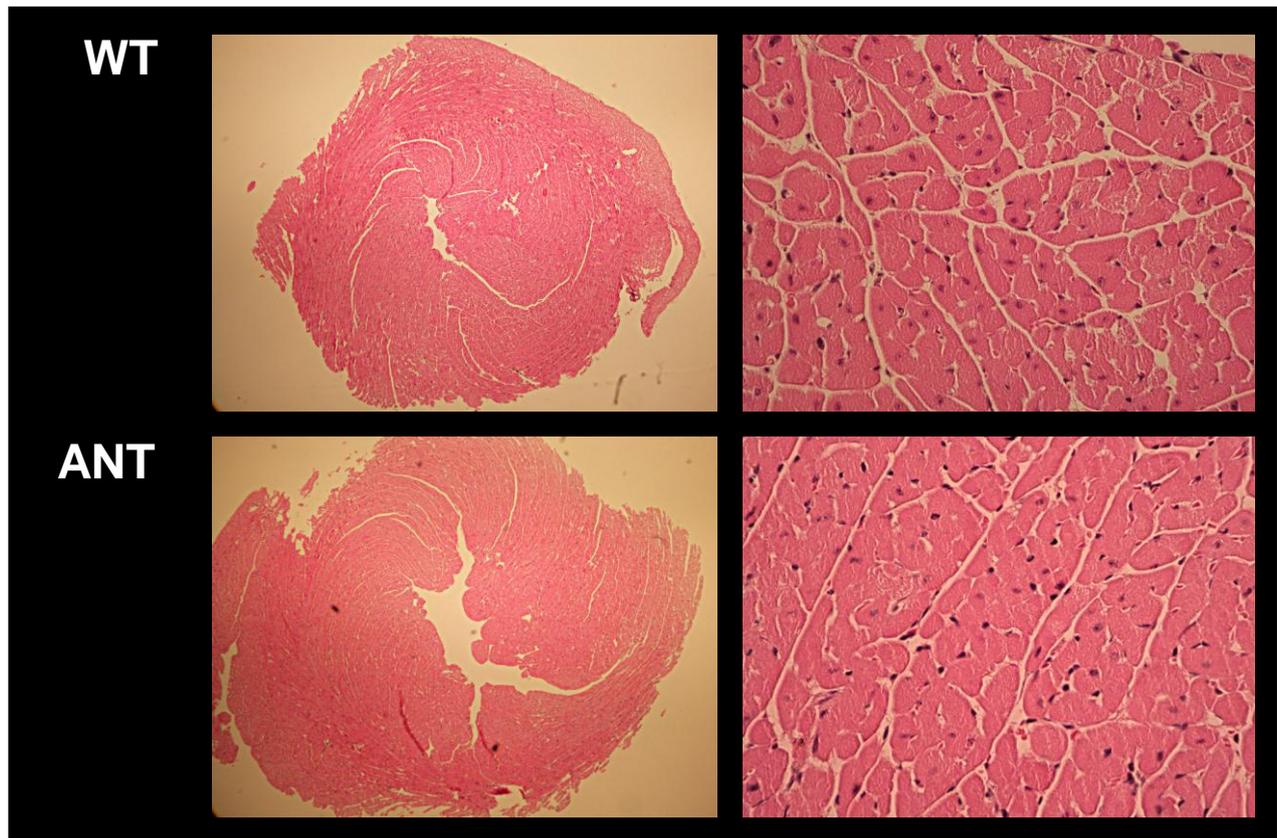


Abbildung 10: 5×10^5 pfu CVB3/Tier infizierte Mäuse Gruppe 2.1: WT- und ANTI1-überexprimierende Tiere, Hämatoxylin-Eosin-Färbung 28. d p. i., links: 4x Vergrößerung, rechts: 40x Vergrößerung

3.2.2 Myokardialer Gehalt an kollagenen Fasern in mit 5×10^5 pfu CVB3/Tier infizierter Mäusegruppe und nichtinfizierter Kontrollgruppe (Gruppen 2.1 und 2.2)

Anhand von der Elastika-van-Gieson-Färbung wurden die kollagene Fasern in murinen Herzen dargestellt.

3.2.2.1 Myokardialer Gehalt an kollagenen Fasern am 4. Tag der Infektion

In Hinblick auf das Vorhandensein und das Ausmaß der kollagenen Fasern am 4. Tag p. i. wurde so gut wie keine Veränderung zwischen den nicht infizierten Kontrolltieren und den infizierten Wildtyp-Tieren festgestellt $p=0.779$ (Tabelle und Diagramm 18). Bei den ANT1-überexprimierenden Tieren hingegen im Vergleich zu den Kontrolltieren beobachteten wir eine deutliche Zunahme der kollagenen Fasern von 1.050 ± 0.050 auf 1.667 ± 0.307 , die jedoch nur als tendenziell $p=0.125$ aber nicht als signifikant gewertet wurde. Ebenfalls nur einen tendenziell jedoch nicht signifikant höheren Kollagengehalt $p=0.171$ ergab die statistische Auswertung bei den infizierten ANT1-überexprimierenden Tieren im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren.

Tabelle und Diagramm 18: 5×10^5 pfu CVB3/Tier infizierte Mäuse Gruppe 2.1 und nicht infizierte Kontrollgruppe 2.2, Elastika-van-Gieson-Färbung 4. d p. i.

	Mean \pm SEM				Signifikanz			
	WT Kon.	ANT1 Kon.	WT Inf.	ANT1 Inf.	ANT1 Kon. vs WT Kon.	WT Inf. vs WT Kon.	ANT1 Inf. vs ANT1 Kon.	ANT1 Inf. vs WT Inf.
Kollagene Fasern	1.042 \pm 0.042 N = 6	1.050 \pm 0.050 N = 5	1.063 \pm 0.062 N = 4	1.667 \pm 0.307 N = 6	n.s. p = 0.900	n.s. p = 0.779	ten. p = 0.125	ten. p = 0.171

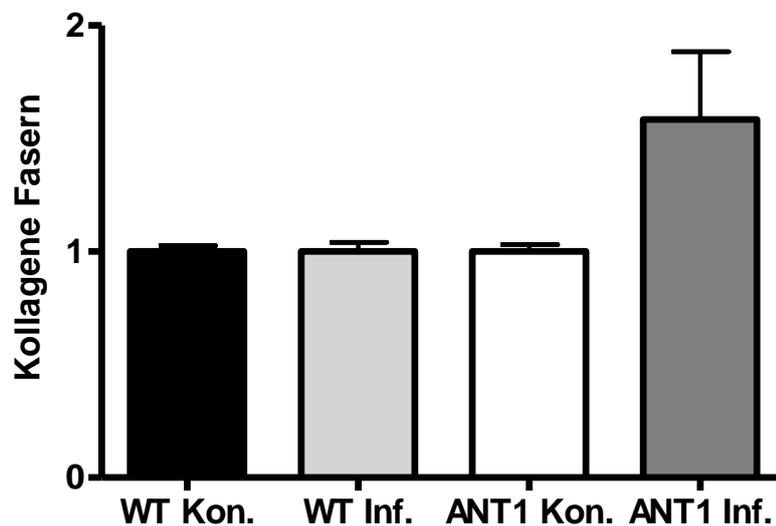




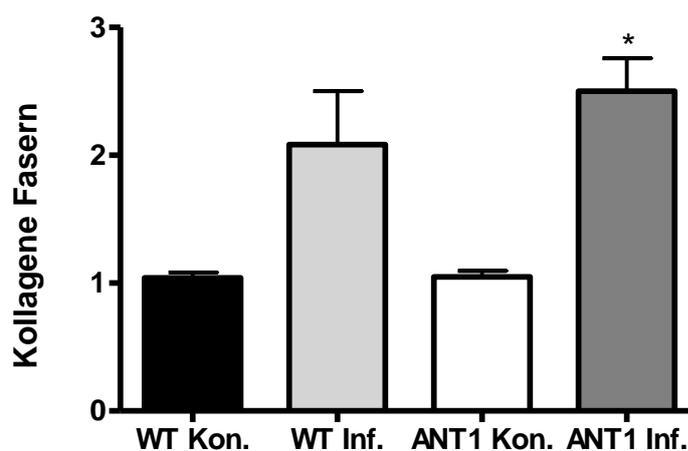
Abbildung 11: 5×10^5 pfu CVB3/Tier infizierte Mäuse Gruppe 2.1: WT- und ANT1-überexprimierende Tiere, Elastika-van-Gieson-Färbung 4. d p. i., links: 4x Vergrößerung, rechts: 40x Vergrößerung

3.2.2.2 Myokardialer Gehalt an kollagenen Fasern am 8. Tag der Infektion

Am 8. Tag p. i. stellten wir einen Anstieg der kollagenen Fasern nicht nur bei den ANT1-überexprimierenden Tieren, sondern auch bei den Wildtyp-Tieren fest. Bei den Wildtyp-Tieren beobachteten wir eine tendenzielle Zunahme der kollagenen Fasern im Vergleich zu den Kontrolltieren $p=0.935$ und eine Erhöhung des Mittelwertes von 1.063 ± 0.062 auf 2.083 ± 0.417 (Tabelle und Diagramm 19). Wobei bei den ANT1-überexprimierenden Tieren die Signifikanzprüfung eine signifikante Erhöhung der kollagenen Fasern $p=0.001$ ergab und nahm im Vergleich zu Tag 4 p. i. von 1.667 ± 0.307 auf 2.500 ± 0.258 zu. Insgesamt folgt aus dem Vergleich des Ausmaßes der kollagenen Fasern zwischen den beiden infizierten Gruppen kein signifikanter Unterschied $p=0.382$.

Tabelle und Diagramm 19: 5×10^5 pfu CVB3/Tier infizierte Mäuse Gruppe 2.1 und nicht infizierte Kontrollgruppe 2.2, Elastika-van-Gieson-Färbung 8. d p. i.

	Mean \pm SEM				Signifikanz			
	WT Kon.	ANT1 Kon.	WT Inf.	ANT1 Inf.	ANT1 Kon. vs WT Kon.	WT Inf. vs WT Kon.	ANT1 Inf. vs ANT1 Kon.	ANT1 Inf. vs WT Inf.
Kollagene Fasern	1.042 \pm 0.042 N = 6	1.050 \pm 0.050 N = 5	2.083 \pm 0.417 N = 6	2.500 \pm 0.258 N = 10	n.s. p = 0.900	ten. p = 0.093	s. p = 0.001	n.s. p = 0.382



* $p=0.001$ ANT1 Inf. vs ANT1 Kon.

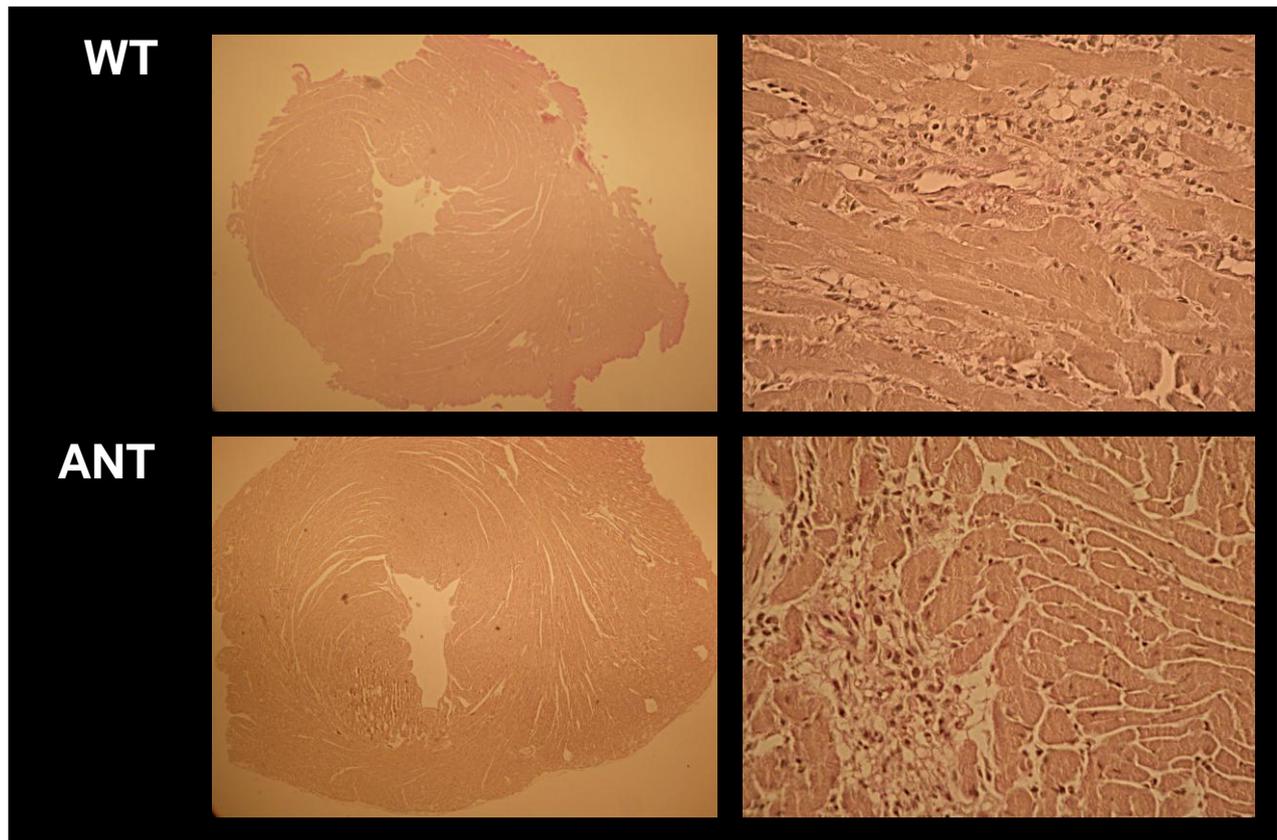


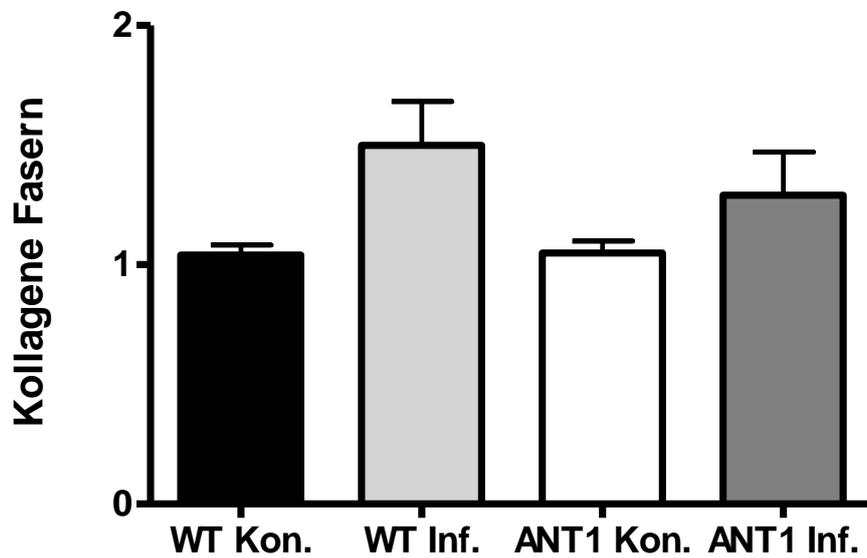
Abbildung 12: 5×10^5 pfu CVB3/Tier infizierte Mäuse Gruppe 2.1: WT- und ANT1-überexprimierende Tiere, Elastika-van-Gieson-Färbung 8. d p. i., links: 4x Vergrößerung, rechts: 40x Vergrößerung

3.2.2.3 Myokardialer Gehalt an kollagenen Fasern am 14. Tag der Infektion

Am 14. Tag p. i. stellte sich eine Abnahme der Menge der kollagenen Fasern sowohl bei den infizierten Wildtyp-Tieren als auch bei den infizierten ANT1-überexprimierenden Tieren dar. Hierbei nahm das Ausmaß der kollagenen Fasern bei den Wildtyp-Tieren von 2.083 ± 0.417 am Tag 8 p. i. auf 1.500 ± 0.183 am Tag 14 p. i. ab (Tabelle und Diagramm 20). Das Ausmaß der kollagenen Fasern am 14. Tag p. i. bei den Wildtyp-Tieren wies bei der Signifikanzprüfung keinen signifikanten Unterschied im Vergleich mit der nicht infizierten Kontrollgruppe auf, blieb aber weiterhin tendenziell erhöht $p=0.093$. Die ANT1-überexprimierenden Tiere zeigten im Verhältnis zu dem Ausmaß der kollagenen Fasern am Tag 8 p. i. eine noch stärkere Abnahme der Fasern von 2.5 ± 0.258 auf 1.292 ± 0.179 . Im Vergleich zu der Kontrollgruppe zeigten die ANT1-überexprimierenden Mäuse im Gegensatz zu Tag 8 p. i. keinen signifikanten Unterschied mehr $p=0.783$. Auch der Vergleich des Ausmaßes der kollagenen Fasern zwischen den beiden infizierten Gruppen: Wildtyp- und ANT1-überexprimierenden-Gruppe, ergab keinen signifikanten Unterschied $p=0.428$.

