Der Coxsackievirus- und Adenovirus-Rezeptor (CAR) in Umstrukturierungsprozessen des embryonalen und adulten Herzens

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie der Freien Universität zu Berlin

vorgelegt von

Fabian Freiberg aus Büdingen

2013

Die Arbeit wurde vom 01.10.2009 bis 30.06.2013 unter Anleitung von Prof. Dr. Gotthardt am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, Berlin-Buch angefertigt.

- 1. Gutachter: Prof. Dr. Volker Haucke
- 2. Gutachter: Prof. Dr. Michael Gotthardt

Disputation am: 09.10.2013

Inhaltsverzeichnis

2 Summary 3 Einleitung 3.1 Das Herz-Kreislaufsystem 3.1.1 Die Morphologie des Herzens 3.1.2 Der Blutkreislauf 3.1.3 Die Blutversorgung des Herzens 3.1.4 Der Hutkreislauf 3.1.5 Dae Fautbau und die Funktion des Erregungsleitungssystems 3.1.6 Das Elektrokardiogramm 3.1.7 Die Prävalenz kardiovaskulärer Erkrankungen 3.2.1 Dae CAR-Gen und die CAR-Spleißvarianten 3.2.2 Die CAR-Proteinstruktur 3.2.3 Die Cakalisation von CAR und seine Interaktionspartner 3.2.4 Die Regulation der CAR-Expression 3.2.5 Erkenntnisse aus CAR-Knockout-Mäusen 3.3.1 Herzrhythmusstörung 3.3.2 Myokarditis 3.3.3 Myokarditis 3.4 Zielstellung der Arbeit 4 Material 4.1 Chemikalien 4.2 Geräte 4.3 Enzyme 4.4 Kits 4.5 Sekundäre Antikörper 4.5.1 Primära Antikörper 4.5.2	1	l Zu	1
3 Einleitung 3.1 Das Herz-Kreislaufsystem 3.1.1 Die Morphologie des Herzens 3.1.2 Der Blutkreislauf 3.1.3 Die Blutversorgung des Herzens 3.1.4 Der Herzzyklus 3.1.5 Der Aufbau und die Funktion des Erregungsleitungssystems 3.1.6 Das Elektrokardiogramm 3.1.7 Die Prävalenz kardiovaskulärer Erkrankungen 3.1.7 Die Prävalenz kardiovaskulärer Erkrankungen 3.2.1 Das CAR-Gen und die CAR-Spleißvarianten 3.2.2 Die CAR-Proteinstruktur 3.2.3 Die Lokalisation von CAR und seine Interaktionspartner 3.2.4 Die Regulation der CAR-Expression 3.2.5 Erkenntnisse aus CAR-Knockout-Mäusen 3.3 Herzrhythmusstörung 3.3.1 Herzrhythmusstörung 3.3.2 Myokardinfarkt 3.3.3 Myokardinfarkt 3.3.4 Zielstellung der Arbeit 4 Material 4.1 Chemikalien 4.2 Geräte 4.3 Enzyme 4.4 Kits 4.5 Oligonukleotide zur G	2	2 Su	2
3.1 Das Herz-Kreislaufsystem 3.1.1 Die Mottreislauf. 3.1.2 Der Blutkreislauf. 3.1.3 Die Blutversorgung des Herzens 3.1.4 Der Huttreislauf. 3.1.5 Der Aufbau und die Funktion des Erregungsleitungssystems 3.1.6 Das Elektrokardiogramm. 3.1.7 Die Prävalenz kardiovaskulärer Erkrankungen 3.1.7 Die Prävalenz kardiovaskulärer Erkrankungen 3.1.7 Die Coxsackievirus- und Adenovirus-Rezeptor (CAR) 3.2.1 Das CAR-Gen und die CAR-Spleißvarianten 3.2.2 Die Cokalisation von CAR und seine Interaktionspartner 3.2.3 Die Legulation der CAR-Expression 3.2.5 Erkenntnisse aus CAR-Knockout-Mäusen 3.3 CAR bei Herzerkrankungen 3.3.1 Herzrhythmusstörung 3.3.2 Myokardinfarkt 3.3.3 Myokardinfarkt 3.3.3 Myokardinfarkt 3.3.4 Zielstellung der Arbeit 4 Material 4.1 Chemikalien 4.2 Geräte 4.3 Enzyme 4.4 Kits 4.5 <th>3</th> <th>B Eir</th> <th>3</th>	3	B Eir	3
3.2 Der Coxsackievirus- und Adenovirus-Rezeptor (CAR) 3.2.1 Das CAR-Gen und die CAR-Spleißvarianten 3.2.2 Die CAR-Proteinstruktur 3.2.3 Die Lokalisation von CAR und seine Interaktionspartner 3.2.4 Die Regulation der CAR-Expression 3.2.5 Erkenntnisse aus CAR-Knockout-Mäusen 3.3 CAR bei Herzerkrankungen 3.3.1 Herzhythmusstörung 3.3.2 Myokardinfarkt. 3.3.3 Myokardinfarkt. 3.3.4 Zielstellung der Arbeit 4 Material 4.1 Chemikalien 4.2 Geräte 4.3 Enzyme 4.4 Kits 4.5 Antikörper 4.5.1 Primäre Antikörper 4.5.2 Sekundäre Antikörper 4.5.3 Oligonukleotide 4.6.1 Oligonukleotide zur Genotypisierung 4.6.2 Oligonukleotide zur real-time PCR 5 Methoden	3 3 4 5 ingsleitungssystems	B.1 Das 3.1.1 [] 3.1.2 [] 3.1.3 [] 3.1.3 [] 3.1.4 [] 3.1.5 [] 3.1.6 [] 3.1.7 []	3.1
3.3 CAR bei Herzerkrankungen 3.3.1 Herzrhythmusstörung 3.3.2 Myokardinfarkt 3.3.3 Myokarditis 3.4 Zielstellung der Arbeit 4 Material 4.1 Chemikalien 4.2 Geräte 4.3 Enzyme 4.4 Kits 4.5 Antikörper 4.5.1 Primäre Antikörper 4.5.2 Sekundäre Antikörper 4.5.3 Oligonukleotide zur Genotypisierung 4.6.1 Oligonukleotide zur Klonierung 4.6.3 Oligonukleotide zur Klonierung 4.6.3 Oligonukleotide zur real-time PCR	zeptor (CAR) 9 nten 9 11 1 eraktionspartner 12 5 15 en 16	3.2 Der 3.2.1 [] 3.2.2 [] 3.2.3 [] 3.2.4 [] 3.2.5 []	3.2
3.4 Zielstellung der Arbeit	17 17 18 19	3.3 CAR 3.3.1 H 3.3.2 M 3.3.3 M	3.3
4 Material 2 4.1 Chemikalien 2 4.2 Geräte 2 4.3 Enzyme 2 4.4 Kits 2 4.5 Antikörper 2 4.5.1 Primäre Antikörper 4 4.5.2 Sekundäre Antikörper 2 4.6 Oligonukleotide 2 4.6.1 Oligonukleotide zur Genotypisierung 2 4.6.2 Oligonukleotide zur Genotypisierung 2 4.6.3 Oligonukleotide zur Rionierung 2 4.6.3 Oligonukleotide zur real-time PCR 2		8.4 Ziels	3.4
 4.1 Cnemikalien		4 Ma	4
4.3 Enzyme 4.4 Kits 4.5 Antikörper 4.5.1 Primäre Antikörper 4.5.2 Sekundäre Antikörper 4.6 Oligonukleotide 4.6.1 Oligonukleotide zur Genotypisierung 4.6.2 Oligonukleotide zur Klonierung 4.6.3 Oligonukleotide zur real-time PCR 5 Methoden		l.1 Cne	4.1 4.2
 4.4 Kits 4.5 Antikörper 4.5.1 Primäre Antikörper 4.5.2 Sekundäre Antikörper 4.6 Oligonukleotide 4.6.1 Oligonukleotide zur Genotypisierung 4.6.2 Oligonukleotide zur Klonierung 4.6.3 Oligonukleotide zur <i>real-time</i> PCR 5 Methoden 		l.3 Enz	4.3
 4.5 Antikörper		.4 Kits	4.4
 4.6 Oligonukleotide	26 26 27	4.5.1 F 4.5.2 S	4.5
5 Methoden	27 27 27 27 28	4.6.1 (4.6.2 () 4.6.3 ()	4.6
	29	5 Me	5
5.1 Tierexperimentelle Praxis 5.1.1 Genotypisierung 5.1.2 Agarose-Gelelektrophorese 5.1.3 Tamoxifenbehandlung	29 29 32 33	5.1 Tier 5.1.1 (5.1.2 A 5.1.3 T	5.1