Tabelle und Diagramm 20: 5×10^5 pfu CVB3/Tier infizierte Mäuse Gruppe 2.1 und nicht infizierte Kontrollgruppe 2.2, Elastika-van-Gieson-Färbung 14. d p. i.

	Mean \pm SEM				Signifikanz			
	WT Kon.	ANT1 Kon.	WT Inf.	ANT1 Inf.	ANT1 Kon. vs WT Kon.	WT Inf. vs WT Kon.	ANT1 Inf. vs ANT1 Kon.	ANT1 Inf. vs WT Inf.
Kollagene Fasern	1.042 \pm 0.042 N = 6	1.050 \pm 0.050 N = 5	1.500 \pm 0.183 N = 10	1.292 \pm 0.179 N = 12	n.s. p = 0.900	ten. p = 0.093	n.s. p = 0.783	n.s. p = 0.428



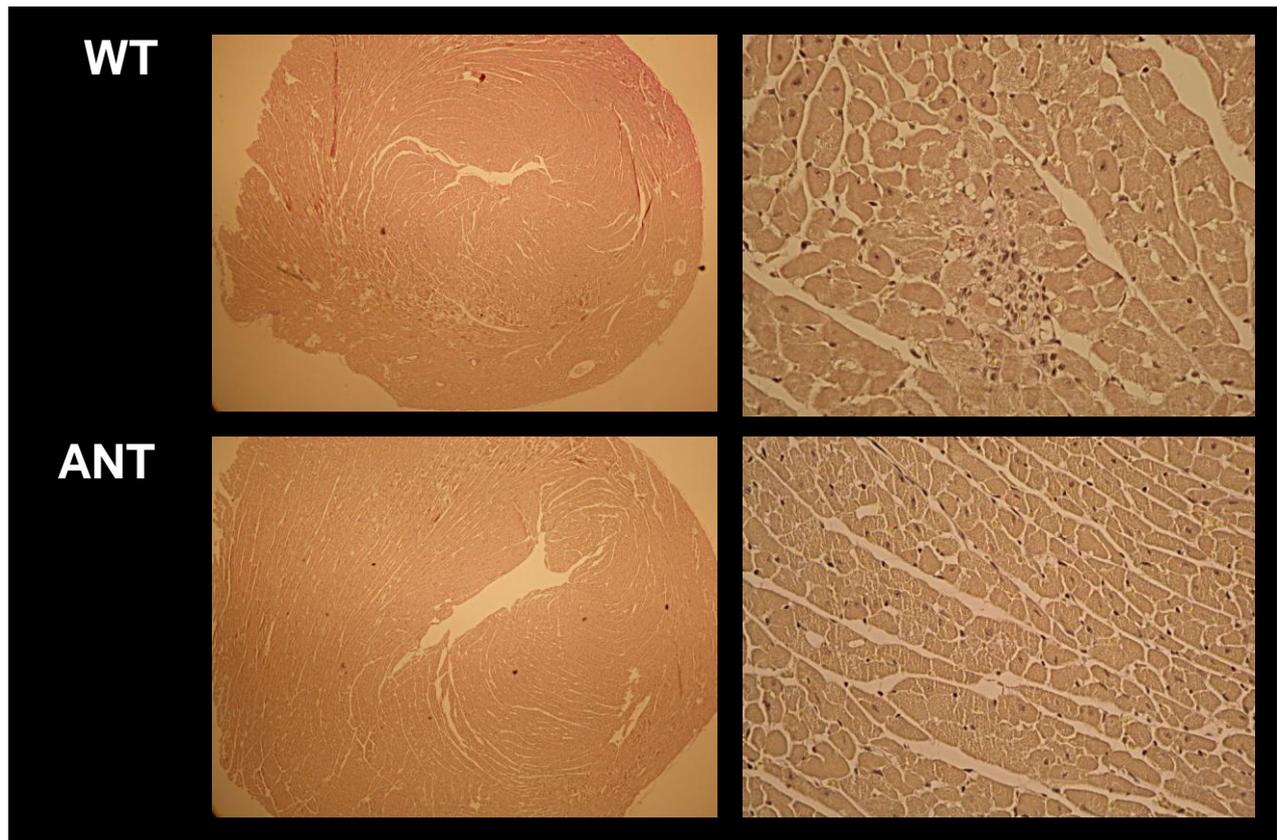


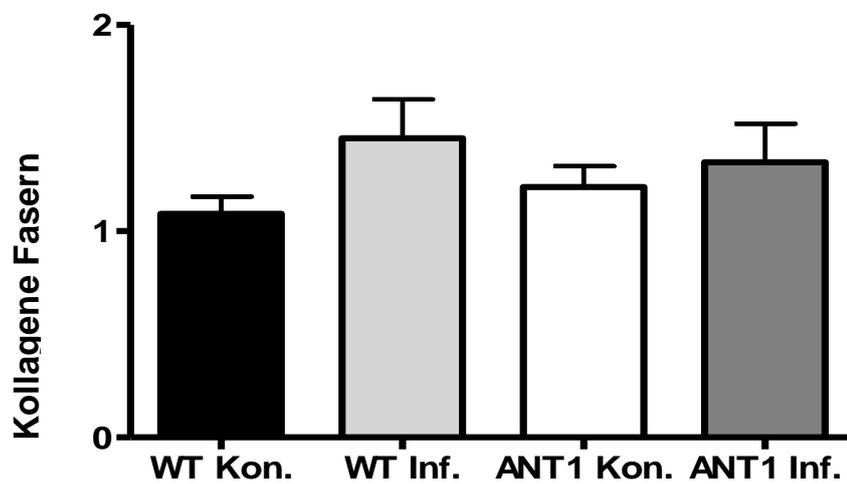
Abbildung 13: 5×10^5 pfu CVB3/Tier infizierte Mäuse Gruppe 2.1: WT- und ANT1-überexprimierende Tiere, Elastika-van-Gieson-Färbung 14. d p. i., links: 4x Vergrößerung, rechts: 40x Vergrößerung

3.2.3 Myokardialer Kollagengehalt in mit 5×10^5 pfu CVB3/Tier infizierter Mäusegruppe am 14. Tag der Infektion und in der nicht infizierten Kontrollgruppe (Gruppen 2.1 und 2.2)

Die Bestimmung des myokardialen Gesamtkollagens erfolgte mittels Sirius-Red-Färbung. Die Färbung ist optimal für die Darstellung der kollagenen und retikulären Fasern im extrazellulären Raum vom Gewebe geeignet. In Bezug auf die Fibroseentwicklung wurde am 14. Tag p. i. sowohl bei den Wildtyp-Tieren als auch bei den ANT1-überexprimierenden Tieren nur eine geringfügige Zunahme im Vergleich zu den nicht infizierten Kontrolltieren beobachtet. Bei den Wildtyp-Tieren erhöhte sich die Fibroserate im Vergleich zu den nicht infizierten Tieren von 1.083 ± 0.083 auf 1.45 ± 0.189 und zeigte in der statistischen Auswertung keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen $p=0.263$ (Tabelle und Diagramm 21). Ähnliches stellte sich bei den ANT1-überexprimierenden Tieren im Vergleich mit den Kontrolltieren dar. Hier stieg der Mittelwert von 1.214 ± 0.101 auf 1.333 ± 0.188 minimal an und die Signifikanzprüfung ergab einen p-Wert von 0.828. Ebenfalls konnten im Vergleich in Hinsicht auf das Ausmaß der Fibrose in den beiden infizierten Wildtyp- und ANT1-überexprimierenden Gruppen keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden $p=0.669$.

Tabelle und Diagramm 21: 5×10^5 pfu CVB3/Tier infizierte Mäuse Gruppe 2.1 und nicht infizierte Kontrollgruppe 2.2, Sirius-Red-Färbung 14. d p. i.

	Mean \pm SEM				Signifikanz			
	WT Kon.	ANT1 Kon.	WT Inf.	ANT1 Inf.	ANT1 Kon. vs WT Kon.	WT Inf. vs WT Kon.	ANT1 Inf. vs ANT1 Kon.	ANT1 Inf. vs WT Inf.
Kollagene Fasern	1.083 \pm 0.083 N = 6	1.214 \pm 0.101 N = 7	1.450 \pm 0.189 N = 10	1.333 \pm 0.188 N = 12	n.s. p = 0.349	n.s. p = 0.263	n.s. p = 0.828	n.s. p = 0.669



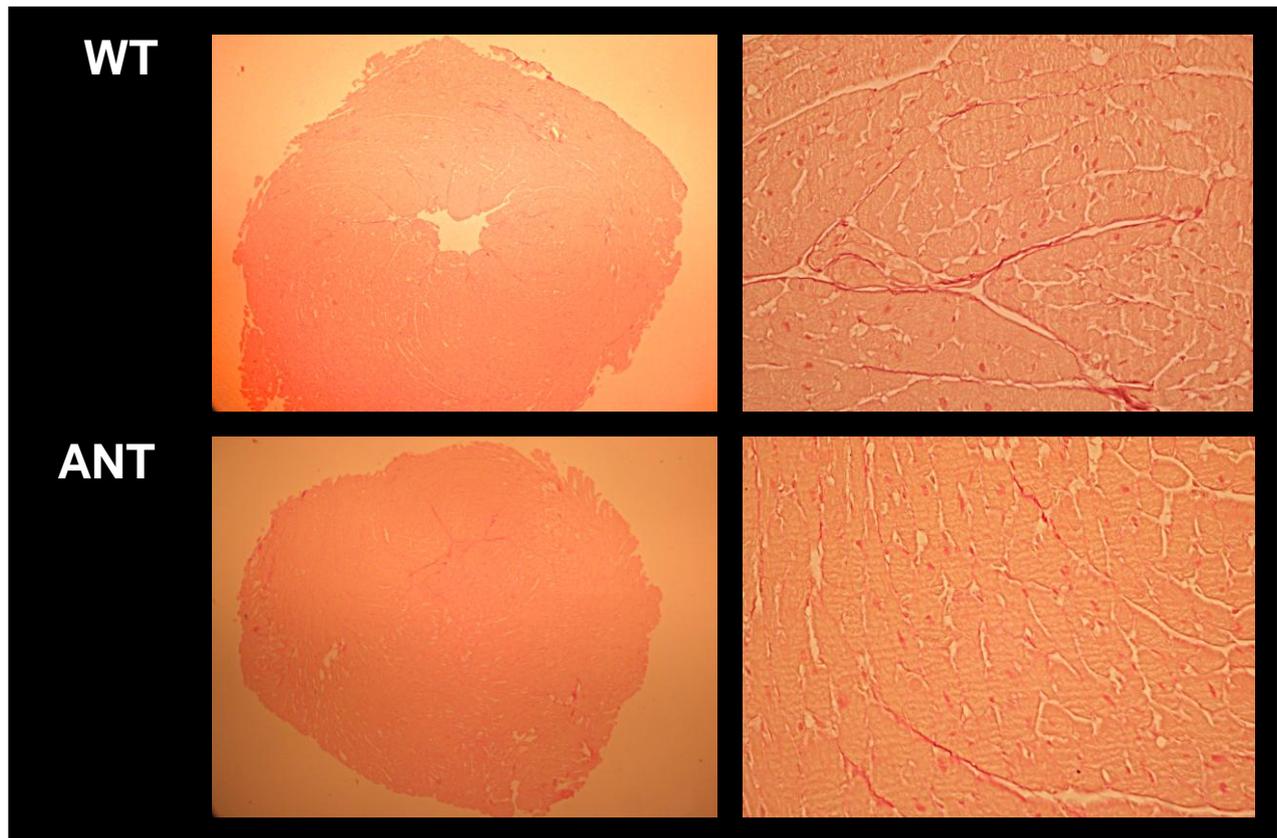


Abbildung 14: 5×10^5 pfu CVB3/Tier infizierte Mäuse Gruppe 2.1: WT- und ANT1-überexprimierende Tiere, Sirius-Red-Färbung 14. d p. i., links: 4x Vergrößerung, rechts: 40x Vergrößerung

4. Diskussion

Basierend auf den Untersuchungen an ANT1-überexprimierenden hypertensiven Ratten und diabetischen Mäusen, die eine kardioprotektive Wirkung der ANT1-Überexpression zeigten, wollten wir die Wirkung einer erhöhten ANT1-Expression bei der Coxsackievirus B3-induzierten Myokarditis analysieren. Dabei richtete sich unser Augenmerk auf die strukturellen Veränderungen des Herzmuskelgewebes, ein wichtiger Faktor, der über die Herzschiidigung, die Fiihigkeit des Wirtes, das Virus zu bekiiempfen, und die Funktionalitiiat des Herzens, Auskunft gibt. Erstaunlicherweise zeigten unsere Ergebnisse nicht nur keine kardioprotektive Wirkung der ANT1-Überexpression gegeniiuber der unveriianderten ANT1-Expression, sondern wir beobachteten ein gegensiiatzliches Phiianomen: im Verlauf der Entziiindung zeigten die ANT1-iiuberexprimierenden Miiuse stiirkere Schiiidigung des Herzmuskelgewebes als die Miiuse mit unveriianderter ANT1-Expression.

4.1 Grundstruktur des murinen Herzens der Wildtyp- und der ANT1-iiuberexprimierenden Tiere und deren Veriianderungen im Verlauf der Coxsackievirus B3-induzierten Myokarditis

Das Herz ii ahnelt in seiner Form einem Kegel, dessen Spitze in der Brusthiihle nach unten und etwas nach links vorne weist. Die Wand des Herzens besteht aus drei ungleich dicken und unterschiedlich gebauten Schichten. Die innerste Schicht wird als Endokard, die folgende Muskelschicht als Myokard und die iiuuerste als Epikard bezeichnet.