5.1.4	Ligation der linken Koronararterie	33
5.1.5	Echokardiographie	34
5.1.6	Elektrokardiographie	34
5.1.7	Messung der Körperzusammensetzung	35
5.1.8	Virusinfektion von Mäusen	35
50 N	ukleineäureenelytik	25
5.2 N	Amplifiziarung van DNA Fragmantan	
5.Z.I	Amplinzierung von DNA-Fragmenten	
5.2.2	DNA Gelexilarion	
5.2.5	Resultionsveruau voli DNA	
5.Z.4	PCR Autreningung	
5.Z.5	Ligation von DNA-Fragmenten	
5.2.0	Indisionation	
5.2.7	Isolation von Plasmid-Dina aus Bakterien	
5.2.8	ISOlation von RINA aus Geweben	
5.2.9	KNA-Autreinigung	
5.2.10	Messung der RNA-Qualitat	
5.2.11	Illumina Genexpressionsanalyse	
5.2.12	CDNA-Synthese	
5.2.13	Quantitative real time -PCR	
53 P	roteinchemische Methoden	40
531	Proteinisolation aus Gewehe	40
532	Proteinkonzentrationsbestimmung durch Amidoschwarz	41
533	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektronhorese	
534	Western hlotting	
535	Immunologischer Nachweis von Proteinen	
536	Immunfärbung von Proteinen	
537	Coverackievirus B3 Serum ELISA	
538	Multipley head-Immunoassay	
0.0.0		
5.4 Ze	ellkulturtechniken	44
5.4.1	Transfektion von Säugerzellen	44
5.4.2	Infektion von Säugerzellen	44
5.4.3	Plaqueassay	44
5.5 H	istologische Arbeiten	
5.5.1	Einbetten von Gewebe in Paraffin	
5.5.2	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	
5.5.3	Masson-Trichrom-Färbung	
5.5.4	CVB3 in situ Hybridisierung	
5.5.5	Elektronenmikroskopie	46
		47
5.0 51	atistik	
6 E	rgebnisse	48
6.1 C	AR in der Herzentwicklung	
6.1.1	Erzeugung der herzspezifischen CAR-Rescue-Maus	
6.1.2	Verifizierung der CAR-Rescue-Maus	50
62 0	AR in der CVB3-Pathogenese	51
621	Infaktionsstudian in dar CAP-Passua-Maus	
0.2.1 622	Viruerenlikation in Abhängigkeit verschiedener CAP-Spezies	
0.2.2	virusiepiikalion in Abhanyiykeit veischiedener OAK-Spezies	
63 C	AR im Verlauf des Myokardinfarkts	62
631	Analyse der Umstrukturierungsprozesse nach Myokardinfarkt	
632	Molekulare Veränderungen nach Myokardinfarkt	

7	Diskussion72
7.1	Die kardiale Expression von CAR rettet den letalen CAR-KO-Phänotyp
7.2	CAR-Rescue-Tiere entwickeln sich normal74
7.3	CAR aus dem Huhn kann die kardiale Funktion des murinen CAR ersetzen
7.4	Kardiale Veränderungen infolge der Überexpression von CAR sind dosisabhängig77
7.5	Der herzspezifische CAR-Rescue ist vor einer CVB3-Infektion geschützt
7.6	CAR aus dem Huhn ermöglicht keine Virusreplikation 80
7.7	Speziesspezifische Unterschiede zwischen zellulärer und viraler Funktion von CAR 82
7.8	Die Deletion von CAR minimiert die Folgen eines Myokardinfarkts
7.9	CAR beeinflusst kardiale Wachstumsprozesse 85
7.10	Therapieansätze zur Verbesserung der Herzfunktion nach einem Myokardinfarkt
8	Literaturverzeichnis90
8 9	Literaturverzeichnis90 Abbildungsverzeichnis102
8 9 10	Literaturverzeichnis
8 9 10 11	Literaturverzeichnis
8 9 10 11 11.1	Literaturverzeichnis 90 Abbildungsverzeichnis 102 Tabellenverzeichnis 103 Abkürzungsverzeichnis 104 Allgemeine Abkürzungen 104
8 9 10 11 11.1 11.2	Literaturverzeichnis 90 Abbildungsverzeichnis 102 Tabellenverzeichnis 103 Abkürzungsverzeichnis 104 Allgemeine Abkürzungen 104 Abkürzungen von Proteinen 106
8 9 10 11 ^{11.1} 11.2 12	Literaturverzeichnis90Abbildungsverzeichnis102Tabellenverzeichnis103Abkürzungsverzeichnis104Allgemeine Abkürzungen104Abkürzungen von Proteinen106Danksagungen107

1 Zusammenfassung

Der Coxsackievirus- und Adenovirus-Rezeptor (CAR) ist ein multifunktionelles Protein, das in den *tight junctions* von Epithelzellen und den Glanzstreifen des Herzens lokalisiert ist. Über seine extrazelluläre Domäne vermittelt es die Bindung und Internalisierung von Coxsackie- und Adenoviren, aber auch die Ausbildung von Zellkontakten durch homophile und heterophile Interaktionen. Durch den zytoplasmatischen Teil steht CAR mit intrazellulären Signalkaskaden und dem Zytoskelett in Verbindung. Die Expression von CAR ist im embryonalen Herzen und bei kardialen Erkrankungen stark erhöht. Dies lässt auf eine Rolle von CAR in Umstrukturierungsprozessen des Herzens schließen. Die Funktion von CAR in der Embryonalentwicklung und in Erkrankungen des Herzens sollten in dieser Arbeit untersucht werden.

Die Expression von CAR allein im Herzen reicht aus, um den embryonal letalen CAR-KO-Phänotyp zu umgehen. Dies belegt, dass CAR im Herzen, im Gegensatz zu anderen Organen, essentiell ist. Die zelluläre Funktion von CAR im Herzen bleibt über Speziesgrenzen hinweg erhalten, da CAR aus dem Huhn das der Maus ersetzen kann. In der Pathophysiologie viraler Erkrankungen vermittelt CAR aus dem Huhn jedoch keine Coxsackievirus-Infektion. Bei einem experimentell induzierten Myokardinfarkt erhöht die Deletion von CAR signifikant die Überlebenschancen. Es kommt zu kleineren Infarkten - vermutlich durch eine veränderte Expression von Connexinen und eine daduch reduzierte Ausbreitung der zellulären Letalität. Im Gegensatz zum Wildtyp bleibt im KO-Herzen die Pumpfunktion erhalten und es entwickelt sich keine kompensatorische Hypertrophie. Die Induktion der **CAR-Expression** bei kardialen Erkrankungen ist demnach Teil des Pathomechanismus und nicht des Heilungsprozesses.

Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen, dass die Expression von CAR für die Entwicklung und Funktion des Herzens von großer Bedeutung ist. Auf den Verlauf von Herzerkrankungen wirkt CAR dagegen negativ. In anderen Geweben scheint CAR eine untergeordnete Rolle zu spielen. Entsprechend bietet CAR einen Angriffspunkt für mögliche Therapieansätze zur Behandlung von inflammatorischen, ischämischen und dilatativen Herzerkrankungen, die es in Zukunft zu entwickeln gilt.

2 Summary

The Coxsackievirus- and Adenovirus-Receptor (CAR) is a multifunctional protein that localizes to the tight junctions of epithelial cells and to the intercalated discs between cardiomyocytes. Via its extracellular domain CAR mediates the binding and internalization of Coxsackie- and Adenoviruses as well as homophilic and heterophilic interactions with other cells. The cytoplasmic tail links CAR to intracellular signaling cascades and the cytoskeleton. CAR is highly expressed in the developing and diseased heart. This suggests a role of CAR in cardiac remodeling. This study adresses the function of CAR in embryonic development and cardiac diseases.

Expression of CAR exclusively in the heart is sufficient to rescue the otherwise embryonic lethal CAR-KO phenotype. This indicates an essential role for CAR in the developing heart, but not in other organs. There were no species-specific differences in the cellular function of mouse versus chicken CAR with normal cardiac function of the rescue animals. Nevertheless, chicken CAR does not mediate virus entry so that rescue hearts are protected from myocarditis. In an experimental model of myocardial infarction, deletion of CAR improves survival. This likely relates to the reduced spread of injury secondary to a differential expression of connexins. Unlike WT animals, the KO maintains proper cardiac function and does not become hypertrophic. Hence, the up-regulation of CAR in the diseased heart contributes to the pathomechanism and does not support the healing process.

The data presented here suggests an important role of CAR in cardiac development. This is contrary to the negative impact of CAR on the progression of cardiac diseases. In other tissues CAR seems to be less relevant. Thus, CAR is a suitable therapeutic target towards the improved future treatment of cardiac inflammation, ischemia and dilated cardiomyopathy.

3 Einleitung

3.1 Das Herz- Kreislaufsystem

Das Herz- Kreislaufsystem umfasst das Herz als zentrales Organ sowie die Gefäße des Körper- und Lungenkreislaufs. Es dient dem Transport von Atemgasen, Nährund Abfallstoffen. Damit ist es essentiell für die Versorgung aller Organe und die Aufrechterhaltung sämtlicher Körperfunktionen.

3.1.1 Die Morphologie des Herzens

Das Herz (Cor) ist ein Hohlmuskel, welcher sich in Vertebraten im vorderen Brustkorb, überwiegend links der Mittellinie, befindet. Das Herz gliedert sich in eine rechte und linke Herzhälfte, die durch das Septum (Septum interventriculare) voneinander getrennt sind. Jede Herzhälfte besteht aus einem Vorhof und einer Herzkammer, welche jeweils durch eine segelförmige Herzklappe funktionell voneinander separiert sind. Das rechte Atrium (Atrium dextrum) wird durch die Trikuspidalklappe (Valva tricuspidalis) vom rechten Ventrikel (Ventriculus dexter) getrennt, das linke Atrium (Atrium sinistrum) durch die Mitralklappe (Valva mitralis) vom linken Ventrikel (Ventriculus sinister) (Abbildung 1). Durch diese Segelklappen kann das Blut nur in Richtung der Ventrikel fließen. Sehnenfäden zwischen den Klappen und dem Papillarmuskel im Ventrikel verhindern zudem, dass die Segel nicht in die Vorhöfe durchschlagen. Am Herzausgang, also am Abgang der großen Arterien, befinden sich Taschenklappen, die ein Zurückströmen des Blutes in die Ventrikel verhindern. Am Übergang des rechten Atriums zur Truncus pulmonalis befinden sich die Pulmonalklappen (Valva trunci pulmonalis), am Übergang des linken Atriums zur Aorta die Aortenklappen (Valva aortea) (Thomas et al., 1990; Waldever, 2002).



Abbildung 1: Das Herz

Das Herz ist durch das Septum in eine rechte und linke Herzhälfte unterteilt. Jede Herzhälfte besteht aus Atrium und Ventrikel, die durch Segelklappen (*Trikuspidalis bzw. Mitralis*) voneinander getrennt sind. Am Übergang des linken Ventrikels zur Aorta befinden sich die Aortenklappen (*Valva aortea*), am Übergang des rechten Ventrikels zur *A. pulmonalis* die Pulmonalklappen (*Valva trunci pulmonalis*). Aus C. Thomas, Grundlagen der klinischen Medizin, Schattauer 1990.

3.1.2 Der Blutkreislauf

Das Kreislaufsystem besteht aus zwei hintereinandergeschalteten Teilkreisläufen: dem Körperkreislauf und dem Lungenkreislauf. Das Herz verbindet beide Kreisläufe und treibt diese durch seine Pumpfunktion an. Im Lungenkreislauf pumpt die rechte Herzhälfte das Blut über den *Truncus pulmonalis*, welcher sich in die *Arteria pulmonalis dextra* und *sinistra* verzweigt, in die Lungen. Das sauerstoffarme Blut nimmt hier Sauerstoff auf und gibt Kohlendioxid ab. Das mit Sauerstoff angereicherte Blut gelangt durch die Lungenvenen, *Venea pulmonalis*, über den linken Vorhof in den linken Ventrikel. Dieser pumpt das sauerstoffreiche Blut über die Aorta in den Körperkreislauf. Das venöse Blut des Körpers wird anschließend über die obere und untere Hohlvene, *Vena cava superior* und *inferior*, wieder in die rechte Herzhälfte geleitet (Duale Reihe Physiologie, 2010).

3.1.3 Die Blutversorgung des Herzens

Der Sauerstoffbedarf des Herzens ist sehr hoch und entspricht in körperlicher Ruhe etwa 10% des Gesamtsauerstoffbedarfs des Körpers, obwohl es nur etwa 0,5% des Körpergewichts stellt. Um das Herz ausreichend mit Sauerstoff und Nährstoffen zu versorgen, gibt es zwei Herzkranzgefäße, die direkt von der Aorta oberhalb der Aortenklappen abgehen. Die linke Herzkranzarterie (*A. coronaria sinistra*) teilt sich in den *Ramus interventricularis anterior* (RIVA) und den *Ramus circumfelxus* (RCX). Der RIVA erstreckt sich von der vorderen Interventrikulargrube bis zur Herzspitze und versorgt überwiegend die linke Kammervorderwand und das Septum. Der RCX verläuft zwischen dem linken Vorhof und Ventrikel zur Herzhinterwand und versorgt überwiegend die Seiten- und Hinterwand des linken Ventrikels. Die rechte Herzkranzarterie (*A. coronaria dextra*) verläuft zwischen rechtem Vorhof und Ventrikel zur Herzhinterwand und steigt dort zur Herzspitze ab. Die rechte Herzkranzarterie versorgt den gesamten rechten Ventrikel sowie hintere Anteile des Septums (Thomas et al., 1990; Waldeyer, 2002).



Abbildung 2: Blutversorgung des Herzens.

Die Blutversorgung des Herzens erfolgt über die zwei Herzkranzarterien. Die linke Herzkranzarterie (*A. coronaria sinistra*) teilt sich in den *Ramus interventricularis anterior*, welcher überwiegend die linke Kammervorderwand und das Septum versorgt, und den *Ramus circumflexus*, der die Seiten- und Hinterwand des linken Ventrikels versorgt. Die rechte Kranzaterie (*A. coronaria dextra*) versorgt den gesamten rechten Ventrikel sowie die hinteren Anteile des Septums. Adaptiert von C. Thomas, Grundlagen der klinischen Medizin, Schattauer 1990.

3.1.4 Der Herzzyklus

Herzzyklus wird Kontraktions-(Systole) Im zwischen einer und einer Entspannungsphase (Diastole) unterschieden, wobei etwa zwei Drittel der Gesamtdauer auf die Diastole entfallen. Während der Systole erfolgt die elektrische Erregung der Ventrikel und die Kammern beginnen zu kontrahieren. Übersteigt der Ventrikeldruck den Vorhofdruck schließen sich die Klappen zwischen Atrien und Ventrikel. Durch die anschließende Kontraktion des Ventrikels kommt es dort zu einem Druckanstieg. Überschreitet der Ventrikeldruck den Druck in der Abflussbahn (Aorta bzw. truncus pulmonaris) öffnen sich die Taschenklappen und das Blut gelangt in den Körper- bzw. in den Lungenkreislauf. Während der Kontraktion wird die Ventrikelebene in Richtung der Herzspitze gezogen. Dadurch entsteht ein Sog in den Vorhöfen, der das Blut aus den herznahen Venen in die Vorhöfe fließen lässt. Während der Diastole sinkt der Ventrikeldruck unter den Druck in der Ausflussbahn und die Taschenklappen schließen sich wieder. Nun sind alle Kammern geschlossen und das Myokard erschlafft. Sinkt der Ventrikeldruck nun unter den Vorhofdruck, öffnen sich die Segelklappen wieder und das Blut strömt in die Kammern. Am Ende der Füllungsphase kontrahieren die Atrien, um das in ihnen enthaltene Blutvolumen vollständig in die Kammern zu pumpen. Mit dem Schluss der Segelklappen beginnt der nächste Herzzyklus (Duale Reihe Physiologie, 2010).