Das Endokard besteht aus einer Endothelschicht, die einer diiinnen Lage von Bindegewebe aufsitzt. Diese Bindegewebebsschicht setzt sich neben zahlreichen elastischen Fasern auch aus Biiundeln glatter Muskelfasern zusammen. In manchen Abschnitten des Herzens befindet sich darunter eine unterschiedlich dicke, locker gebaute Schicht von subendokardialem Bindegewebe, welches im Verbund mit dem interstitiellen Bindegewebe des Myokards Blutgefiiiiue, Nerven und Ausliiufer des Erregungsleitungssystems enthiihlt.

Die Myokardschicht, die in den verschiedenen Abschnitten des Herzens unterschiedlich dick ist, besteht aus einer speziellen Form quergestreifter Muskelzellen. Diese unterscheiden sich in charakteristischer Weise sowohl von der glatten Muskulatur als auch von den quergestreiften Muskelfasern der Skelettmuskulatur. Die

Herzmuskulatur hat eine im Prinzip eine gleichartige Querstreifung wie die Skelettmuskulatur, besteht jedoch nicht aus langen, vielkernigen Fasern, sondern aus einzelnen Zellen, die dergestalt miteinander verbunden sind, dass ein spitzwinkeliges Flechtwerk entsteht, in dessen Spalten gefäßführendes Bindegewebe verläuft. Die queren Zellgrenzen zwischen aneinander stoßenden Herzmuskelzellen, *Disci intercalares*, werden als „Glanzstreifen“ bezeichnet. Die Glanzstreifen sind nicht nur eine mechanische Verbindung unter den Kardiomyozyten (*Maculae und Fasciae junctions*), sondern sie enthalten auch zahlreiche Nexus (*gap junctions*), die die elektrische Kopplung zwischen den Herzmuskelzellen und dadurch die Erregungsausbreitung im Myokard ermöglichen. Die Sarkolemm genannte Plasmamembran der Herzmuskelfaser ist außen von einer Basallamina und einem dünnen Strumpf aus feinsten Retikulinfäserchen umgeben. Sie nennen sich Endomysium und stellen die Verbindung zum interstitiellen Bindegewebe her, das die Blutgefäße enthält. Das Myokard ist sehr stark vaskularisiert, und auf Querschnitten durch die Muskulatur entfällt in der Regel auf eine Muskelfaser je eine Kapillare. Das mikroskopisch feine Flechtwerk der Herzmuskulatur wird durch gefäßführendes Bindegewebe in Bündel gegliedert, die ihrerseits wieder ein größeres Netzwerk II. Ordnung bilden. Diese größeren Bündel sind meist abgeflacht und von zarten Bindegewebshäutchen umhüllt, in denen auch elastische Fasern vorkommen. Die Herzmuskulatur zeigt in ihrer Anordnung einen Dreischichtenbau: äußere -Längs-, mittlere -Ring- und innere-Längsschicht. Dieser Aufbau ist für die Pumpfunktion des Herzens verantwortlich.

Das Epikard als äußerste Herzschiicht wird von einem Mesothel gebildet, das einer dünnen Fibroelastika aufsitzt. Unter dieser Schicht liegt das subepikardiale Fettgewebe, das nach innen mit dem interstitiellen Bindegewebe des Myokards in Verbindung steht. Das subepikardiale Bindegewebe ist an verschiedenen Stellen unterschiedlich dick und füllt die Unebenheiten. Das Epikard bildet das innere, viszerale Blatt des Herzbeutels (Pericard), das das Herz umhüllt, seiner Überdehnung entgegenwirkt und ein Gleitlager für die Kontraktionen bildet. Der äußere Blatt der Pericards wird durch eine Serosa gebildet, die nach außen durch eine kollagenfaserreiche Fibrosa zu einer kräftigen Haut verstärkt wird (83).

In unserer Studie bedienten wir uns der Hämatoxilin-Eosin-Färbung, um die einzelnen histologischen Herzstrukturen hervorzuheben, und zwischen den ANT1-überexprimierenden Mäusen und den Wildtyp-Mäusen zu vergleichen. Dabei konnten

wir unter basalen Bedingungen keine Unterschiede in der Grundstruktur des murinen Herzens beider Gruppen feststellen. Die ANT1-überexprimierenden Mäuse haben, in Hinsicht auf den histologischen Aufbau des Herzens, aus der ANT1-Überexpression weder profitiert noch Schaden genommen.

In der Literatur wurden schwerwiegende Schäden für das Herzgewebe beschrieben, die ein Mangel an ANT1 mit sich bringt. Für Krankheitsbilder wie das Sengers-Syndrom (72) oder die autosomal-dominante, progressive, externe Ophthalmoplegie (adPEO) (73, 74), die mit einer erniedrigten ANT1-Expression und Mutationen im ANT1-Gen verbunden sind, wird eine Assoziation mit der hypertrophen Kardiomyopathie beschrieben. Im Rahmen der Untersuchungen an ANT1-knockout-Mäusen wurden ebenfalls biochemische und physiologische Charakteristika einer hypertrophen Kardiomyopathie mit mitochondrialer Proliferation und gestörter oxidativer Phosphorylierung gezeigt (76). Unter der hypertrophen Kardiomyopathie versteht man eine linksventrikuläre Hypertrophie, die im Herzseptum ihre maximale Ausprägung annimmt. Das Septum wölbt sich in das Ventrikelkavum vor, wodurch es zur Obstruktion kommen kann. Im histologischen Bild der hypertrophen Kardiomyopathie zeigt sich neben der Hypertrophie der Kardiomyozyten, also deren Größenzunahme, auch eine erhöhte Syntheseleistung von kollagenen Fasern. Charakteristisch, aber nicht spezifisch, ist der Nachweis eines myozytären Disarrays, einer Texturstörung, welche durch myozytäre Verzweigungsstörungen hypertrophierter Kardiomyozyten gekennzeichnet ist. Die normale parallele Anordnung ist dabei aufgehoben und wird durch vermehrte seitliche Verzweigungen und Seit-zu-Seit-Verbindungen ersetzt. Zusätzlich ist das Interstitium bindegewebig umgebaut, wobei das Ausmaß der Fibrose stärker ist als bei einer Hypertrophie auf dem Boden eines Hypertonus (84).

Die negativen Auswirkungen des ANT1-Mangels, unter anderem auf das Herz und dessen Struktur, führten zu der Überlegung, ob eine erhöhte ANT1-Expression nicht einen kardioprotektiven Effekt mit sich bringen würde. Flierl et al. zeigten eine positive Wirkung des Transfers von ANT1 mittels viraler Vektoren in ANT1-defiziente Skelettmuskelzellen. Dabei kam es durch die Erhöhung des mitochondrialen Exportes von ATP zur Rückbildung der histopathologischen Veränderungen, die mit der mitochondrialen Myopathie verbunden waren (80). Einen kardioprotektiven Effekt der ANT1-Überexpression beobachtete man bei dem „Preconditioning“, einem Anpassungsprogramm des Organismus, das nach einer Belastung wie eine kurze Hypothermie- oder Ischämiephase induziert wird (79). Im Rahmen des Prozesses wird

ein Teil von Genen überexprimiert, unter anderen auch das ANT1. Hierbei gehört ANT1 zu einem Abwehrmechanismus des Organismus, der der Adaptation sowie der Vermeidung beziehungsweise Reduzierung von Gewebsschäden während erneuter ischämischer oder hypothermischer Phasen dient.

Unsere Ergebnisse stimmen mit der Studie von Wang et al., die ANT1 in Mäuseherzen überexprimierten, überein (82). Auch hier konnte man unter physiologischen Bedingungen keine Unterschiede in der Morphologie und Histologie des Myokards zwischen den ANT1-überexprimierenden und den Wildtyp-Mäusen beobachten.

Im Gegensatz zu den oben genannten Untersuchungsergebnissen an den ANT1-überexprimierenden Mäusen zeigten Walther et al. und Vogelpohl et al., dass unter basalen Bedingungen die ANT1-überexprimierenden Ratten neben der Größenzunahme der Kardiomyozyten und des linken Ventrikels, eine mit ihr verbundene signifikante Zunahme des linksventrikulären enddiastolischen und endsystolischen Volumens besitzen (81, 85).

Zusammenfassend kann man sagen, dass sich bei den Mäusen die ANT1-Überexpression unter basalen Bedingungen in der Herzstruktur nicht bemerkbar macht. Es lassen sich weder Vor- noch Nachteile für die ANT1-überexprimierenden Tiere im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren mit unveränderter ANT1-Expression definieren.

Weiterhin untersuchten wir die Veränderungen der Herzstruktur in beiden Gruppen von Mäusen aus dem C57BL/6-Stamm während der Coxsackievirus B3-induzierten Myokarditis-am 4., 8., 14. Tag nach der Infizierung und zu einem Zeitpunkt nach Beendigung der Entzündung-am 28. Tag nach der Infizierung. Vom 4. bis 14. Tag nach der Infizierung findet die eigentliche Virusbekämpfung statt. Diese zeichnet sich durch Infiltrate aus Entzündungszellen und Induktion von Zytokinen aus. Die Rolle der Zytokine im Verlauf der Myokarditis ist charakterisiert durch Regulation der Immunantwort. Die Entzündungszellinfiltrate setzen sich größtenteils aus Makrophagen, T-Lymphozyten, Fibroblasten und wenigen B-Lymphozyten und Plasmazellen zusammen. Wir bedienten uns ebenfalls der Hämatoxin-Eosin-Färbung, um die Ausprägung der Entzündungszellinfiltrate zu markieren. Dabei ließ sich feststellen, dass die ANT1-überexprimierenden Mäuse tendenziell stärker auf das Coxsackievirus B3 reagieren und dementsprechend mehr inflammatorische Läsionen im Myokardium bilden als die Wildtyp-Tiere. Die tendenziell stärkere Ausbildung von Entzündungszellinfiltraten ließ sich zwischen den ANT1-überexprimierenden und

Wildtyp-Tieren am 8. Tag nach der Infizierung feststellen, also zur Zeit der intensivsten Immunantwort. Am Ende der akuten Phase der Myokarditis, am 14. Tag p. i., zeigte sich in beiden Gruppen ein Abfall der Entzündungsläsionen ohne signifikanten Unterschied in deren Ausmaß. Das Model der Coxsackievirus B3-induzierten Myokarditis in dem C57BL/6-Mäusestamm ist ein Model der akuten Myokarditis, die nach dem 14. Tag p. i. ausheilt und nicht in die chronische Entzündung übergeht. Die Herzmuskelanalyse vom 28. p. i. Tag diente der Identifikation der vollständigen Ausheilung und dem Ausschluss von eventuellen Spätfolgen der Entzündung in beiden Gruppen von Tieren. Dabei sahen wir eine völlige Rückbildung der Entzündungszellinfiltrate sowohl bei den ANT1-überexprimierenden als auch bei den Wildtyp-Mäusen.

Unsere Studie an den ANT1-überexprimierenden, mit Coxsackievirus B3-infizierten Mäusen ließ uns nicht nur die tendenziell stärkere Ansammlung von Entzündungszellen im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren feststellen. Weitere Analysen unserer Arbeitsgruppe zeigten eine signifikant höhere Virusbelastung bei ANT1-überexprimierenden Tieren als bei den Wildtyp-Tieren. Außerdem konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Viruslast und der Ausprägung der Entzündung festgestellt werden. Je höher der Virustiter war, desto stärker zeigten sich die Immunantwort und die Entzündungszellinfiltrate. Daraus könnte der Schluss gezogen werden, dass das Virus von der erhöhten ANT1-Expression profitiert.

Schon frühere Studien zeigten, dass während der Coxsackievirus B3-induzierten Myokarditis das Virus die ANT-Expression und Funktion beeinflusst. Dörner et al. zeigten, dass es während der Coxsackievirus B3-induzierten Myokarditis zu einem ANT-Isoformenshift kommt, im Rahmen dessen die ANT1-Expression zunimmt, die ANT2-Expression abnimmt und die ANT3-Expression unverändert bleibt (68). Das ANT-Isoformenshift ist mit der deutlich reduzierten kardialen ANT-Transportkapazität verbunden (67, 68, 69), was sich durch ein vermindertes zytozolisches und ein erhöhtes mitochondriales ATP/ADP-Verhältnis äußert. Das ANT-Isoformenshift ließ sich nicht nur bei Virusmyokarditis sondern auch in Herzen mit dilatativer Kardiomyopathie feststellen (68). Eine virale Myokarditis, die einen schweren chronischen Verlauf annimmt, kann zur Entwicklung einer dilatativen Kardiomyopathie führen (90).

Interne Untersuchungen aus unserer Arbeitsgruppe verglichen die ANT-Expression bei unterschiedlichen Mäusestämmen im Verlauf der Coxsackievirus B3-induzierter Myokarditis. Hier wurde die ANT1 Expression in zwei Mäusestämmen untersucht: in resistentem C57BL/6-Mäusestamm, der die Coxsackievirus B3-Infektion

gut übersteht und nach akuter Phase ausheilt sowie im permissiven A.-SW/SnJ Mäusestamm, der bezüglich des Coxsackievirus B3-Virus sehr sensitiv ist und eine chronische Entzündung entwickelt. Die Analysen der ANT-Expression der Coxsackievirus B3-induzierten Myokarditis bei den beiden Mausstämmen während der akuten Phase ergaben eine Abnahme der ANT1- und ANT2-Expression bei den C57BL6-Mäusen und eine unveränderte ANT-Expression bei den A.SW-Tieren dar. Ergänzende interne Studien an einem weiteren Coxsackievirus B3-sensitiven Mäusestamm zeigten im Verlauf der Myokarditis eine erhöhte ANT1-Expression. Das heißt, dass eine hohe ANT-1-Expression mit der Virussensibilität der Tiere verbunden ist und zu einer vermehrten Inflammation und Myokardschädigung beitragen kann. Die dahinterstehenden Mechanismen werden zur Zeit untersucht.

Unsere Ergebnisse zeigten, dass trotz der tendenziell stärkeren Entzündungsreaktion der ANT1-überexprimierenden Mäuse im Verlauf der Myokarditis die Infektion den selben Endpunkt wie bei den Wildtyp-Tieren erreicht und mit der völligen Ausheilung endet. Jedoch zeigte die ANT1-Überexpression ganz im Gegensatz zu Herzerkrankungen anderer Ätiologien in der Coxsackievirus B3-induzierten Myokarditis keine kardioprotektive Wirkung.

Die Untersuchungen an den ANT1-überexprimierenden und Wildtyp-Rattenherzen, die dem Hypertonus ausgesetzt wurden, zeigten eine deutlich kardioprotektive Wirkung der ANT1-Überexpression. Die ANT1-überexprimierenden Ratten wiesen eine erhöhte mitochondriale ANT-Aktivität sowie eine Aktivitätserhöhung der Atmungskettenkomplexe II-IV mit einer effektiveren elektrischen Kopplung und einer erhöhten Stabilität der mitochondrialen Membran unter dem Hypertonus auf. Im Gegensatz zu den Wildtyp-Tieren zeigten die ANT1-überexprimierenden Ratten unter der Hypertonie keine kardiale Hypertrophie und keine Störung des Energiehaushaltes. Zusätzlich wiesen die Ratten mit unveränderter ANT1-Expression eine massive Fibroseentwicklung auf, die bei den ANT1-überexprimierenden Ratten kaum nachzuweisen war (81).