3.1.5 Der Aufbau und die Funktion des Erregungsleitungssystems

Das Myokard kann, im Gegensatz zu Skelettmuskeln, selbständig Erregungen bilden und fortleiten. Die vegetativen Herznerven Sympathikus und Parasympathikus haben auf das autonome Erregungsbildungs- und -leitungssystem des Herzens nur modulierenden Einfluss.

Die Erregungen des Herzens werden im Sinusknoten, einem Geflecht spezifischer Herzmuskelfasern, durch eine spontane Depolarisation gebildet. Der Sinusknoten befindet sich im rechten Vorhof, neben der Einmündung der oberen Hohlvene. Von dort breitet sich das Aktionspotential über das Vorhofmyokard beider Atrien aus und erreicht schließlich den AV-Knoten, welcher sich auf der rechten Seite des Vorhofseptums, an der Grenze zwischen Atrium und Ventrikel befindet. Die Atrien und die Ventrikel sind elektrisch durch die bindegewebshaltige Ventilebene voneinander getrennt. Nur über das vom AV-Knoten ausgehende His-Bündel kann die Erregung auf die Kammern übergeleitet werden. Das His-Bündel verläuft im Ventrikelseptum Richtung Herzspitze und teilt sich dann auf die beiden Kammern auf. Die anschließenden Verzweigungen der His-Bündel leiten als Purkinje-Fasern die Erregung in die Innenschicht der Ventrikelmuskulatur. Da die Zellen des Myokards über zahlreiche g*ap junctions* miteinander verbunden sind, breitet sich die Erregung gleichmäßig über die Herzkammern aus (Thomas et al., 1990; Duale Reihe Physiologie, 2010).

3.1.6 Das Elektrokardiogramm

Die Erfassung von Rhythmus und Frequenz des Herzschlages werden im Elektrokardiogramm (EKG) dargestellt. Im EKG lassen sich typische Phasen unterscheiden. welche die elektrische Aktivierung einzelner Herzbereiche wiederspiegeln. Die Erregungsausbreitung über die Vorhöfe ist als P-Welle sichtbar. Sind die Vorhöfe vollständig erregt, ist keine Potentialdifferenz mehr messbar, Ende der P-Welle wieder die Nulllinie weshalb am erreicht wird. Die Erregungsausbreitung über die Herzkammern entspricht dem QRS-Komplex. Zunächst werden Teile des Septums erregt, was als Q-Zacke sichtbar wird. Die nachfolgende R-Zacke bildet die Erregung der Herzmuskulatur von endo- nach epikardial, von der Herzbasis Richtung Herzspitze, ab. Zum Schluss wird die Basis des linken Ventrikels depolarisiert, was im EKG der S-Zacke entspricht. Die Repolarisation der Atrien erfolgt zeitgleich mit der Depolarisation der Ventrikel und ist daher nicht im EKG sichtbar. Während der ST-Strecke sind die Ventrikel voll erregt. Das EKG verläuft während dieser Phase entsprechend isoelektrisch. Die Repolarisation der Ventrikel ist als T-Welle erkennbar (Duale Reihe Physiologie, 2010).



Abbildung 3: Komponenten des Oberflächen-EKGs.

Die P-Welle entspricht der Erregungsausbreitung über die Vorhöfe. Der QRS-Komplex zeigt die Erregung der Herzkammern an. Die T-Welle repräsentiert die Repolarisation der Ventrikel. Das PQ-Intervall ist die Ausbreitungszeit der Erregung von den Vorhöfen zu den Herzkammern (atrio-ventrikulär). Die QT-Zeit entspricht der gesamten, intraventrikulären Erregungsdauer.

3.1.7 Die Prävalenz kardiovaskulärer Erkrankungen

Weltweit zählen kardiovaskuläre Erkrankungen mit 31% zu den häufigsten Todesursachen. In den Industrieländern liegt die Anzahl der Menschen, die an einer Herz-Kreislauf-Erkrankung sterben, noch deutlich höher. In Europa betrifft dies statistisch jeden zweiten Menschen. Ischämische Herzkrankheiten sind dabei am häufigsten vertreten (24%), gefolgt von zerebrovaskulären Erkrankungen (14%), Erkrankungen aufgrund von Bluthochdruck (3%) und inflammatorischen Herzerkrankungen (1%) (WHO, 2008).



Abbildung 4: Todesursachen in Europa.

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind für 50% der Todesfälle in Europa verantwortlich. Die anderen 50% sind auf Krebs (21%), andere nicht übertragbare Krankheiten (16%), Unfälle (7%) und übertragbare Krankheiten (6%) zurückzuführen. Die kardiovaskulären Erkrankungen lassen sich weiter in ischämische (25%), zerebrovaskuläre (14%), hypertonische (3%), inflammatorische (1%) und andere (8%) unterteilen (WHO, 2012).

In den vergangenen Jahrzenten wurde die Gesundheitssituation in Europa signifikant verbessert. Dies führte unter anderem dazu, dass die Verbreitung und Mortalität übertragbarer Krankheiten gesunken ist. Durch die gute medizinische Versorgung leben die Menschen in Europa länger und gesünder als jemals zuvor. Die durchschnittliche Lebenserwartung in Europa ist derzeit auf 76 Jahre gestiegen. 2010 betrug der Anteil der über 65 Jährigen 15% der Gesamtbevölkerung Europas. Diese Altersgruppe ist die am schnellsten wachsende und wird Schätzungen zufolge bis 2050 25% der Bevölkerung ausmachen. Durch das Altern der europäischen Gesellschaft hat sich die Prävalenz bestimmter Krankheiten verändert. Da das Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen mit steigendem Alter zunimmt, treten diese Krankheiten heute entsprechend häufiger auf und sind inzwischen für 50% der

Todesfälle in Europa verantwortlich. Aber auch in der Altersgruppe der unter 65 Jährigen sind kardiovaskuläre Erkrankungen die häufigste Todesursache (WHO, 2012). Die demographischen und epidemiologischen Veränderungen erfordern deshalb die Anpassungen des Gesundheitssystems, um in Zukunft eine bessere Vorbeugung und Behandlung gewährleisten zu können.

3.2 Der Coxsackievirus- und Adenovirus-Rezeptor (CAR)

Der Coxsackievirus- und Adenovirus-Rezeptor (CAR) wurde erstmals 1997 als Rezeptor für Typ B Coxsackieviren (CVB) und Adenoviren des Subgenus C beschrieben (Bergelson et al., 1997; Carson et al., 1997; Tomko et al., 1997). Die physiologische Rolle von CAR besteht jedoch in der Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten, durch homo- und heterophile Interaktionen der extrazellulären Immunglobulin–ähnlichen (Ig) Domänen (Cohen et al., 2001; Honda et al., 2000). Der C-terminale, intrazelluläre Teil ist zudem mit dem Zytoskelett verbunden und in Signalübertragungsprozesse innerhalb der Zelle involviert (Fok et al., 2007; Huang et al., 2007; Lim et al., 2008; Sollerbrant et al., 2003).

In seiner Rolle als viraler Rezeptor spielt CAR eine wichtige Rolle bei inflammatorischen Herzkrankheiten (Kühl et al., 2005; Shi et al., 2009). Durch seine physiologischen Eigenschaften ist CAR essentiell für die kardiale Entwicklung und Funktion (Asher et al., 2005; Chen et al., 2006; Lim et al., 2008; Lisewski et al., 2008). Die Rolle von CAR während kardialer Umstrukturierungsprozesse, wie sie in der Embryonalentwicklung aber auch bei einer Erkrankung des Herzens stattfinden, ist in Anbetracht einer steigenden Prävalenz kardiovaskulärer Erkrankungen in der Gesellschaft von besonderem Interesse.