Auch bei den ANT1-überexprimierenden an Diabetes mellitus Typ I erkrankten Mäusen ließ sich die kardioprotektive Wirkung der ANT1-Überexpression feststellen. Die ANT1-überexprimierenden Diabetes-Mäuse entwickelten im Verlauf der Erkrankung-im Gegensatz zu genetisch unveränderten, ebenfalls an Diabetes mellitus erkrankten Mäusen-keine diabetische Kardiomyopathie. Unter der diabetischen Kardiomyopathie versteht man eine Form der dilatativen Kardiomyopathie, die

histologisch durch interstitielle Fibrose und Hyalinisierung der Arteriolen charakterisiert ist (86, 87, 88, 89). Die ANT1-Überexpression schützte im Verlauf des Diabetes mellitus die genetisch veränderten Mäuse vor ventrikulärer Gewichtsabnahme, Störung der systolischen und diastolischen Herzfunktion und letztendlich vor Entwicklung der Herzinsuffizienz, welche bei den Wildtyp-Tieren beobachtet wurde (82).

Zusammenfassend zeigten unsere Daten keine kardioprotektive Auswirkung der ANT1-Überexpression während der virusinduzierten Herzmuskelentzündung. Vielmehr fiel die tendenziell stärkere Entzündungsreaktion bei den ANT1-überexprimierenden Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen im Verlauf der Myokarditis auf. Die bei den ANT1-überexprimierenden Mäusen aufgefallene signifikant höhere Viruslast und die mit ihr korrelierende stärkere entzündliche Reaktion wies auf eine virusreplikationbegünstigende Wirkung der ANT1-Überexpression hin, die eine höhere Entzündungsreaktion mit sich führte. In der Zusammenschau der Ergebnisse kann der Schluss gezogen werden, dass die ANT1-Überexpression während der Coxsackievirus B3-induzierten Myokarditis nicht dem Wirt sondern dem Virus zugute kommt. Weitere Untersuchungen sind nötig, um die dahinterstehenden biochemischen Mechanismen zu klären. Die stärkere entzündliche Reaktion und erhöhte Viruslast wirkte sich jedoch nicht auf den Ausgang der Myokarditis aus, so dass sowohl die Wildtyp-Mäuse als auch die transgenen Mäuse nach der akuten Phase der Myokarditis ohne bedeutende Schädigungen des Herzmuskels ausheilten.

4.2 Kardiale extrazelluläre Matrix und ihre Veränderungen bei den Wildtyp- und ANT1-überexprimierenden Mäusen im Verlauf der Coxsackievirus B3-induzierten Myokarditis

Neben Kardiomyozyten, Fibroblasten und Gefäßen gehört die extrazelluläre Matrix (ECM) fest zur Herzstruktur. Die extrazelluläre Matrix übernimmt im Gewebe viele wichtige Funktionen. Sie ist vor allem für die mechanische Verankerung der Zellen verantwortlich und hat darüber hinaus Einfluss auf zahlreiche Zellfunktionen wie Ernährung, Abwehr und Reparatur. Als extrazelluläre Matrix wird die Gesamtheit aller Moleküle bezeichnet, die sich in dem Interzellularraum befinden (91). Dazu gehören verschiedene Fasern, die in einer Grundsubstanz aus Glukosaminglykanen, Proteoglykanen, Adhäsionsproteinen und extrazellulärer Flüssigkeit eingebettet sind. Die Fasern setzen sich aus kollagenen, retikulären und elastischen Fasern zusammen,

wobei die Kollagene dominieren. Diese Proteingruppe charakterisiert sich durch ihre trimere Struktur, die aus drei eng umeinander gewundenen Polypeptidketten, den α -Ketten, gebildet wird. Die enge Struktur ist verantwortlich für die Zugfestigkeit des Kollagens. In der Kollagen-Familie sind bisher mehr als 20 biochemisch und strukturell unterschiedlichen Typen bekannt, die je nach ihrer Hauptbestimmung in viele Gruppen unterteilt werden können z.B. fibrilläre (Typ I, II, III, V und XI), fibrillenassoziierte (IX, XII, XIV) oder netzbildende Kollagene (IV, VIII, X) (92). In der kardialen extrazellulären Matrix repräsentieren Kollagen Typ I 85% und Typ III 11 % des totalen Kollagenproteins im Myokardium (93, 94). Der Rest wird durch perizelluläres Typ V Kollagen und Kollagen der basalen Membranen vom Typ IV abgedeckt (95,96). Die fibrillären Kollagene darunter Typ I, III, V bilden durch Kollagen-Fibrillen-geordnete Polymere, die im ausgereiften Gewebe viele Mikrometer lang werden können. Sie sind oft zu größeren, kabelartigen Bündeln, den Kollagenfasern, zusammengefasst. Diese Fasern sind besonders zugfest und verleihen dem Gewebe hohe mechanische Widerstandskraft. Das Kollagen Typ IV ordnet sich zu einem regulären Maschenwerk an, das die Grundstruktur der Lamina densa der Basallamina bildet. Die Rolle der Kollagene umfasst die Verbindung der Kardiomyozyten untereinander sowie die daraus resultierende Bildung eines dreidimensionalen Netzes. Das kollagene Netz ermöglicht durch seine Elastizität einerseits und seine besondere Festigkeit andererseits, die Architektur des Herzens und seine Ventrikelgeometrie zu erhalten und beeinflusst deren Kontraktilität und Relaxation. Die kollagene Struktur des Herzens setzt sich aus drei Einheiten zusammen: Epi-, Peri- und Endomysium (97). Das Epimysium verläuft entlang der epikardialen und endokardialen Oberfläche des Myokardiums, wo es dem Perimysium seinen Anfang gibt. Das Perimysium verläuft innerhalb des Myokards zwischen den Muskelfasern und fasst diese zu funktionellen Bündeln zusammen. Das Endomysium umhüllt einzelne Kardiomyozyten und dient außerdem der Verbindung der Kardiomyozyten untereinander sowie mit benachbarten Kapillaren.

In unserer Studie untersuchten wir die extrazelluläre Matrix unter basalen Bedingungen und ihre Veränderungen im Verlauf der Coxsackievirus B3-induzierten Myokarditis bei Mäusen mit unveränderter ANT1-Expression versus-ANT1-Überexpression. Dabei bedienten wir uns zwei histologischen Färbungen: der Elastika-van-Gieson- und der Sirius-Red-Färbung, die eine Differenzierung zwischen Kernen, Bindegewebe, Muskulatur, kollagenen und elastischen Fasern ermöglichen. Unser Augenmerk richtete sich dabei vor allem auf den Kollagengehalt des Herzens.

Im ersten Teil unserer Arbeit verglichen wir die kardiale extrazelluläre Matrix von Wildtyp- versus ANT1-überexprimierenden Mäuse unter basalen Bedingungen. Dabei ließ sich kein Unterschied zwischen beiden Gruppen feststellen. Unsere Ergebnisse stimmen mit den Untersuchungen von Walther et al. an Wildtyp- und ANT1-überexprimierenden Ratten unter basalen Bedingungen überein. Diese analysierten die extrazelluläre Matrix und das Vorhandensein von Fibrose im Myokardium anhand der Elastika-van-Gieson-Färbung. Walther et al. stellten keine Unterschiede in der Struktur und Zusammensetzung der extrazellulären Matrix und die Abwesenheit von Fibroseherden sowohl bei den ANT1-überexprimierenden als auch bei den Wildtyp-Ratten fest (81). Das Kollagengleichgewicht des Herzens resultiert aus einem Zusammenspiel zwischen der Kollagendegradation und Kollagenneusynthese. Dieses Zusammenspiel kann jedoch unter pathologischen Bedingungen wie z.B. nach einem Herzinfarkt schnell aus dem Gleichgewicht gebracht werden, wobei der Faseraustausch auf bis zu 50% steigen kann (98, 99).

Mit Veränderungen der extrazellulären Matrix unter pathologischen Bedingungen während der Coxsackievirus B3-induzierten Myokarditis befassten sich unsere weiteren Untersuchungen an den Wildtyp- und ANT1-überexprimierenden Mäusen. Anhand der o.g. histologischen Färbungen hoben wir im Verlauf der Myokarditis am 4., 8. und 14. Tag nach der Infizierung die Veränderungen im Kollagenhaushalt des Myokardiums hervor und stellten dabei fest, dass in beiden Gruppen im Laufe der Entzündung die Kollagenmenge zuerst zunahm, um dann zum Ende der Infektion auf das Ausgangsniveau abzufallen. Die Myokarditis heilte sowohl bei den Wildtyp-Mäusen wie auch bei den Mäusen mit erhöhter ANT1-Expression ohne bleibende Schäden der extrazellulärer Matrix aus.

Die von uns am Anfang der Myokarditis beobachtete Zunahme des Kollagengehaltes, liegt nicht an der erhöhten Kollagenneusynthese, sondern entsteht aus der Kollagenzerlegung. In der mikroskopischen Auswertung sahen wir nicht die für eine gesteigerte Kollagensynthese typischen fibrotischen Herde sondern lockere Ansammlungen von einzelnen Fasern. Eine akute Myokarditis zeichnet sich durch Kollagenzerstörung aus (99). Während in den ersten drei Entzündungstagen die viralbedingte Myokardschädigung stattfindet, kommt es ab dem 4. Tag nach der Infizierung zur Bildung von Entzündungszellinfiltrationen und zur damit verbundenen Freisetzung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren: IL1- β , TNF- α , TGF- β , *Platelet – derived Growth Factors* (PDGF) (100, 101). Diese regulieren den Umbau (*Remodeling*)

der extrazellulären Matrix durch die Expressionsbeeinflussung von *Matrix Metalloproteinases (MMPs)*, *Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMPs)* und *Urokinase-Typ Plasminogen Activator (uPA)* (102,103). Die Matrix Metallproteinase bilden eine Gruppe aus insgesamt 20 Kollagen zerlegenden proteolytischen Enzymen. Die *Tissue Inhibitors of Metalloproteinases* hemmen die MMPs-Wirkung (104). Die Matrix Metallproteinase werden unter basalen Bedingungen von den Fibroblasten und Myozyten exprimiert, können aber auch im Rahmen einer Entzündungsreaktion von infiltrierenden Lymphozyten und Makrophagen produziert werden (105,106,107). Weitere Studien zeigten eine erhöhte MMP-9 und MMP-3 Transkription sowie eine erniedrigte Transkription von TIMP-1 und TIMP-4 während der Coxsackievirus B3-induzierten Myokarditis (108,109). Dieses gestörte Gleichgewicht zwischen den Matrix Metallproteinase und den *Tissue Inhibitors of Metalloproteinases* kann sich auf die extrazelluläre Matrix auswirken und zur Reduktion ihrer Integrität und Schädigung des dreidimensionalen kollagenen Netzsystems durch das Schneiden der Cross-Links-Verbindungen unter den Kollagen-Molekülen führen. Durch die Zerstörung des kollagenen Netzes kann es im weiteren Verlauf zur ventrikulären Dysfunktion und Dilatation kommen (110). Zusätzliche Untersuchungen zeigten während der akuten Myokarditis eine unveränderte Menge von Gesamtkollagen bei Abnahme der unlöslichen Kollagenfraktion und Zunahme des löslichen Kollagens, was ebenfalls für den Prozess der Kollagenzerlegung spricht (110). Der zum Ende der Myokarditis gesehene Abfall des Kollagengehaltes ist am ehesten im Rahmen der Phagozytose entstanden.

Weiterhin untersuchten Walther et al. die Veränderungen der extrazellulären Matrix zwischen Wildtyp-Ratten und ANT1-überexprimierenden Ratten unter Hypertonie-Bedingungen (81). Dabei zeigten die Wildtyp-Ratten eine signifikante Zunahme des Kollagengehaltes, während bei den ANT1-überexprimierenden Tieren keine Änderung der extrazellulären Matrix feststellbar war. Die exzessive, ungeordnete Produktion und Akkumulation von Kollagenen und anderen Komponenten der extrazellulären Matrix: Fibronektin (111,112) oder Tenascin (113) im Gewebe, die mit dem Ersatz von organspezifischen Zellen verbunden ist und zum Funktionsverlust des jeweiligen Organs führen kann, wird als Fibrose bezeichnet (114). Die Fibroseentwicklung bei den der Hypertonie ausgesetzten Wildtyp-Ratten wirkte sich direkt auf die Funktion des Herzens und damit auf die Lebenserwartung der Wildtyp-Tiere aus. Die Ratten mit unveränderter ANT1-Expression zeigten ein signifikant

erniedrigtes Output- und Stroke-Volumen sowie eine signifikant erniedrigte Lebenserwartung im Vergleich zu den ANT1-überexprimierenden Ratten (81). Somit wurde die kardioprotektive Wirkung der ANT1-Überexpression unter Hypertonie-Bedingungen bewiesen.

Unsere Untersuchungen konzentrierten sich auf die akute Myokarditis, die ausheilt und nicht in die chronische Phase übergeht. Diese Infektion ist unter anderem durch die oben beschriebene, im Vordergrund stehende Kollagendegradation charakterisiert (112). Um die Auswirkung der ANT1-Überexpression auf die Fibroseentwicklung zu untersuchen, müsste man das Augenmerk der Studie auf die chronische Myokarditis lenken. Diese ist durch eine exzessive Kollagensynthese und Fibrosebildung gekennzeichnet (115,45,116,78). Dabei beobachtet man neben der Kollagenakkumulation eine Veränderung in der Ratio von Kollagen I und III, was mit Zunahme der myokardialen Steifigkeit und gestörter systolischer und diastolischer Funktion verbunden ist (117).

Zusammenfassend führte die ANT1-Überexpression während der Coxsackievirus B3-induzierten Myokarditis hinsichtlich der Veränderungen der extrazellulären Matrix im Mäuseherzen zu keinem signifikanten Unterschied im Vergleich zu den Mäusen mit unveränderten ANT1-Expression.

4.3 Apoptoseausmaß bei den Wildtyp- und ANT1-überexprimierenden Mäusen unter Basalen- und Belastungsbedingungen

Die Apoptose ist ein Prozess, bei dem die Zelle unter Energieverbrauch koordiniert zerstört wird. Dieser programmierte Zelltod dient nicht nur der Entwicklung des Gewebes, der Erhaltung der Gewebhomeostase und der Entfernung von geschädigten und mutierten Zellen, sondern ist auch an der Pathogenese vieler Erkrankungen wie beispielsweise viralen Infektionen, autoimmunen Prozessen und Tumoren beteiligt (118). Unter basalen Bedingungen findet die Apoptose bei gering differenzierten Geweben, wie z. B. Schleimhäuten, andauernd statt und dient dessen Erneuerung. In hochdifferenzierten Geweben wie dem Myokard kommt es unter physiologischen Bedingungen sehr selten zur Apoptose. Kardiomyozyten sind terminal differenzierte Zellen, die nicht durch einfache Teilung nachgebildet werden können.

Nach dem Verlust von Kardiomyozyten werden diese durch die Hypertrophierung der umgebenden Zellen oder durch Narbengewebe ersetzt.

Es gibt zwei Arten von Apoptose: rezeptor- (*extrinsic death pathway*) und mitochondrien-vermittelte (*intrinsic death pathway*) Apoptose. Die rezeptorabhängige Apoptose wird durch die Bindung eines „Todesliganden“ wie: CD95L, TRAIL (*tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand*) TNF (*tumor necrosis factor*) an den „Todesrezeptoren“ wie CD95, TRAIL-R (*tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand-receptor*) und TNF-R (*tumor necrosis factor –receptor*) induziert.