3.2.1 Das CAR-Gen und die CAR-Spleißvarianten

Das humane *CAR* befindet sich auf Chromosom 21, das der Maus auf Chromosom 16 (Bowles et al., 1999; Chen et al., 2003). In beiden Organismen besteht *CAR* aus 8 Exons mit ähnlichen Intron-Exon-Grenzen (Bergelson et al., 1998; Excoffon et al., 2010). Die Exons 1 bis 5 kodieren für den extrazellulären Bereich, wobei in Exon 1 das Signalpeptid enthalten ist, welches im Laufe der Proteinreifung abgespalten wird. Die Exons 2 und 3 kodieren die erste Immunglobulin-ähnliche-Domäne, Exon 4 und 5 die zweite. Im sechsten Exon ist die

Sequenz für die Transmembranregion enthalten. Die Exons 7 und 8 kodieren für den zytoplasmatischen Bereich des CAR-Proteins. Durch alternatives Spleißen können verschiedene CAR-Isoformen entstehen. CAR 1 und CAR 2 wurden sowohl im Maus beschrieben. Beide Menschen. als auch in der Isoformen sind membranständig und unterscheiden sich nur in der zytoplasmatischen Domäne. Eine weitere membranständige Isoform (CAR 3) wurde nach Seguenzanalysen des murinen CAR beschrieben, jedoch noch nicht experimentell bestätigt (Chen et al., 2003). Außerdem gibt es drei lösliche CAR-Isoformen (Chen et al., 2003; Dorner et al., 2004; Thoelen et al., 2001). Den löslichen CAR-Varianten fehlt das Exon 6, welches für die Transmembrandomäne kodiert. Sie entstehen durch ein Zusammenfügen von Exon 4 mit Exon 7 (CAR 4/7), Exon 3 mit Exon 7 (CAR 3/7) bzw. Exon 2 mit Exon 7 (CAR 2/7). Der C-terminale Abschnitt der löslichen CAR-Isoformen weicht, durch eine Leserahmenverschiebung während des Spleißens, von den membranständigen CAR-Varianten ab. Lösliches CAR wurde in Pleuralsekret von Patienten mit malignen Atemwegserkrankungen nachgewiesen (Bernal et al., 2002). Die Expression und Funktion der löslichen CAR-Rezeptorformen sind jedoch nur unzureichend charakterisiert. CVB3-Infektionen von HeLa-Zellen zeigen, dass die lösliche Rezeptorform sowohl die extrazelluläre Domäne von CAR auf der Zelloberfläche, als auch das CVB3-Kapsid bindet (Dorner et al., 2004). Die Relevanz von löslichem CAR in vivo wird durch den milderen Verlauf von Pankreatitis sowie Myokarditis nach CVB3-Infektion belegt (Dorner et al., 2006; Yanagawa et al., 2004). Damit scheint lösliches CAR durch seine antiviralen Eigenschaften eine protektive Rolle im Organismus zu übernehmen.

Der Transkriptionsstart des humanen CAR wurde bei ungefähr 420 Nukleotiden vor dem ATG lokalisiert (Bowles et al., 1999). RT-PCR-Analysen des murinen CAR besagen, dass die Transkription 141 bis 161 Nukleotide vor dem ATG-Translationsstart beginnt. Obwohl in dieser Region keine TATA-Sequenz gefunden wurde, konnten mehrere potentielle Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren sowie eine mögliche Promotorregion, 121 bis 378 Nukleotide vor dem Translationsstart, mittels Computeranalysen nachgewiesen werden (Chen et al., 2003).



Abbildung 5: Die CAR-Genstruktur und Spleißvarianten.

(A) CAR besteht aus 8 Exons (A). Die Exons 1 bis 6 kodieren den extrazellulären Abschnitt des CAR-Proteins. Das Signalpeptid wird im ersten Exon kodiert. Exon 2 bis 5 kodieren den extrazellulären Bereich mit den zwei Immunglobulin-ähnlichen Domänen. Die Transmembranregion (TM-Region) ist im sechsten Exon enthalten. Exon 7 und 8 kodieren die Sequenz für den C-terminalen, intrazellulären Proteinbereich (B). Durch alternatives Spleißen entstehen drei verschiedene membranständige (C) und drei lösliche CAR-Isoformen (D). Nach Chen et al., 2003; Dorner et al., 2004.

3.2.2 Die CAR-Proteinstruktur

CAR ist ein Typ 1 Transmembranprotein. Es besteht aus einem N-terminalen Signalpeptid, zwei extrazellulären Ig-Domänen, einer Transmembranregion, sowie einem intrazellulären Bereich (Wang et al., 1999). Die *CAR*-cDNA kodiert für ein 365 Aminosäuren (AS) langes Protein.

Das Signalpeptid von 19 Aminosäuren wird im Laufe der Proteinreifung abgespalten. Der extrazelluläre Bereich ist 216 Aminosäuren lang und besteht aus den beiden Immunglobulin-ähnlichen Domänen D1 und D2. Entsprechend wird CAR zur Immunglobulin-Superfamilie (IgSF) gezählt. Die D1-Domäne entspricht einer typischen v-Ig-Domäne mit β -Faltblattstruktur. Sie ist für die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten, homo- sowie heterophiler Interaktionen, als auch für die Bindung von Coxsackie- und Adenoviren, von Bedeutung (Bewley et al., 1999; van Raaij et al., 2000; He et al., 2001; Patzke et al., 2010). Die D2-Domäne hat eine außergewöhnliche C2-artige Ig-Domänenstruktur mit zwei β -Faltblättern, die jeweils aus 3 antiparallelen Strängen bestehen. Zwei Disulfidbrücken stabilisieren diese Struktur. Ein relativ hydrophober Strang könnte an der Bindung möglicher Interaktionspartner beteiligt sein (He et al., 2001; Hung and Sheng, 2002, 2002; Jiang and Caffrey, 2005; Patzke et al., 2010). Beide Domänen weisen potentielle N-Glykosylierungsstellen auf (Asn 106 und Asn 201). Veränderungen in dem Glykosylierungsmuster haben keine Auswirkung auf die subzelluläre Rezeptorlokalisation. Allerdings beeinflusst besonders die Glykosylierung der D2-Domäne die adenovirale Bindung und Infektion (Excoffon et al., 2007).

Die Transmembranregion besteht aus 23 AS und trennt den extrazellulären Bereich von der intrazellulären Domäne. Diese ist je nach Spleißvariante 107 oder 94 AS lang. Der zytoplasmatische Bereich von CAR beinhaltet mehrere Phosphorylierungsstellen sowie zwei Palmitoylierungsstellen (C259 und C260) in der Nähe der Transmembranregion. Die Palmitoylierung von CAR ist wichtig für die Verankerung in der Membran. Ein Austausch der entsprechenden Cysteine in den Palmitoylierungsstellen führt zu einer Anreicherung von CAR im perinukleären Bereich (Excoffon et al., 2005). Am C-Terminus befindet sich ein PDZ-Domänen-Bindemotiv. Das Motiv X-S/T-X-V (wobei X eine beliebige Aminosäure sein kann) repräsentiert die Klasse 1 der PDZ-Bindungsmotive für Interaktionen mit PDZ-Domänen-Proteinen (Sheng and Sala, 2001). Beide Isoformen enthalten ein PDZ-Bindemotiv: CAR 1 (-SIV) und CAR 2 (-TTV) (Excoffon et al., 2004). Die 346 AS von CAR 1 entsprechen einem Molekulargewicht von 38 kDa.

Tatsächlich wurde CAR als ein 46 kDa Protein isoliert. Die erhöhte molekulare Masse von CAR wird durch die Glykosylierung der Asparaginsäuren in der D1- und D2-Domäne verursacht (Excoffon et al., 2007; Honda et al., 2000).

3.2.3 Die Lokalisation von CAR und seine Interaktionspartner

CAR wurde durch unterschiedliche Techniken unter anderem im Herzen, Pankreas, Gehirn, Lunge, Leber, Niere, Prostata und Testis nachgewiesen (Bergelson et al., 1997; Fechner et al., 1999; Honda et al., 2000; Mirza et al., 2006; Shi et al., 2009; Tomko et al., 1997; Wang et al., 2007). In polarisierten Epithelzellen ist CAR Bestandteil der *tight junctions* (Cohen et al., 2001). Auch in nicht polarisierten Zellen ist CAR an den Zell-Zell-Kontakten lokalisiert. Im Herzen ist CAR in den Glanzstreifen zu finden (Noutsias et al., 2001).

Die Coxsackie- und Adenoviren waren die ersten bekannten Interaktionspartner von CAR. In seiner natürlichen Funktion vermittelt CAR, wie viele andere Proteine der IgSF, die Aggregation von Zellen (Cohen et al., 2001; Honda et al., 2000). CAR bildet durch Interaktion der Ig-Domänen Homodimere (Hung and Sheng, 2002; Jiang et al., 2004). Beide Ig-Domänen sind essenziell für diese Interaktion (Excoffon et al., 2005; Patzke et al., 2010). Hauptsächlich findet die Bildung der Homodimere jedoch über Aminosäuresequenzen in hochkonservierte der D1-Domäne statt. Röntgenstrukturanalysen haben ergeben, dass die beiden D1-Domänen benachbarter CAR-Moleküle eine Bindung miteinander eingehen. (Patzke et al., 2010; van Raaij et al., 2000). Die Interaktion mit dem Junctional Adhesion Molecule-Like Protein (JAML), ebenfalls ein Mitglied der IgSF, erfolgt über die N-terminalen D1-Domänen beider Proteine (Verdino et al., 2010). Dabei werden ähnliche Bindungsstellen verwendet, wie bei der CAR-CAR-Interaktion (van Raaij et al., 2000). Über die extrazellulären Ig-Domänen bildet CAR auch Heterodimere mit dem Junctional Adhesion Molecule 3 (JAM-3) (Luissint et al., 2008).

Für die Bindung des Adenovirus werden ähnliche Bereiche in der D1-Domäne von CAR verwendet, wie für die Interaktion mit anderen CAR-Molekülen oder JAML (Bewley et al., 1999). Die Bindung des Coxsackievirus B3 erfolgt ebenfalls über die D1-Domäne, die beteiligten Aminosäuren unterscheiden sich jedoch (He et al., 2001).

Neben der Interaktion mit anderen Zelladhäsionsproteinen und Viren interagiert die extrazelluläre Domäne von CAR mit den Glykoproteinen der extrazellulären Matrix Laminin-1, Tenascin-R und Fibronectin (Patzke et al., 2010).

Über das PDZ-Domänen-Bindemotiv im intrazellulären Bereich interagiert CAR mit den PDZ-Domänen von Zona Occludines 1 (ZO-1), Multi-PDZ Domain Protein 1 (MUPP1) und der membranassoziierten Guanylatkinase 1b (MAGI-1b) (Coyne et al., 2004; Excoffon et al., 2004). Eine Interaktion mit ZO-1 wurde durch Kolokalisation und Immunpräzipitation nachgewiesen. ZO-1 ist ein zentrales Strukturprotein der *tight junctions*. Es fungiert als intrazelluläres Gerüstprotein und verbindet transmembrane Rezeptorproteine mit den Komponenten des Zytoskeletts und intrazellulären Signalmolekülen (Cohen et al., 2001; Fanning et al., 2002). Innerhalb der *tight junctions* interagiert ZO-1 direkt mit Occludin (Fanning et al., 1998) und Claudin (Itoh et al., 1999) ebenso wie mit JAM (Bazzoni et al., 2000). Die Interaktion von CAR mit MUPP-1 wurde durch einen y*east two hybrid screen* nachgewiesen. MUPP-1 interagiert ebenfalls mit Claudin, welches auch ein *tight junction* Protein ist (Coyne et al., 2004). Durch die Interaktion mit MAGI-1b steht CAR außerdem in Verbindung mit α -Aktinin 4 und β -Catenin. Zwischen CAR und β -Catenin besteht allerdings auch eine direkte Interaktion (Coyne et al., 2004). Außerdem interagiert CAR mit den Zytoskelettproteinen Tubulin und Aktin (Fok et al., 2007; Huang et al., 2007). Somit interagiert CAR innerhalb der *tight junctions* mit einer Vielzahl von Proteinen und stellt Verbindungen zum Zytoskelett her.



Abbildung 6: Interaktionen von CAR.

CAR lokalisiert an Zell-Zell-Kontakten. Dort bildet es Dimere mit anderen CAR-Proteinen benachbarter Zellen oder anderen Proteinen der IgSF. Als Rezeptor u.a. für Coxsackieviren des Typ B (CVB) ist CAR an der Virusaufnahme beteiligt. CAR Interagiert auch mit Proteinen der extrazellulären Matrix (ECM). Außerdem bildet CAR einen Komplex mit dem *gap junction*-Protein Connexin 45 (CX45). Über das intrazelluläre PDZ-Domänen-Bindemotiv interagiert CAR mit einer Vielzahl von Proteinen, die an Signalprozessen und an der Organisation des Zytoskeletts beteiligt sind.

Ein weiterer Interaktionspartner von CAR ist Connexin 45 (CX45), das durch die Bildung von *gap junctions* an der Zell-Zell-Kommunikation benachbarter Zellen beteiligt ist (Lim et al., 2008). Ausserdem interagiert CAR mit Protein Interacting with Protein C Kinase (PICK), welches als Adaptor zwischen Transmembranrezeptoren und der Proteinkinase C fungiert. Die Interaktion von CAR mit Ligand of Numb Protein-X (LNX) assoziiert CAR über das Protein Numb mit dem Notch-Signalweg (Lim et al., 2008; Sollerbrant et al., 2003). Außerdem besteht eine Interaktion mit dem neuronal exprimierten Protein Postsynaptic Density 95 (PSD 95) (Excoffon et al., 2004).

3.2.4 Die Regulation der CAR-Expression

Die Expression von CAR ist während der Entwicklung stark reguliert (Fechner et al., 2003; Honda et al., 2000; Kashimura et al., 2004). Ab dem siebenten Tag der Embryonalentwicklung (E7) ist CAR in der Maus nachweisbar (Asher et al., 2005; Hotta et al., 2003). Während der pränatalen Entwicklung ist die Expression im Herzen, im Skelettmuskel und im Gehirn besonders hoch. In Mäusen und Ratten sind große Mengen des Proteins im embryonalen Herzen vorhanden, wohingegen die Expression im adulten Organ deutlich geringer ist. Dabei beginnt die Reduktion von CAR ab einer Woche nach der Geburt (Fechner et al., 2003; Ito et al., 2000; Kashimura et al., 2004). Das Expressionsprofil im Menschen ist ähnlich (Noutsias et al., 2001). Im Skelettmuskel nimmt die Menge der CAR-mRNA direkt nach der Geburt drastisch ab (Fechner et al., 2003). Das Expressionsniveau im Gehirn ist mit dem im Herzen vergleichbar (Fechner et al., 2003; Honda et al., 2000; Hotta et al., 2003; Nalbantoglu et al., 1999). Außerdem ist die CAR-Expression abhängig von der Zelldichte. So exprimieren neonatale Kardiomyozyten der Ratte deutlich mehr CAR, wenn sie in geringer Dichte kultiviert werden (Fechner et al., 2003).

Neben der Regulation in der Entwicklung ist CAR auch in verschiedenen Krankheitsmodellen reguliert. In einem Muskeldystrophie-Mausmodell kam es zu einer Induktion von CAR im regenerierenden Skelettmuskel (Nalbantoglu et al., 1999). Auch verschiedene kardiale Erkrankungen führen zu einer Induktion von CAR. Nach induzierter Autoimmunmyokarditis war die Menge der CAR-mRNA und des Proteins erhöht. In diesem Zusammenhang wurde auch eine Aktivierung von CAR in kultivierten Kardiomyozyten durch Zytokine beobachtet (Ito et al., 2000). In einem Infarktmodell der Ratte war CAR im Randbereich des Infarkts hochreguliert (Fechner et al., 2003). In Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie wurde eine erhöhte Expression von CAR immunohistochemisch nachgewiesen (Noutsias et al., 2001).

Die Erkenntnisse über die Regulation von CAR während der Entwicklung und in verschiedenen kardialen Krankheitsmodellen lassen darauf schließen, dass CAR eine wichtige Funktion in der Herzentwicklung und in Umstrukturierungsprozessen adulter Herzen übernimmt.