Die mitochondrien-abhängige Apoptose wird durch Bestrahlung, zytotoxische Substanzen, zellulären Stress und Entzug von Wachstumsfaktoren induziert und durch Mitglieder der Bcl-2-Protein-Familie reguliert. Diese können in proapoptotische (Bax, Bad, Bid) und antiapoptotische (Bcl-2, Bcl-xL) unterteilt werden. Sie können den Apoptoseprozess induzieren oder ihm entgegenwirken. Die Proteine aus der Bcl-2- und Bax-Familie interagieren während des Apoptoseprozesses unter anderen mit dem Adeninnukleotid-Translokator, der als Komponente der *Mitochondrial Permeability Transition Pore* (MPTP) eine zentrale Rolle in der Regulation des Apoptoseprozesses spielt (58,59). Die *Mitochondrial permeability transition pore* ist ein transmembraner Kanal, der sich an Kontaktstellen der äusseren und inneren Mitochondrienmembran ausbilden kann. Die Pore besteht grösstenteils aus dem spannungsabhängigen Anionenkanal VDAC (*Voltage Dependent Anion Chanel*), der sich in der äusseren mitochondrialen Membran befindet, und aus dem Adeninnukleotid-Translokator sowie dem Cyclophilin D, die beide in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert sind. Die Aktivierung vom MPTP führt zur Störung der Permeabilitätsbarriere und zur Unterbrechung der normalen mitochondrialen Aktivität. Nach der Aktivierung wird die Pore permeabel für Substanzen, die kleiner als 1,5 kDa sind. Dies führt zum Einfluss der Proteine in die Matrix, was eine osmotisch bedingte Wassserzunahme mit sich bringt. Es kommt zur Schwellung der Matrix und im Endeffekt zum Zerreißen der äusseren Mitochondrienmembran. Auf diesem Wege gelangen die apoptogenen Faktoren, unter anderen das Cytochrom C, aus dem Intermembranraum ins Zytosol. Im Zytosol bindet das Cytochrom C und dATP an Apaf-1 (*Apoptotischer Protease Aktivierungsfaktor-1*). Dies führt zur Konformationsänderung des Proteins und zur Zugänglichkeit der Proteinbindedomäne CARD (Caspase-Rekrutierungs-Domäne) von Apaf-1, die jetzt an die CARD Domäne der Procaspase 9 bindet. Dieser Komplex wird Apoptosom genannt und stellt die aktive Form der Caspase 9 dar. Die aktivierte

Caspase 9 induziert die Caspase-Kaskade. Diese setzt sich aus so genannten Effektorcaspasen wie Caspase 3, 6, 7 zusammen. Die Effektorcaspasen beteiligen sich u. a. am Abbau von Zytoskelett-Anteilen wie Lamin oder Actin sowie an der Aktivierung von DNasen und anderen Caspasen. DNasen schneiden die DNA an internukleosomalen gekennzeichneten Regionen, was zum Entstehen von 180-185bp großen Fragmenten führt. Die Zelle schnürt sich in kleinen Vesikeln nach und nach ab und wird phagozytiert. Apoptotische Zellen sind durch die Zerstörung des Zytoskeletts, Zellschrumpfung, Kondensation des Zellkerns und Fragmentierung der internukleosomalen DNA gekennzeichnet (119,120).

Im Rahmen dieser Arbeit verglichen wir das Ausmaß der Apoptose im Myokard von C57BL/6-Wildtyp-Mäusen und ANT1-überexprimierenden Mäusen unter basalen Bedingungen. Das Ausmaß an Apoptose im Gewebe kann auf vielen Wegen quantifiziert werden. Einerseits mittels der *TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling*-Färbung (TUNEL-Färbung), in Folge derer die während der Apoptose entstandenen DNA-Fragmente markiert und unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden. Andererseits lässt sich die Ausbreitung von Apoptose durch die Bestimmung von pro- und anti-apoptotischen Proteinen einschätzen. Hierzu gehören vor allem: Bax, FasL, Fas, zytosolisches und mitochondriales Cytochrom C. Das Verhältnis pro- und anti-apoptotischer Proteine entscheidet über Apoptoseinduktion oder -hemmung. So sind z.B. mit Bax, Fas und FasL die Voraussetzungen für die Apoptose gegeben. Ob sie jedoch induziert wird, hängt von der Expression von Bcl-2 und homologen Proteinen ab (59,60).

In unserer Arbeit bedienten wir uns der TUNEL-Färbung zur Einschätzung der Apoptose im Myokard der Wildtyp- und der ANT1-überexprimierenden Mäuse unter basalen Bedingungen. Dabei wurde in beiden Stämmen nur eine geringe Anzahl an apoptotischen Zellen detektiert. In hochdifferenzierten Geweben wie dem Myokard tritt der programmierte Zelltod unter physiologischen Bedingungen sehr selten auf.

Weiterhin sahen wir keine signifikanten Unterschiede in der Menge der Apoptosezellen zwischen den Wildtyp- und den transgenen Mäusen. Weiterführende Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe, die das Apoptoseausmaß in beiden Tiergruppen anhand der Apoptosemarker Bcl-2, Bax und Pro-Caspase-3 evaluierten, untermauerten das Ergebnis der histologischen Analyse.

Diese von uns erhobene Ergebnisse stimmen mit der Studie von Walther et al. überein, in der in ANT1-überexprimierenden Ratten keine signifikanten Unterschiede in

der Anzahl apoptotischer Zellen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren gemessen wurden (81). Sowohl die Zahl der apoptotischen Kardiomyozyten, die im Rahmen der TUNEL-Färbung markiert wurden, als auch das Verhältnis vom zytosolischen zum mitochondrialen Cytochrom C und die Caspase-3-Menge unterschieden sich unter basalen Bedingungen nicht signifikant zwischen den beiden Gruppen.

Auch eine weitere Studie von Wang et al., die ebenfalls an den hier beschriebenen ANT1-überexprimierenden Mäusen durchgeführt wurde, bestätigt diese Ergebnisse. In dieser Studie wurde zur Beurteilung des Apoptoseausmaßes das Verhältnis von Herzgewicht zu Körpergewicht des Tieres herangezogen. Auch hier ließen sich keine Unterschiede zwischen den Wildtyp- und ANT1-überexprimierenden Mäusen feststellen (82).

Diese Ergebnisse aus ANT1-überexprimierenden Tieren widersprechen Beobachtungen aus in vitro Experimenten mit ANT1-überexprimierenden HeLa-Zellen (menschliche Epithelzellen eines Zervixkarzinoms). In den HeLa-Zellen führte die Transfektion mit einem ANT1-überexprimierenden Plasmid zur Erhöhung der Apoptoserate (121,122). Im Gegensatz zu Kardiomyozyten, die vor allem ANT1 exprimieren (56), überwiegt in den HeLa-Zellen das ANT2, wobei ANT1 und ANT3 nur in kleinem Ausmass exprimiert werden (unpublizierte Daten). Auf diese unterschiedliche ANT-Isoformen-Zusammensetzung ist der Widerspruch in der Apoptoseinduktion durch die ANT1-Überexpression möglicherweise zurückzuführen.

Auch Bauer et al. untersuchten die Auswirkung der ANT1-Überexpression auf die Apoptoseinduktion in verschiedenen Zellen wie murinen L929- (Fibroblast) und 3T3-Zellen (Fibroblast), BHK-Zellen aus dem Hamster (Baby Hamster Kidney (BHK)-Zelllinien), humanen Zelllinien wie HeLa, MCF-7 (Brustkrebszellen) und PC3 (Protstatakarzinom Zelllinie) sowie in Hefezellen (121). Bis auf die Hefezellen ließ sich in allen oben genannten Zellreihen eine signifikante Zunahme der Apoptoserate nach einer erhöhten ANT1-Überexpression feststellen. Die Ergebnisse aus den oben genannten Zellreihen stimmen mit unseren Beobachtungen an den ANT1-überexprimierenden Kardiomyozyten möglicherweise aufgrund der Differenz in der ANT-Isoformen-Zusammensetzung der verschiedenen Zellen nicht überein. Zudem können sich die ANT1-transgenen Zellen an die ANT1-Überexpression adaptieren, während eine plötzliche Erhöhung der Expression mittels eines ANT1-spezifischen Vektors eine Überflutung der Zelle-ANT verursachen könnte.

Aus unseren Untersuchungen lässt sich der Schluss ziehen, dass unter basalen Bedingungen die ANT1-Überexpression in dem murinen Myokard keine erhöhte Rate an Apoptose mit sich bringt.

Die Belastungssituation stellte in unserem Fall die Coxsackievirus B3-induzierte Myokarditis dar. Die Rolle der Apoptose in der Pathogenese der Coxsackievirus B3-induzierten Myokarditis in Mäusemodellen wurde in verschiedenen Studien untersucht und bewiesen (123,124). Interessanterweise beeinflussen die viralen Proteine durch ihre Interaktion mit dem ANT den Apoptosevorgang und können ihn entweder initiieren oder blockieren (126, 127). Arbeiten innerhalb unserer Arbeitsgruppe an mit Coxsackievirus B3-infizierten Mäusen aus dem C57BL/6-Mausstamm zeigten, dass proapoptotische Veränderungen ein frühes Ereignis in der virusinduzierten Myokarditis sind. Darüber hinaus lieferten sie Beweise, dass sich die ANT1-Überexpression nicht bedeutend auf das Ausmaß der Apoptose auswirkte. Die Quantifizierung des programmierten Zelltodes erfolgte anhand der Bax-, Bcl-2-, und Pro-Caspase-3-Bestimmung. Diese ließ erwartungsgemäß eine erhöhte Apoptoserate während der akuten Phase der Coxsackievirus B3-induzierten Myokarditis in beiden Gruppen von Tieren feststellen. Das Ausmaß der Zellen, die von dem programmierten Zelltod betroffen waren, unterschied sich jedoch nur gering zugunsten der infizierten transgenen Mäuse im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren. In diesem Sinne beobachtete man bei den ANT1-überexprimierenden Tieren am 4. Tag p.i. eine massive Erhöhung der Pro-Caspase-3 Expression, die im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren tendenziell höher war. Am 8. Tag p.i. zeigten sich in beiden Gruppen von Tieren eine massive Bax-Überexpression, die trotz der gleichzeitigen Bcl-2-Erhöhung die Bcl-2/Bax-Ratio zugunsten des Bax und damit in die Apoptoserichtung verschob. Die am 8. Tag p.i. beobachtete deutlich niedrigere Erhöhung des Apoptosemarkers Bcl-2 bei ANT1-Tieren im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren wirkte sich jedoch nicht bedeutend auf die Bcl-2/Bax Ratio aus. Bis zum letzten Beobachtungszeitpunkt am 28. Tag p.i. normalisierte sich sowohl in den ANT1-überexprimierenden als auch in den Wildtyp-Tieren die Bax und Pro-Caspase-3 Expression, die gleichzeitig persistierende Bcl-2 Erhöhung führte zur Verschiebung des Bcl-2/Bax-Verhältnisses in die Antiapoptoserichtung.

Eine weitere Herzmuskelerkrankung, zu deren Pathogenese eine erhöhte Apoptoserate gehört, ist die hypertensive Herzmuskelerkrankung (125). Die Untersuchungen von Walther et al. an hypertensiven Ratten zeigten im Gegensatz zu

unseren Beobachtungen eine erniedrigte Anzahl von apoptischen Kardiomyozyten bei den ANT1-überexprimierenden Tieren als bei den Ratten mit unveränderter ANT1-Expression (81). Diese Schlüsse wurden anhand des Verhältnisses von zytosolischem zu mitochondrialem Cytochrom C, das bei den ANT1-überexprimierenden Ratten signifikant kleiner war, gezogen. Die weiterhin zur Einschätzung des Apoptoseausmasses hinzugezogene Caspase 3-Bestimmung fiel bei den ANT1-überexprimierenden Ratten unverändert aus, während sie bei den Wildtyp-Ratten unter pathologischen Bedingungen deutlich erhöht war.

Dass sich die kardioprotektive antiapoptotische Wirkung von der ANT1-Überexpression bei der Coxsackievirus B3-induzierten Myokarditis, im Gegenteil zu an Hypertonie erkrankten Tieren, nicht beweisen ließ, kann an der völlig anderen Pathogenese der Erkrankung liegen. Viren haben die Fähigkeit, den Apoptoseprozess zu beeinflussen. Entweder hemmen sie ihn, um eine Replikationsmöglichkeit zu haben, oder sie induzieren ihn (126). Beispielweise mit dem *Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)* infizierte Makrophagen produzieren lösliches virales Protein (Vpr), das an den ANT1-bindet und dadurch die Apoptose induziert (126,127). Das Cytomegalievirus hingegen kodiert für vMIA, die mit dem ANT interagiert und auf diesem Wege die Apoptose hemmt (128). Möglicherweise nutzt auch Coxsackievirus B3 ANT für seine Zwecke. Diese Annahme wird durch Ergebnisse aus früheren Studien von Dörner et al. gestützt. Dabei zeigte sich, dass nicht nur bei Myokarditis, sondern auch bei der dilatativen Kardiomyopathie, die am ehesten als Folge einer chronischen Myokarditis entstanden ist, eine veränderte ANT-Zusammensetzung nachzuweisen war. Es zeigten sich erhöhte ANT1-, erniedrigte ANT2- und unveränderte ANT3-Expression (66). Dieser ANT-Isoformenshift war vor allem bei Enterovirus-positiven Patienten zu beobachten. Ein solcher Isoformshift konnte bei Herzerkrankungen anderer Genese (z.B. ischämische, valvuläre oder hypertrophische Kardiomyopathie) nicht festgestellt werden.

Andererseits ist es möglich, dass die Apoptoseinduktion von dem Wirtsorganismus eingeleitet wurde, um das Virus zu eliminieren und dadurch den Schaden, der durch die Infektion verursacht werden könnte, einzuschränken (129). Mehr Apoptose bedeutet nicht eindeutig eine schlechtere Prognose für den Herzmuskel und einen schwereren Verlauf der Myokarditis. Diese Annahme wird durch die Studie von Colston et al. gestützt (124). In dieser Untersuchung wurde die Apoptoseentwicklung im Verlauf einer virusinduzierten Myokarditis zwischen zwei Mäusestämmen (CD1- und C3H-

Mäusestamm) verglichen. Der CD1-Mäusestamm ist verhältnismäßig resistent gegen die Myokarditis und entwickelt nach der Infizierung nur eine akute Herzmuskelentzündung. Im Gegensatz zu dem CD1- ist der C3H-Mäusestamm sensitiv für die Myokarditis. Die Erkrankung nimmt in dieser Tiergruppe einen chronischen Verlauf. Im Vergleich der beiden Gruppen ließ sich bei den sensitiven C3H Mäusen signifikant mehr von dem antiapoptotischen Marker Bcl-2 als bei den CD-1 Mäusen bestimmen.

Die ANT1-Überexpression wurde nicht nur während der viralen Myokarditis und bei der DCM beobachtet, sondern sie gehört auch zu einem Kardiomyozyten- protektiven Programm, das im Rahmen des kardialen Preconditioning wirksam wird. Nach kurzen subletalen Phasen von Ischämie oder nach Kältebelastung ließ sich in den Kardiomyozyten eine ANT1-Überexpression feststellen (79). Dies förderte die ANT- Aktivitätsstabilisierung sowie der verbesserten Kopplung zwischen ANT und mitochondrialer Creatinkinase. Das bedeutet im Endeffekt wiederum eine Stabilisierung des zytosolischen Energiegehaltes, Verringerung der Nekroserate und Apoptoserate, schnellere Rückgewinnung der kontraktile Funktion und verzögertes Auftreten einer Fibrose (130,131).

Die ANT1-Überexpression im Maus- und Rattenmodell führte somit unter basalen Bedingungen im Gegensatz zu den mit ANT1-spezifischen Expressionsvektoren behandelten Zellen, nicht zu einer erhöhten Apoptoserate. Vielmehr wirkt sie sich unter pathophysiologischen Bedingungen zellstabilisierend aus. Ein deutlicher kardioprotektiver Effekt der ANT1-Überexpression konnte bei hypertonen Tieren beobachtet werden. Jedoch besitzt sie bei einer viralen Infektion, bei der eine Zellelimination der infizierten Zellen wünschenswert wäre, einen negativen Effekt. Hier begünstigt die ANT1-Überexpression die virale Infektion, was zu einer erhöhten Immunantwort führt und sich damit auf die Schwere der Erkrankung, nicht jedoch auf ihren Ausgang auswirkt.

5. Zusammenfassung

Hintergrund: Der Adeninnukleotid-Translokator (ANT) befindet sich in der inneren Mitochondrienmembran, wo er eine Schlüsselposition in der Energieversorgung der Zelle einnimmt, indem er das ATP aus dem Mitochondrium ins Zytosol transportiert und dem Mitochondrium im Austausch das ADP wieder zuführt. Außer der Beteiligung am Energiestoffwechsel spielt ANT als multifunktionelles Protein im Apoptoseprozess und in der intrazellulären Kommunikation eine wichtige Rolle. Die kardioprotektive Wirkung der ANT1-Überexpression wurde vornehmlich *ex vivo* an dem Model des ischämischen „Preconditioning“ am isolierten Langendorf-Herzen beschrieben. Weiterhin zeigten Untersuchungen *in vivo* eine deutlich protektive Wirkung der erhöhten ANT1-Expression auf eine durch Hypertonie induzierte Herzinsuffizienz. Weiterführende Untersuchungen mit an Diabetes erkrankten Mäusen bewiesen die präventive Wirkung der ANT1-Überexpression bei der Entwicklung der diabetischen Kardiomyopathie.

Ziel: In dieser Arbeit wurden ANT1-überexprimierende Mäuse versus genetisch unveränderten Tieren hinsichtlich der Herzstruktur und deren Veränderungen unter basalen Bedingungen und im Verlauf einer Coxsackievirus B3-induzierten Myokarditis untersucht.

Material und Methoden: In dieser Studie wurden transgene ANT1-überexprimierende Mäuse und dazu gehörende Kontrollmäuse mit unveränderter ANT1-Expression verwendet. Die Tiere wurden in drei Gruppen, die sich jeweils aus ANT1-überexprimierenden und Wildtyp-Mäusen zusammensetzten, aufgeteilt. Die erste Gruppe wurde unter basalen Bedingungen untersucht. Die zweite Gruppe wurde mit Coxsackievirus B3-Virus infiziert und erkrankte an einer Myokarditis. Die dritte Gruppe war die dazugehörige Kontrollgruppe. Um die histologische Herzstruktur zu analysieren wurden die Mäuseherzen mit Hämatoxylin-Eosin-, Elastika-van-Gieson-, Sirius Red- und TUNEL-Färbungen behandelt und deren Struktur unter dem Licht- bzw. Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Die Untersuchungen führten wir zu vier Zeitpunkten im Verlauf der Myokarditis durch: am 4., 8. 14. und 28. Tag nach der Infizierung.

Resultate: Unter basalen Bedingungen konnten keine Unterschiede in der Herzstruktur von ANT1-überexprimierenden im Vergleich zu Wildtyp-Tieren aufgezeigt werden. Im Verlauf der Coxsackievirus B3-induzierten Myokarditis stellten wir bei den ANT1-überexprimierenden Mäusen jedoch ein tendenziell höheres Ausmaß an

Entzündung fest. Hinsichtlich der Apoptoseausprägung und den Veränderungen der extrazellulären Matrix im Verlauf der Herzmuskelentzündung unterschieden sich die transgenen Tiere und die Wildty-Tiere nicht. Beide Gruppen von Tieren heilten nach der akuten Phase der Myokarditis ohne bleibende Schädigung des Herzmuskels aus.

Schlussfolgerung: Ein deutlicher kardioprotektiver Effekt der ANT1-Überexpression konnte bei hypertonen und diabetischen Tieren beobachtet werden. Jedoch besitzt sie bei einer viralen Infektion, bei der eine Zellelimination der infizierten Zellen wünschenswert wäre, einen negativen Effekt. Hier begünstigt die ANT1-Überexpression die virale Infektion, was zu einer erhöhten Immunantwort führt und sich damit auf die Schwere der Erkrankung jedoch nicht auf ihren Ausgang auswirkt.

6. Literaturverzeichnis

1. Hoppe UC, Erdmann E: Leitlinien zur Therapie der chronischen Herzinsuffizienz (Deutsche Gesellschaft für Kardiologie). *Z Kardiol* 2001; 90: 218-237
2. Guidelines for the diagnosis and treatment of heart failure. The Task Force on Heart Failure of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 2001; 22: 1527-1560
3. Hunt HA, Baker DW, Chin MH, Cinquegrani MP, Feldmanmd AM, Francis GS, Ganiats TG, Goldstein S, Gregoratos G, Jessup ML, Noble RJ, Packer M, Silver MA, Stevenson LW, Gibbons RJ, Antman EM, Alpert JS, Faxon DP, Fuster V, Jacobs AK, Hiratzka LF, Russell RO, Smith SCJ: ACC/AHA Guidelines for the evaluation and management of chronic heart failure in the adult: Executive summery A raport of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee to Revise the 1995 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure): Developed in Collaboration With the international Society for Heart and Lung Transplantation; Endorsed by the Heart Failure Society of America. *Circulation* 2001; 104: 2996-3007
4. Strauer BE, Kandolf R, Mall G, Maisch B, Mertens T, Figulla HR, Schwartzkopff B, Brehm M, Schultheiss HP: Update 2001, Myocarditis-Cardiomyopathie. *Med Klein* 2001; 96: 608-625
5. Dec GW, Fuster V: Ideopathic dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med* 1994; 312, No 23: 1564-1575
6. Feldman AM, McNamara D.: Medical progress: Myocarditis. *N Engl J Med.* 2000; 343: 1388-1398
7. Kandolf R, Klingel K, Mertsching H, Canu A, Hohenadl C, Zell R et al.: Molecular studies on enteroviral heart disease: patterns of acute and persistent infections. *Eur Heart J* 1991; 12 (Suppl D): 49-55
8. Aretz HT, Billingham ME, Edwards WD, et al.: Myocarditis: a histopathologic definition and classification. *Am J Cardiovasc Pathol* 1987; 1: 3-14
9. Aretz HT: Myocarditis: the Dallas criteria. *Hum Path* 1987; 18: 619-624
10. Kuehl U, Daun B, Seeberg B, Schultheiss HP, Strauer BE: Dilatative Kardiomyopathie- eine chronische Myokarditis? Immunologische Charakterisierung lymphozytären Infiltrate. *Herz* 1992; 17: 97-106

11. WHO/ISFC Task Force: Richardson P, McKenna W, Bristow M: Report of the 1995 World Health Organisation/International Society and Federation of cardiology task on the definition and classification of cardiomyopathies. *Circulation* 1996; 93: 841-842
12. Schultheiss HP, Kuehl U: Myocarditis and inflammatory cardiomyopathy. In Crawford FA, DiMarco JP. *Cardiology*. London, Mosby 2001; 5.11.1-11.5
13. Martino TA, Liu P, Petric M, Sole MJ: Enteroviral myocarditis and dilated cardiomyopathy: a review of clinical and experimental studies. In *Human Enterovirus Infections*, Rotbart HA (ed). ASM Press: Washington DC 1995; 291-352
14. Baboonian C, Davies MJ, Booth J, McKenna W: Coxsackie B viruses and heart disease. *Curr Top Microbiol Immunol* 1997; 223: 31-52
15. Badorff C, Lee GH, Lamphear BJ, Martone ME, Campbell KP, Rhoads RE, Knowlton KU: Enteroviral Protease 2A cleaves dystrophin: evidence of cytoskeletal disruption in an acquired cardiomyopathy. *Nat Med* 1999; 5: 320-326
16. Lee GH, Badorff C, Knowlton KU: Dissociation of sarcoglycans and the dystrophin carboxyl terminus from the sarcolemma in enteroviral cardiomyopathy. *Circ Res* 2000; 87: 489-495
17. Neumann DA, Burek CL, Baughman KL, Rose NR, Hershkowitz A: Circulating heart-reactive antibodies in patients with myocarditis or cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 1990; 16: 839-846
18. Neumann DA, Lane JR, Wulff SM et al.: In vivo deposition of myosin-specific autoantibodies in the hearts of mice with experimental autoimmune myocarditis. *J Immunol* 1992; 148: 3806-3813
19. Alvarez FL, Neu N, Rose NR, Craig SW, Beisel KW: Heart specific autoantibodies induced by Coxsackie virus B3: identification of heart autoantigens. *Clin Immunol Immunopathol* 1987; 43: 129-139
20. Wolff PG, Kuhl U, Schultheiss H-P: Laminin disruption and autoantibodies to laminin in dilated cardiomyopathy and myocarditis. *Am Heart J* 1989; 117: 1303-1309
21. Limas CJ, Limas C: Beta-adrenoceptor autoantibodies in idiopathic dilated cardiomyopathy. In Schultheiss H-P, *New concepts in viral heart diseases*. Berlin: Springer-Verlag 1998; 217-222
22. Schultheiss H-P, Schulze K, Kuhl U, Ulrich G: The ADP/ATP carrier as a mitochondrial auto-antigen: facts and perspectives. *Ann NY Acad Sci* 1986; 488: 44-63
23. Kawai C: From myocarditis to cardiomyopathy: mechanism of inflammation and cell death: learning from past to the future. *Circulation* 1999; 99 (8): 1091-1100

24. Chow LH, Beisel KW, McManus BM: Enteroviral infection of mice with severe combined immunodeficiency. Evidence for direct viral pathogenesis of myocardial injury. *Lab Investing* 1992; 66: 24-31
25. Huber SA, Mortensen SA, Moulton G: Modulation of cytokine expression by CD4+ T cells during coxsackie B3 infections of BALB/c mice initiated by cells expressing the $\gamma\delta$ + T-cell receptor. *J Virol* 1996; 70: 3039-3044
27. Huber SA, Lodge PA: Coxsackie B-3 myocarditis in Balb/c mice. Evidence for autoimmunity to myocyte antigens. *Am J Pathol* 1984; 116: 21-29
26. Khatib R, Chason JL, Silberberg BK, Lerner AM: Agedependent pathogenicity of group B coxsackieviruses in Swiss-Webster mice: infectivity for myocardium and pancreas. *J Infect Dis* 1980; 141: 394-403
28. Huber SA, Kupperman J, Newell MK: Hormonal regulation of CD4+ T-cell responses in coxsackievirus B3-induced myocarditis in mice. *J Virol* 1999; 73: 4689-4695
29. Huber SA, Pfaeffle B: Differential Th1 and Th2 cell responses in male and female BALB/c mice infected with coxsackievirus group B type 3. *J Virol* 1994; 68: 5126-5132
30. Henke AS, Huber A, Stelzner A, Whitton JL: The role of CD8+ T lymphocytes in coxsackievirus B3-induced myocarditis. *J Virol* 1995; 69: 6720-6728
31. Leipner C, Borchers M, Merkle I, Stelzner A: Coxsackievirus B3-induced myocarditis in MHC class II-deficient mice. *J Hum Virol* 1999; 2: 102-114
32. Wilson FM, Miranda QR, Chason JL, Lerner AM: Residual pathologic changes following murine coxsackie A and B myocarditis. *Am J Pathol* 1969; 55(2): 253-265
33. Shioi T, Matsumori A, Sasayama S: Persistent expression of cytokine in the chronic stage of viral myocarditis in mice. *Circulation* 1996; 94(11): 2930-2937
34. Matsumori A: Molecular and immune mechanisms in the pathogenesis of cardiomyopathy: role of viruses, cytokines and nitric oxide. *Jpn Circ J* 1997; 61(4): 275-291
35. Godney EK, Gauntt CJ: Murine natural killer cells limit coxsackievirus B3 replication. *J Immunol* 1987; 139(3): 913-918
36. Seko Y, Shinkai Y, Kawasaki A, Yagita H, Okumura K, Yazaki Y: Evidence of perforin-mediated cardiac myocyte injury in acute murine myocarditis caused by Coxsackie virus B3. *J Pathol* 1993; 170(1): 53-58

37. Lodge PA, Herzum M, Olszewski J, Huber SA: Coxsackievirus B-3 myocarditis. Acute and chronic forms of the disease caused by different immunopathogenic mechanisms. *Am J Pathol.* 1987; 128(3): 455-463
38. Kishimoto C, Kuribayashi K, Masuda T, Tomioka N, Kawai C: Immunologic behaviour of lymphocytes in experimental viral myocarditis: significance of T lymphocytes in the severity of myocarditis and silent myocarditis in BALB/c-nu7nu mice. *Circulation* 1985; 71(6): 1247-1254
39. Seko Y, Tsuchimochi H, Nakamura T et al.: Expression of major histocompatibility complex I antigen in murine ventricular myocytes infected with Coxsackievirus B3. *Circ Res* 1990; 67: 360-367
40. Müller DL, Jenkins MK, Schwartz RH: Clonal expansion versus functional inactivation: a costimulatory signalling pathway determines the outcome of T cell antigen receptor occupancy. *Annu Rev Immunol* 1989; 7: 445-480
41. Mosmann TR, Sad S: The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 1996; 17(3): 138-146
42. Romagnani S: Th1/Th2 paradigm. *Immunol Today* 1997; 18(6): 263-266
43. Tomioka N, Kishimoto C, Matsumori A, Kawai C: Effects of prednisolone on acute viral myocarditis in mice. *J Am Coll Cardiol* 1986; 7: 868-872
44. Klingel K, Hohenadl C, Canu A, Albrecht M, Seemann M, Mall G, Kandolf R: Ongoing enterovirus-induced myocarditis is associated with persistent heart muscle infection: quantitative analysis of virus replication, tissue damage and inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89(1): 314-318
45. Fairweather D, Kaya Z, Shellam GR, Lawson CM, Rose NR: From infection to autoimmunity. *J Autoimmun* 2001; 16(3): 175-186
46. Neu N, Rose NR, Beisel KW, Herskowitz A, Gurri-Glass G, Craig SW: Cardiac myosin induces myocarditis in genetically predisposed mice. *J Immunol* 1987; 139(11): 3630-3636
47. Kodama M, Hanawa H, Saeki M, Hosono H, Inomata T, Suzuki K, Shibata A: Rat dilated cardiomyopathy after autoimmune giant cell myocarditis. *Circ Res* 1994; 75(2): 278-284
48. Cunningham MW, Antone SM, Gulizia JM, McManus BM, Fischetti VA, Gauntt CJ: Cytotoxic and viral neutralizing antibodies crossreact with streptococcal M protein, enteroviruses and human cardiac myosin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89(4): 1320-1324