3.2.5 Erkenntnisse aus CAR-Knockout-Mäusen

Zur Untersuchung von CAR in vivo wurden verschiedene Knockout-Mäuse (KO) generiert. Sie unterscheiden sich unter anderem darin, dass entweder das Exon 1 oder das Exon 2 deletiert wurde. Bei einer Deletion des Exons 1 kommt es zur Entfernung des einzigen Startcodons, wodurch keine der CAR-Isoformen mehr hergestellt werden kann. Die Deletion des Exons 2 führt zu einer Leserasterverschiebung, was zu einem Transkriptionsabbruch nach 75 Basen führt. Das entstandene Produkt wird als funktionslos beschrieben (Asher et al., 2005). Alle konventionellen CAR-KO-Modelle führten zur embryonalen Letalität zwischen Tag E11,5 und E13,5 (Asher et al., 2005; Chen et al., 2006; Dorner et al., 2005; Lim et al., 2008). Durch die Deletion von CAR traten vor allem Herzfehlbildungen auf. Die Embryonen wiesen kardiale Einblutung auf. Histologische und ultrastrukturelle Analysen belegten eine pathologische Entwicklung der Herzstruktur. Die KO-Herzen zeigten einen partiellen Verlust von Zell-Zell-Kontakten und Veränderungen in der Myofilamentstruktur (Asher et al., 2005; Chen et al., 2006; Dorner et al., 2005). Da es in den konventionellen KO-Mäusen überwiegend zu einem kardialen Phänotyp kam, wurden verschiedene herzspezifische CAR-KO-Mäuse generiert. Die Deletion des CAR Exons 2 durch die Troponin T (TNT) Cre-Linie führte zum gleichen Phänotyp wie der konventionelle KO (Chen et al., 2006). Nach Deletion des Exons 2 durch die Myosin Heavy Chain (MHC) Cre-Linie überlebten etwa 20% (Chen et al., 2006) bzw. alle (Lim et al., 2008) der kardialen KO-Tiere bis ins Erwachsenenalter. Die Deletion von CAR im Herzen führte zu einer Störung der Reizweiterleitung von den Atrien zu den Ventrikeln (AV-Block) (Lim et al., 2008). Die Entfernung des CAR Exons 1 durch die MHC-Cre wiederum führte zur Letalität aller Embryonen. Daher wurden induzierbare CAR-KO-Tiere durch die Verwendung der MerCreMer unter Kontrolle des MHC-Promotors erzeugt. Auch in diesen Tieren kam es zu einem AV-Block (Lisewski et al., 2008).

Aus den Erkenntnissen der verschiedenen Mausstämme ergibt sich eine wichtige Funktion von CAR in der kardialen Entwicklung und Funktion. Allerdings kommt es bereits bei geringen Unterschieden in den Mausmodellen zu unterschiedlich stark ausgeprägten Phänotypen.

Durch verschiedene organspezifische KO-Tiere wurde auch die wichtige Rolle von CAR in der Vermittlung einer CVB3-Infektion nachgewiesen. Nach Deletion von CAR durch eine Herz- bzw. Pankreasspezifische Cre-Linie ist das entsprechende Organ vor einer Coxsackievirus-Infektion geschützt. Dies hat allerdings keine Auswirkungen auf den Infektionsverlauf in anderen Organen (Kallewaard et al., 2009; Shi et al., 2009).

3.3 CAR bei Herzerkrankungen

3.3.1 Herzrhythmusstörung

Herzrhythmusstörungen sind Abweichungen vom regelmäßigen Herzschlag. Diese können verschiedene Ursachen haben und die Erregungsbildung und –ausbreitung betreffen. Solche Abweichungen werden durch eine Ableitung der elektrischen Erregung im Elektrokardiogramm (EKG) dargestellt.

Als Bestandteil der Glanzstreifen ist CAR an einer korrekten elektrischen Reizweiterleitung beteiligt. Nach Ausschalten von CAR im Herzen adulter Mäuse ist die Reizweiterleitung von den Atrien zu den Ventrikeln gestört (AV-Block). Der Grad des AV-Blocks steigt mit der Zeit nach Ausschaltung von *CAR*. Nach 4 Wochen zeigen ca. 40% der Tiere einen AV-Block dritten Grades. Die Deletion von CAR führt zu einer Reduktion der *gap junction*-Proteine Connexin 43 und Connexin 45 (Lim et al., 2008; Lisewski et al., 2008).

Zudem besteht ein Zusammenhang zwischen einer verminderten CAR-Expression und ventrikulärer Fibrillation. In einer genomweiten Studie mit Biopsien von Patienten, die eine ventrikuläre Fibrillation nach einem Myokardinfarkt entwickelten, wurde eine genetische Variation im Bereich vor dem *CAR*-Gen identifiziert. Diese hatte eine Reduktion der CAR-Expression zur Folge (Bezzina et al., 2010).

3.3.2 Myokardinfarkt

den Industrienationen sind Herz-Kreislauf-Erkrankungen häufigste In die Todesursache. Darunter treten koronare Herzkrankheiten in chronischer und akuter Form (Myokardinfarkt) besonders oft auf. Am häufigsten ist dabei die Vorderwand des linken Ventrikels betroffen (Thomas et al., 1990). Infarkte in der rechten Kammer sind im Vergleich dazu eher selten. Bei einem Myokardinfarkt kommt es aufgrund einer verengten oder verschlossenen Koronararterie zu einer unzureichenden Durchblutung des Herzmuskels. Dadurch entsteht ein Missverhältnis zwischen Sauerstoffbedarf und Sauerstoffangebot, was zu einer Schädigung des Herzgewebes führt.

Die ersten 72 Stunden nach dem Infarkt werden als frühe Phase bezeichnet. Innerhalb von 20 Minuten nach Einsetzen der Ischämie erfolgt der Zelltod der Kardiomyozyten. Dies führt zu einer Einwanderung von Makrophagen, Monozyten und Neutrophilen in die Infarktbereich (Thygesen et al., 2012). Außerdem kommt es in den ersten Stunden nach dem Tod der Kardiomyozyten zu einer Expansion der Infarktregion, wodurch die Wand des linken Ventrikels dünner wird. Assoziiert sind Veränderungen in der Randzone des Infarkts, sowie im restlichen Myokard. Die Umstrukturierungsprozesse beeinflussen die Funktion des Herzens und können zu einem Herzversagen führen.

In der späten Phase des Infarkts kommt es zu einer Hypertrophie des Herzens und zu einer zunehmenden Anlagerung von Kollagen, was auf die erhöhte Volumenbelastung des Herzens und den Verlust der Kardiomyozyten zurückzuführen ist.

In einem Herzinfarktmodell bei Ratten kommt es bereits 6 Tage nach dem Infarkt zu einer Induktion von CAR in der Infarktzone. Durch immunhistochemische Färbungen konnte auch 3 Wochen nach dem Infarkt eine deutlich höhere Expression in der Infarktregion beobachtet werden, während das umgebende Myokard kein verstärktes CAR-Signal aufwies (Fechner et al., 2003). In isolierten Kardiomyozyten der Ratte wird die CAR-Expression durch eine Zytokinbehandlung induziert (Ito et al., 2000). Auch in Patienten mit einer dilatativen Kardiomyopathie, welche als Folge eines Myokardinfarkts auftreten kann, kommt es zu einer erhöhten CAR-Expression (Noutsias et al., 2001). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass CAR eine Funktion in den Umstrukturierungsprozessen nach einem Myokardinfarkt übernimmt. Die genaue Rolle von CAR und die zugrundeliegenden Mechanismen sind jedoch unklar.

3.3.3 Myokarditis

Bei der Myokarditis handelt es sich um eine Entzündung des Myokards. Häufig entstehen Herzmuskelentzündungen durch Virusinfektionen. In bis zu 33% der Myokarditispatienten konnten Coxsackieviren des Typus B nachgewiesen werden. Sie zählen, neben dem Parvovirus B19, zu den häufigsten viralen Erregern der Myokarditis (Kühl et al., 2005).

Das Coxsackievirus B3 (CVB3) gehört zur Familie der Picornaviren. Der Name weist auf zwei Eigenschaften dieser Virusfamilie hin. Es handelt sich hierbei nämlich um kleine (pico) Viren mit einem RNA Genom. Die Coxsackieviren zählen in der Familie der Picornaviren zum Genus der Enteroviren. Des Weiteren werden die Coxsackieviren in die Subgruppen A, mit 23 Serotypen, und die Subguppe B, mit 6 Serotypen, unterteilt (Modrow et al., 2010).