49. Gauntt CJ, Higdon AL, Arizpe HM, Tamayo MR, Crawley R, Henkel RD, Pereira ME, Tracy SM, Cunningham MW: Epitopes shared between coxsackievirus B3 (CVB3) and Normal heart tissue contribute to CVB3-induced murine myocarditis. *Clin Immunol Immunopathol.* 1993; 68(2): 129-134
50. Klingenberg M: The ADP/ATP carrier in mitochondrial membranes, in the enzymes of biological membranes (Martonosi A.N., Ed). Plenum Press, New York 1985; 4 ed: 511-553
51. Eiermann W, Aquila H, Klingenberg M: Immunological characterization of the ADP/ATP translocator protein isolated from mitochondria of liver, heart and other organs (Evidence for an organ specificity). *FEBS Letters* 1977; Volume 74, number 2: 209-214
52. Klingenberg M: Structure-function of the ADP/ATP carrier. *Biochemical Society Transactions* 1992; 547-550
53. Walker, JE: The mitochondrial transporter family. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1992; 2: 519-526.
54. Pfaff E, Klingenberg M: Adenine nucleotide translocation of mitochondria, I. Specificity and Control. *European J Biochem* 1968; 6: 66-79
55. Dörner A, Pauschinger M, Badorff A, Noutsias M, Giessen S, Schulze K, Bilger J, Rauch U, Schultheiss H-P: Tissue-specific transcription pattern of the adenine nucleotide translocase isoforms in humans. *FEBS Lett* 1997; 414: 258-262
56. Dörner A, Olesch M, Giessen S, Pauschinger M, Schultheiss H-P: Transcription of the adenine nucleotide translocase isoforms in various types of tissues in the rat. *Biochim biophys Acta* 1999; 1417: 16-24
57. Rodic N, Oka M, Hamazaki T, Murawski MR, Jorgensen M, Maatouk DM, Resnick JL, Li E, Terada N: DNA methylation is required for silencing of ANT4, an adenine nucleotide translocase selectively expressed in mouse embryonic stem cells and germ cells. *Stem Cells* 2005; 23: 1314-1323
58. Belzacq AS, Vieira HL, Kroemer G, Brenner C: The adenine nucleotide translocator in apoptosis. *Biochimie* 2002; 84: 167-176
59. Belzacq AS, Vieira HL, Vandecasteele G, Cohen I, Prevost MC, Larquet E, Pariselli F, Petit PX, Khan A, Rizzuto R, Brenner C, Kroemer G: Bcl-2 and Bax modulate adenine nucleotide translocase activity. *Cancer Res* 2003; 63: 541-546
60. Boya P, Roumier T, Andreau K, Gonzalez-Polo RA, Zamzami N, Castedo M, Kroemer G: Mitochondrial-targeted apoptosis regulators of viral origin. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 304(3): 575-581

61. Sharer JD, Shern JF, Van VH, Wallace DC, Kahn RA: ARL2 and BART enter mitochondria and bind the adenine nucleotide transporter. *Mol Biol Cell* 2002; 13: 71-83
62. Bottero V, Rossi F, Samson M, Mari M, Hofman P, Peyron JF: Ikappa b-alpha, the NF-kappa B inhibitory subunit, interacts with ANT, the mitochondrial ATP/ADP translocator. *J Biol Chem* 2001; 276: 21317-21324
63. Schultheiss H-P, Schulze K, Dörner A: The adenine nucleotide translocator: A major autoantigen in myocarditis and dilated cardiomyopathy, in the role of immune mechanism in cardiovascular disease (Schultheiss HP and Schwimmbeck PL, Eds.). Springer Verlag, Berlin, Heidelberg 1996; 1 ed.: 85-100
64. Dörner A, Kallwellis-Opara A, Pauschinger M, Kuehl U and Schultheiss H-P: Cardiac autoantibodies in viral myocarditis, in *Heart Failure Clinics* (G.William Dec, Ed.). Elsevier Saunders Verlag, Philadelphia; 1 ed.: 333-343
65. Schultheiss H-P, Pauschinger M, Dörner A, Kuehl U, Bilger J and Schwimmbeck PL: Entzündliche Herzerkrankungen, in *Handbuch der molekularen Medizin* (Ganten D and Ruckpaul K, Eds.); Springer Verlag, Berlin, Heidelberg 1998; 111-146
66. Dörner A, Schultheiss H-P: The myocardial expression of the adenine nucleotide translocator isoforms is specifically altered in dilated cardiomyopathy. *Herz* 2000; 25: 176-180
67. Schulze K, Dörner A, Schultheiss H-P: Mitochondrial function in heart failure, in *The energetics of heart failure* (Ingwall, J S and Nebauer S, Eds.). Kluwer Academic Publischer, Boston 1994; 229-244
68. Dörner A, Schulze K, Rauch U, Schultheiss H-P: Adenine nucleotide translocator in dilated cardiomyopathy: pathophysiological alterations in expression and function. *Mol Cell Biochem* 1997; 174: 261-269
69. Dörner A, Giessen S, Gaub R, Grosse SH, Schwimmbeck PL, Hetzer R, Poller W, Schultheiss H-P: An isoform shift in the cardiac adenine nucleotide translocase expression alters the kinetic properties of the carrier in dilated cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail* 2006; 8: 81-89
70. Bosman C, Boldrini R, Fusilli S: Dilated cardiomyopathy in infancy-Ultrastructural image analysis for diagnostic purpose. *Pathol Res Pract* 1989; 185: 807-817
71. Jarreta D, Orus J, Barrientos A, Miro O, Roig E, Heras M, Moraes CT, Cardellach F, Casademont J: Mitochondrial function in heart muscle from patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Cardiovasc Res* 2000; 45: 860-865

72. Jordes EZ, Palmieri L, Huizing M, van den Heuvel LP, Sengers RC, Dörner A, Ruitenbeek W, Trijbels FJ, Valsson J, Sigfusson G, Palmieri F, Smeitink JA: Adenine nucleotide translocator 1 deficiency associated with Senger Syndrome. *ANN Neurol* 52: 95-99
73. Chen XJ: Induction of an unregulated channel by mutations in adenine nucleotide translocase suggests an explanation for human ophthalmoplegia. *Hum Mol Genet* 2002; 11: 1835-1843
74. Siciliano G, Tessa A, Petrini S, Mancuso M, Bruno C, Grieco GS, Malandrini A, DeFlorio L, Martini B, Federico A, Nappi G, Santorelli FM, Murri L: Autosomal dominant external ophthalmoplegia and bipolar affective disorder associated with a mutation in the ANT1 gene. *Neuromuscul Disord* 2003; 13: 162-165
75. Fontanesi F, Palmieri L, Scarcia P, Lodi T, Donnini C, Limongelli A, Tiranti V, Zeviani M, Ferrero I, Viola AM: Mutations in AAC2, equivalent to human adPEO-associated ANT1 mutations, lead to defective oxidative phosphorylation in *Saccharomyces cerevisiae* and affect mitochondrial DNA stability. *Hum Mol Genet* 2000; 13: 923-934
76. Graham BH, Waymire KG, Cottrell B, Trounce IA, MacGregor GR, Wallace DC: A mouse model for mitochondrial myopathy and cardiomyopathy resulting from a deficiency in the heart/muscle isoform the adenine nucleotide translocator. *Nat Genet* 1997; 16: 226-234
77. Esposito La, Melov S, Panov A, Cottrell BA, Wallace DC: Mitochondrial disease in mouse results in increased oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 4820-4825
78. Kang D, Hamasaki N: Mitochondrial oxidative stress and mitochondrial DNA. *Clin Chem Lab Med* 2003; 41: 1281-1288
79. Ning XH, Xu CS, Song YC, Xiao Y, Hu YJ, Lupinetti FM, Portman MA: Hypothermia preserves function and signaling for mitochondrial biogenesis during subsequent ischemia. *Am J Physiol* 1998; 274:7 86-793
80. Flierl A, Chen Y, Coskun PE, Samulski RJ, Wallance DC: Adeno-associated virus-mediated gene transfer of the heart/muscle adenine nucleotide translocator (ANT) in mouse. *Gene Ther* 2005; 12: 570-578
81. Walther T, Tschoepe C, Sterner-Kock A, Westermnn D, Heringer-Walther S, Riad A, Nikolic A, Wang Y, Ebermann L, Siems WE, Bader M, Shakibaei M, Schultheiss HP, Dörner A: Accelerated mitochondrial adenosine diphosphate/adenosine triphosphate

transport improves hypertension-induced heart disease, *Circulation* 2007; 115(3): 333-44

82. Wang Y, Ebermann L, Sterner-Kock A, Wika S, Schultheiss H-P, Dörner A, Walther T: Myocardial overexpression of adenine nucleotide translocase 1 ameliorates diabetic cardiomyopathy in mice. *Exp Physiol* 2008 94: 220-227

83. Berens von Rautenfeld, Christ B, Dermietzel R, Düllmann J., Duncker H-R, Fahimi HD, Fleischhauer K, Forssmann W-G, Kugler P, Pabst R, Putz R, Rahn BA, Schmidt H-M, Schnittler H-J, Staubesand J, Wulfhekel U: *Benninghoff Anatomie* 1994, 10.3: 631-632

84. Herbst H, Hübner J-H: *Pathologie Online. Spezielle Pathologie* 2003

85. Vogelpohl I, Vetter R, Heger J, Ebermann L, Euler G, Schultheiss H-P, Dörner A: Transgenic Overexpression of Heart-specific Adenine Nucleotide Translocase 1 Positively Affects Contractile Function in Cardiomyocytes. *Cell Physiol Biochem* 2011; 27: 121-128

86. Cowburn PJ, Cleland JGF, Coats AJS, Komajda M: Risk stratification in chronic heart failure. *Eur Heart J* 1998; 19: 696-710

87. Grogan M, Redfield MM, Bailey KR, Reeder GS, Gersh BJ, Edwards WD, Rodeheffer RJ: Long-term outcome of patients with biopsy-proved myocarditis: Comparison with idiopathic dilated cardiomyopathy. *JACC* 1995; 26: 80-84

88. Hammond EH, Menlove RL, Anderson JL: Predictive value of immunofluorescence and electron microscopic evaluation of endomyocardial biopsies in the diagnosis and prognosis of myocarditis and idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am Heart J* 1987; 114: 1055-1064

89. Pelliccia F, D'Amati G, Cianfrocca C, Bernucci P, Nigri A, Marino B, Gallo P: Histomorphometric features predict 1 year outcome of patients with idiopathic dilated cardiomyopathy considered to be at low priority for cardiac transplantation. *Am Heart J* 1994; 128: 316-325

90. Pauschinger M, Dörner A, Kuehl U, et al.: Enteroviral RNA replication in the myocardium of patients with left ventricular dysfunction and clinically suspected myocarditis. *Circulation* 1999; 99: 889-895

91. Pelouch V, Dixon IMC, Golfman L, Beamish RE, Dhalla NS: Role of extracellular matrix proteins in heart function. *Mol Cell Biochem* 1994, 129: 101-120

92. Myllyharju J, Kivirikko KI: Collagens and collagen-related diseases. *Ann Med* 2001; 33: 7-21.

93. Medugorac I, Jacob R: Characterization of left ventricular collagen in the rat, *Cardiovasc Res* 1983; 17:15-21
94. Weber KT, Janicki JS, Shroff SG, Pick R, Chen RM, Bashey RI: Collagen remodeling of the pressure overloaded, hypertrophied nonhuman primate myocardium. *Circ Res* 1988; 62: 757-765
95. Eghbali M, Buttrick PM, Leinwand LA, Giambrone MA, Robinson TF, Zern MA, Seifter S, Blumenfeld OO: Localization of types I, III, and IV collagen mRNAs in hearts tissue by in situ hybridization. *J Mol Cell Cardiol* 1989; 21: 103-113
96. Eghbali M, Czaja MJ, Zedel M, Weiner FR, Zern MA, Seifter S, Blumenfeld OO: Collagen chain mRNAs in isolated heart cells from young and adult rats. *J Mol Cell Cardiol* 1988; 20: 267-276
97. Robinson TF, Geraci MA, Sonnenblick EH, Factor SM: Coiled perimysial fibers of papillary muscle in rat heart: morphology, distribution, and changes in configuration. *Circ Res* 1988; 63: 577-592
98. Li YY, McTiernan CF, Feldman AM: Proinflammatory cytokines regulate tissue inhibitorsof metalloproteinases and disintegrin metalloproteinase in cardiac cells. *Cardiovasc Res* 1999; 42: 162-172
99. Weber KT, Anversa P, Armstrong PW, Brilla CG, Burnett JC, Cruickshank JM: Remodeling and reparation of the cardiovascular system. *J Am Cill Cardiol* 1992; 30: 3-16
100. Bestholtz C, Raines EW: Platelet-derived growth factor: a key regulator of connective tissue cells in embryogenesis and pathogenesis. *Kidney Int* 1997; 51: 1361-1369
101. Grün K, Markowa B, Böhmer F-D, Berndt A, Kosmehl H, Leipner C: Elevated expression of PDGF-C in coxsackievirus B3-induced chronic myocarditis. *European Heart J* 2005; 26: 728-739
102. Mauviel A: Cytokine regulation of metalloproteinase gene expression. *J Cell Biochem* 1993; 53: 288-295
103. Deswal A, Petersen NJ, Feldman AM, White BG, Mann DL: Cytokines and cytokine receptors in advanced heart failure: an analysis of the cytokine database from the Vesnarinone trial (VEST). *Circulation* 2001; 103: 2055-2059
104. Borden P, Heller RA: Transcriptional control of matrix metalloproteinases and the tissue inhibitors of matrix metalloproteinases. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 1997; 7: 159-178

105. Torre-Amione G, Kapadia S, Lee J: Expression and functional significance of tumor necrosis factor receptors in human myocardium. *Circulation* 1995; 92: 1487-1493
106. Woessner JF, Nagase JRH: Introduction to the matrix metalloproteinases (MMPs), Matrix Metalloproteinases and TIMPs. Oxford University Press 2000; 1-10
107. Jeffrey JJ: Interstitial collagenases, Academic Press 1998; 15-42
108. Rutschow S, Li J, Schultheiss H-P, Pauschinger M: Myocardial proteases and matrix remodeling in inflammatory heart disease. *Cardiovasc Research* 2006; 69: 646-656
109. Li J, Schwimmbeck PL, Tschöpe C, Leschka S, Husmann L, Rutschow S: Collagen degradation in a murine myocarditis model: relevance of matrix metalloproteinase in association with inflammatory induction. *Cardiovasc Res* 2002; 56: 235-247
110. Woodiwiss AJ, Tsoetsi OJ, Sprott S, Lancaster EJ, Mela T, Chung ES: Reduction in myocardial collagen cross-linking parallels left ventricular dilatation in rats models of systolic chamber dysfunction. *Circulation* 2001; 103:155-160
111. Martinet Y, Menard O, Vaillant P, Vignaud JM, Martinet N: Cytokines in human lung fibrosis. *Arch Toxicol Suppl* 1996; 18: 127-139
112. Gabler U, Berndt A, Kosmehl H, Mandel U, Zardi L, Müller S, Stelzner A, Katenkamp D: Matrix remodelling in dilated cardiomyopathy entails the occurrence of oncofetal fibronectin molecular variants. *Heart* 1996; 75: 358-362
113. Tamura A, Kusachi S, Nogami K, Yamanishi A, Kajikawa Y, Hirohata S, Tsuji T: Tenascin expression in endomyocardial biopsy specimens in patients with dilated cardiomyopathy: distribution along margin of fibrotic lesions. *Heart* 1996; 75: 291-294
114. Leslie KO, Schwarz J, Simpson K, Huber SA: Progressive interstitial collagen deposition in Coxsackievirus B3-induced murine myocarditis. *Am J Pathol* 1990; 136: 683-693
115. Stull LB, Dilulio NA, Yu M, McTiernan CF, Ratliff NB, Tuohy VK, Moravec CS: Alterations in cardiac function and gene expression during autoimmune myocarditis in mice. *J Moll Cell Cardiol* 2000; 32: 2035-49
116. Sato S, Tsutsumi R, Burke A, Carlson G, Porro V, Seko Y, Okumura K, Kawana R, Virmani R: Persistence of replicating coxsackievirus B3 in the athymic murine heart is associated with development of myocarditis lesions, *J of General Virol* 1994 75: 2911-2924

117. Pauschinger M, Knopf D, Petschauer S, Dörner A, Poller P, Schwimmbeck PL: Dilated cardiomyopathy is associated with significant changes in collagen type I/III ratio. *Circulation* 1999; 99: 2750-2756
118. Cotter TG, Lennon SV, Glynn JG, Martin SJ: Cell death via apoptosis and its relationship to growth, development and differentiation of both tumor and normal cells. *Anticancer Res* 1990; 10: 1153-1159
119. Gorczyca W, Melamed MR, Darzynkiewicz Z: Programmed death of cells (apoptosis). *Patol Pol* 1993; 44: 113-119
120. Van Delft MF, Huang DCS: How the Bcl-2 family of proteins interact to regulate apoptosis. *Cell Res* 2006; 16: 203-213
121. Bauer MKA, Schubert A, Rocks O, Grimm S: Adenine nucleotide translocase-1, a component of the permeability transition pore, can dominantly induce apoptosis. *J Cell Biol* 1999; 147: 1493-1501
122. Zamora M, Granell M, Mampel T, Viñas O: Adenine nucleotide translocase 3 (ANT3) overexpression induces apoptosis in cultured cells. *FEBS Letters* 2004; 563: 155-160
123. Peng T, Sadusky T, Li Y, Coulton GR, Zhang H, Archard LC: Altered expression of Bag-1 in Coxsackievirus B3 infected mouse heart. *Cardiovasc Res* 2001; 50 :46-55
124. Colston JT, Chandrasekar B, Freema GI: Expression of apoptosis-related proteins in experimental coxsackievirus myocarditis. *Cardiovasc Res* 1998; 38: 158-168
125. Fortuno MA, Gonzalez A, Ravassa S, Lopez B, Diez J: Clinical implications of apoptosis in hypertensive heart disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 284: 1495-1506
126. Kitayama H, Miura Y, Ando Y, Hoshino S, Ishizaka Y, Koyanagi Y: Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vpr Inhibits Axonal Outgrowth through Induction of Mitochondrial Dysfunction. *Journal of Virology* 2008; 2528-2542
127. Sabbah EN, Druillennec S, Morellet N, Bouaziz S, Kroemer G, Roques BP: Interaction between the HIV-1 protein Vpr and the Adenine Nucleotide Translocator. *Chem Biol Drug Des* 2006; 67: 145-154
128. Goldmacher VS, Bartle LM, Skaletskaya A, Dionne CA, Kedersha NL, Vater CA, Han J, Lutz RJ, Watanabe S, McFarland EDC, Kieff ED, Mocarski ES, Chittenden T: A cytomegalovirus-encoded mitochondria-localized inhibitor of Apoptosis structurally unrelated to Bcl-2. *PNAS* Oct 1996; 96(22): 12536-12541

129. Huber SA: Coxsackievirus-induced myocarditis is dependent on distinct immunopathogenic responses in different strains of mice. *Lab Invest* 1997; 76: 691-701
130. Kobara M, Tatsumi T, Matoba S, Yamahara Y, Nakagawa C, Ohta B, Matsumoto T, Inoue D, Asayama J, Nakagawa M: Effect of ischemic preconditioning on mitochondrial oxidative phosphorylation and high energy phosphates in rat hearts. *J Mol Cell Cardiol* 1996; 28: 417-428
131. Laclau MN, Boudina S, Thambo JB, Tariosse L, Gouverneur G, Bonoron-Adele S, Saks VA, Garlid KD, Dos SP: Cardioprotektion by ischemic preconditioning preserves mitochondrial function and functional coupling between adenine nucleotide translocase and creatine kinase. *J Mol Cell Cardiol* 2001; 33: 947-956

7. Publikationsverzeichnis

Wang Y, Ebermann L, Sterner-Kock A, Wika S, Schultheiss H-P, Dörner A, Walther T: Myocardial overexpression of adenine nucleotide translocase 1 ameliorates diabetic cardiomyopathy in mice. *Exp Physiol* 2008 94: 220-227

Ebermann L, Wika S, Vogelpohl I, Hammer E, Klingel K, Lassner D, Völker U, Erben U, Zeichhardt H, Schultheiss HP, Dörner A: The mitochondrial respiratory chain plays a critical role in the antiviral process in Coxsackievirus B3-induced myocarditis. *Laboratory Investigation*, eingereicht, 1. Revision

Ebermann L, Wika S, Vogelpohl I, Klingel K, Hammer E, Völker U, Weithäuser A, Pinkert S, Lassner D, Fechner H, Rauch-Kröhnert U, Kandolf R, Schultheiss HP, Dörner A: Significance of Mitochondrial Function in Coxsackievirus B3-Induced Myocarditis. *European Journal of Heart Failure Supplements* 2010; 9: 37.

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei all denjenigen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Zunächst möchte ich mich bei Professor Dr. Heinz-Peter Schultheiss für die freundliche Überlassung des Themas bedanken.

Mein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Frau Dr. rer. nat. Andrea Dörner für die sehr gute Betreuung und die stetige Bereitschaft, immer wieder auftretende Fragen zu beantworten.

Sehr herzlich bedanke ich mich bei Dr. rer. nat. Linda Ebermann für die Unterstützung bei den Laborarbeiten sowie das freundliche Arbeitsklima.

Weiterhin möchte ich mich bei Dr. Dirk Lassner für die Freistellung des Labors und bei Susanne Ochmann für die Ausdauer und Hilfe bei der Einarbeitung in die histologische Techniken bedanken.

Ein weiterer Dank gilt meinen Eltern, meiner Tante Danuta und meinen Brüdern, die mich auf meinem bisherigen Lebensweg mit aller Kraft unterstützt haben.

Mein Dank gilt auch meinem Ehemann Thomas, der mich mit seiner ruhigen Art bei der Bearbeitung dieser Doktorarbeit immer wieder ermutigt und unterstützt hat. Für Letzteres auch großen Dank an meine lieben Freundinnen Stefanie Neumann und Susa Brandau.

LEBENS LAUF

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

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Sylwia Anna Wika-Firgon, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Histologische Analyse des ANT1-überexprimierenden Herzmuskelgewebes im Verlauf der Coxackievirus B3-induzierten Myokarditis“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum 08.08.2011

Unterschrift

Abkürzungen

ADP	Adenosindiphosphat
adPEO	Autosomal-dominante progressive externe Ophthalmoplegie
AM	Adenosinmonophosphat
ANT	Adeninnukleotid-Translokator
Apaf-1	Apoptotischer Protease Aktivierungsfaktor-1
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
CARD	Caspase-Rekrutierungs-Domäne
CVB3	Coxsackievirus B3
d	Tag
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
ECM	Extrazelluläre Matrix
EMCV	Encephalomyokarditis Virus
et al.	<i>et alii</i> (und andere)
EvG	Elastika-van-Gieson-Färbung
GDP	Guanosindiphosphat
Gr.	Gruppe
GTP	Guanosintriphosphat
HE	Hämatoxilin-Eosin-Färbung
HIV-1	<i>Human immunodeficiency virus type 1</i>
IFN- γ	Interferon γ
IL-1 β	Interleukin 1 β

kDa	Kilodalton
LT	Lymphotoxin
M	Molar (mol/l)
min	Minute
MHC I	<i>Major-Histocompatibility-Complex Class I</i>
MMPs	<i>Matrix Metalloproteinases</i>
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
MPTP	<i>Mitochondrial Permeability Transition Pore</i>
n	Anzahl der Mäuse
NK	Natürliche Killer Zellen
n. s.	nicht signifikant
p	Wahrscheinlichkeitsmaß
PDGF	<i>Platelet-derived Growth Factors</i>
PFU	<i>Plaque forming units</i>
p. i.	<i>Post infectionem</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
s.	signifikant
SEM	<i>Standard error of the mean</i> (Standardfehler)
sec	Sekunde
TdT	<i>Label Solution-Terminal deoxynucleotidyl transferase</i>
ten.	Tendenziell
TGF-β	<i>Transforming Growth Factor β</i>
TH	T-Helfer-Zellen
TIMPs	<i>Tissue Inhibitors of Metalloproteinases</i>
TNF-R	<i>Tumor necrosis factor-receptor</i>
TNF-α	<i>Tumor necrosis factor α</i>
TRAIL-R	<i>Tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand-receptor</i>
TUNEL	<i>The terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling</i>
uPA	Urokinase-Typ Plasminogen Activator
WT	Wildtyp

VDAC	<i>Voltage Dependent Anion Chanel</i>
α MHC	<i>α-Myosin-Heavy-Chain Promotor</i>

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1 Modell der Sekundärstruktur des ANT der Hefe (Referenz)
- Abb. 2 Nicht infizierte Mäusegruppe 1: WT- und ANT1-überexprimierende Tiere, Hämatoxin-Eosin-Färbung, links: 4x Vergrößerung, rechts: 40x Vergrößerung
- Abb. 3 Nicht infizierte Mäusegruppe 1: WT- und ANT1-überexprimierende Tiere, Elastika-van-Gieson-Färbung, links: 4x Vergrößerung, rechts: 40x Vergrößerung
- Abb. 4 Nicht infizierte Mäusegruppe 1: WT- und ANT1-überexprimierende Tiere, Sirius-Red-Färbung, links: 4x Vergrößerung, rechts: 40x Vergrößerung
- Abb. 5 Positiv- und Negativ-Kontrolle in der TUNEL-Färbung, links: 4x Vergrößerung, rechts: 40x Vergrößerung
- Abb. 6 Nicht infizierte Mäusegruppe 1: WT- und ANT1-überexprimierende Tiere, TUNEL-Färbung, links: 4x Vergrößerung, rechts: 40x Vergrößerung
- Abb. 7 5×10^5 pfu CVB3/Tier infizierte Mäuse Gruppe 2.1: WT- und ANT1-überexprimierende Tiere, Hämatoxylin-Eosin-Färbung 4. d p. i., links: 4x Vergrößerung, rechts: 40x Vergrößerung
- Abb. 8 5×10^5 pfu CVB3/Tier infizierte Mäusegruppe 2.1: WT- und ANT1-überexprimierende Tiere, Hämatoxylin-Eosin-Färbung 8. d p. i., links: 4x Vergrößerung, rechts: 40x Vergrößerung
- Abb. 9 5×10^5 pfu CVB3/Tier infizierte Mäusegruppe 2.1: WT- und ANT1-überexprimierende Tiere, Hämatoxylin-Eosin-Färbung 14. d p. i., links: 4x Vergrößerung, rechts: 40x Vergrößerung
- Abb. 10 5×10^5 pfu CVB3/Tier infizierte Mäuse Gruppe 2.1: WT- und ANT1-überexprimierende Tiere, Hämatoxylin-Eosin-Färbung 28. d p. i., links: 4x Vergrößerung, rechts: 40x Vergrößerung

- Abb. 11 5×10^5 pfu CVB3/Tier infizierte Mäusegruppe 2.1: WT- und ANT1-überexprimierende Tiere, Elastika-van-Gieson-Färbung 4. d p. i., links: 4x Vergrößerung, rechts: 40x Vergrößerung
- Abb. 12 5×10^5 pfu CVB3/Tier infizierte Mäusegruppe 2.1: WT- und ANT1-überexprimierende Tiere, Elastika-van-Gieson-Färbung 8. d p. i., links: 4x Vergrößerung, rechts: 40x Vergrößerung
- Abb. 13 5×10^5 pfu CVB3/Tier infizierte Mäusegruppe 2.1: WT- und ANT1-überexprimierende Tiere, Elastika-van-Gieson-Färbung 14. d p. i., links: 4x Vergrößerung, rechts: 40x Vergrößerung
- Abb. 14 5×10^5 pfu CVB3/Tier infizierte Mäuse Gruppe 2.1: WT- und ANT1-überexprimierende Tiere, Sirius-Red-Färbung 14. d p. i., links: 4x Vergrößerung, rechts: 40x Vergrößerung

Tabellenverzeichnis

- Tab. 1 Verteilungsmuster der ANT-Isoformen in verschiedenen humanen Geweben (Dörner et al., 1996)
- Tab. 2 Entwässern und Paraffinieren von Gewebe
- Tab. 3 Bewässern von Gewebe für die HE-Färbung
- Tab. 4 Entwässern von Gewebe für die HE-Färbung
- Tab. 5 Bewässern von Gewebe für die EvG-Färbung
- Tab. 6 Bewässern von Gewebe für die Sirius-Red-Färbung
- Tab. 7 Entwässern von Gewebe für die Sirius-Red-Färbung
- Tab. 8 Bewässern von Gewebe für die TUNEL-Färbung
- Tab. 9 Mäusegruppenaufteilung
- Tab. 10 Nicht infizierte Mäusegruppe 1, Hämatoxin-Eosin-Färbung
- Tab. 11 Nicht infizierte Mäusegruppe 1, Elastika-van-Gieson-Färbung
- Tab. 12 Nicht infizierte Mäusegruppe 1, Sirius-Red-Färbung
- Tab. 13 Nicht infizierte Mäusegruppe 1, TUNEL-Färbung
- Tab. 14 5×10^5 pfu CVB3/Tier infizierte Mäusegruppe 2.1 und nicht infizierte Kontrollgruppe 2.2, Hämatoxylin-Eosin-Färbung 4. d p. i.
- Tab. 15 5×10^5 pfu CVB3/Tier infizierte Mäuse Gruppe 2.1 und nicht infizierte Kontrollgruppe 2.2, Hämatoxylin-Eosin-Färbung 8. d p. i.
- Tab. 16 5×10^5 pfu CVB3/Tier infizierte Mäuse Gruppe 2.1 und nicht infizierte Kontrollgruppe 2.2, Hämatoxylin-Eosin-Färbung 14. d p. i.
- Tab. 17 5×10^5 pfu CVB3/Tier infizierte Mäuse Gruppe 2.1 und nicht infizierte Kontrollgruppe 2.2, Hämatoxylin-Eosin-Färbung 28. d p. i.
- Tab. 18 5×10^5 pfu CVB3/Tier infizierte Mäuse Gruppe 2.1 und nicht infizierte Kontrollgruppe 2.2, Elastika-van-Gieson-Färbung 4.d p. i.
- Tab. 19 5×10^5 pfu CVB3/Tier infizierte Mäuse Gruppe 2.1 und nicht infizierte Kontrollgruppe 2.2, Elastika-van-Gieson-Färbung 8. d p. i.

- Tab. 20 5×10^5 pfu CVB3/Tier infizierte Mäuse Gruppe 2.1 und nicht infizierte Kontrollgruppe 2.2, Elastika-van-Gieson-Färbung 14. d p. i.
- Tab. 21 5×10^5 pfu CVB3/Tier infizierte Mäuse Gruppe 2.1 und nicht infizierte Kontrollgruppe 2.2, Sirius-Red-Färbung 14. d p. i.