Das Genom des Coxsackievirus B3 besteht aus einer einzelsträngigen RNA in Positivorientierung. Das bedeutet, dass die viralen Proteine ohne einen Zwischenschritt von der RNA translatiert werden können. Insgesamt ist das Genom 7400 Basen lang. Am 5`-Ende ist das virale Protein genomassoziiert (VPg) angelagert. Außerdem befindet sich im 5`-Bereich eine untranslatierte Region, die mit der *Internal Ribosome Entry Site* (IRES) wichtig für die Initiation der Translation ist.

Das Genom enthält nur einen einzigen Leserahmen, der für ein Polyprotein kodiert. Im aminoterminalen Bereich befinden sich die viralen Kapsidproteine VP4, VP2, VP3 und VP1, im carboxyterminalen Bereich die Nichtstrukturproteine, welche für die Virusreplikation wichtig sind (Modrow et al., 2010).



Abbildung 7: Die Coxsackievirus Genom- und Proteinstruktur.

Das Genom des Coxsackievirus besteht aus einer einzelsträngigen RNA in Positivorientierung. In der 5`-Region befindet sich das virale Protein genomassoziiert (VPg) sowie die *Internal Ribosome Entry Site* (IRES). Das 3`-Ende ist polyadenyliert. Von dem Genom wird ein einziges Polyprotein hergestellt. Aminoterminal befinden sich die Strukturproteine VP4, VP2, VP3 und VP1, welche das Kapsid bilden. Die Nichtstrukturproteine befinden sich C-terminal. Die Spaltung des Polyproteins erfolgt durch die Proteasen 3C und 2A, aber auch autoproteolytisch durch VP2 (angedeutet durch Pfeile).

Als Rezeptor für das Coxsackievirus B3 spielt CAR eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Coxsackievirus-verursachten Myokarditis (Kallewaard et al., 2009; Shi et al., 2009). Die Bindung erfolgt dabei über die D1-Region von CAR in den Canyon, einer Furche innerhalb des Coxsackievirus-Kapsids. Die Bindungsstelle ist vergleichbar mit der anderer Picornaviren. So bindet auch das Intracellular Adhesion Molecule 1 (ICAM 1) in den Canyon des Coxsackievirus A2, sowie des humanen Rhinovirus 14 und 16. Auch der Poliovirusrezeptor Cluster of Differentiation 155 (CD155) bindet das Poliovirus in dieser Region (Belnap et al., 2000; Kolatkar et al., 1999; Olson et al., 1993; Xiao et al., 2001; Xing et al., 2000). Diese Rezeptoren gehören ebenfalls zur IgSF. Diese spricht für eine hohe Koservierung in der Virus-Rezeptor-Interaktion innerhalb der Familie der Picornaviren. Durch Krvo-Elektronenmikroskopie konnten die Aminosäuren von Virus und Rezeptor ausgemacht werden, die an der Interaktion beteiligt sind. Demnach sind alle äußeren Hüllproteine des Coxsackievirus an der Interaktion beteiligt, wobei die meisten Interaktionen zwischen CAR und VP1 bestehen (He et al., 2001). Die Aminosäuren der VP1-Proteine sind zwischen den 6 Coxsackievirus B-Typen und dem Swine Vesicular Disease Virus, welches ebenfalls CAR als Rezeptor benutzt, hoch konserviert (Martino et al., 2000). Der Rezeptor interagiert überwiegend über die N-Terminale Ig-Region mit dem CVB3 (He et al., 2001). Die anderen Bereiche von CAR sind eher für die Proteinstruktur und nicht für eine direkte Bindung von Bedeutung (Excoffon et al., 2005; He et al., 2001). Der zytoplasmatische Bereich von CAR hat keinen Einfluss auf die Infektion (Wang and Bergelson, 1999).

Einige Coxsackie B-Viren binden zusätzlich an den Korezeptor Decay Accelerating Factor (DAF). Dieser ist jedoch für die Infektion von untergeordneter Rolle. In polarisierten Epithelzellen ist die Bindung an DAF vermutlich daran beteiligt das Virus zu den *tight junctions* zu lokalisieren, in denen sich CAR befindet (Shieh and Bergelson, 2002).

Nach Bindung des Virus an CAR erfolgt eine konformelle Änderung im Canyon, wodurch es zu einer festeren Bindung an die D1-Domäne kommt. Das Virus wird endozytiert. Wie es zur Freisetzung der RNA in das Zytoplasma kommt ist jedoch noch nicht vollständig geklärt (Coyne and Bergelson, 2006). Da das virale Genom in Positivorientierung vorliegt, kann es umgehend translatiert werden. Das kodierte Polyprotein wird noch während der Synthese in seine Untereinheiten gespalten. Die Protease 2A spaltet zunächst den aminoterminalen Teil mit den Strukturproteinen ab. Alle weiteren Spaltungen übernimmt die Protease 3C. Die RNA-abhängige RNA-Polymerase 3D kann dann mit der Vervielfältigung der Genome beginnen. Dazu müssen zunächst negativsträngige Zwischenprodukte synthetisiert werden, die wiederum als Vorlage für die Herstellung der positivsträngigen RNA-Genome dienen. Liegen in der Zelle ausreichend virale Proteine sowie RNA-Genome vor, lagern sich diese zu infektiösen Viruspartikeln zusammen. Dazu assemblieren sich die 4 Strukturproteine zunächst zu einer Einheit. Fünf dieser Einheiten bilden ein Pentamer und 12 Pentamere formen letztendlich das virale Kapsid. Eine Reifespaltung zwischen VP2 und VP4 führt zu einer Stabilisierung des Kapsids. Wie die RNA in das Kapsid gelangt ist nicht völlig geklärt. Die Freisetzung der Viren erfolgt dann durch eine Lyse der Wirtszelle (Modrow et al., 2010).

Der Verlauf einer viralen Myokarditis wird in drei Phasen unterteilt. Die erste Phase ist die akute Myokarditis und beschreibt die ersten drei bis vier Tage nach der Infektion. Hier kommt es zu einer Lyse der Kardiomyozyten durch das Virus. Dadurch wird das angeborene Immunsystem aktiviert. Toll–like Rezeptoren der Makrophagen und dendritischen Zellen erkennen die virale RNA, was wiederum zu einer Expression von Zytokinen wie Interleukinen, Tumor-Nekrosis-Faktoren und Interferonen führt (Andréoletti et al., 2009).

Die zweite Phase wird als subakute Myokarditis bezeichnet und umfasst den Zeitraum bis 14 Tage nach der Infektion. Hier kommt es zu einer zunehmenden Aktivierung der spezifischen Immunantwort. Antigen-präsentierende Zellen nehmen Viruspartikel auf und präsentieren Antigene über den *Major Histocombatility Complex I.* T-Helferzellen sorgen daraufhin für eine Sekretion von Zytokinen und zytotoxische T-Zellen für eine Lyse infizierter Zellen. Außerdem kommt es zu einer Reifung von B-Zellen zu Antikörper-freisetzenden Plasmazellen.

In der dritten Phase beginnt in der Regel die Ausheilung des Herzens und die zerstörten Myozyten werden durch fibröse Strukturen ersetzt. Dies kann zu einer Dilatation des Herzens führen. In 10 bis 20% der Fälle entwickelt sich eine chronische Myokarditis, bei der es weiterhin zur Einwanderung von Immunzellen und Lyse von Kardiomyozyten kommt. Oft führt dies zu einer dilatativen Kardiomyopathie (DCM). Die DCM ist einer der häufigsten Gründe für eine Herztransplantation (Dennert et al., 2008).

3.4 Zielstellung der Arbeit

CAR vermittelt die Bindung und Internalisierung von Coxsackie B-Viren und einigen Adenoviren. Die biologische Funktion von CAR besteht jedoch in der Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten über die extrazellilägen Ig-Domänen. Außerdem steht CAR über seinen zytoplasmatischen Bereich mit dem Zytoskelett und intrazellulären Signalprozessen in Verbindung.

Verschiedene Knockout-Mäuse beschreiben eine essentielle Funktion von CAR in der frühen Entwicklung des Herzens. Daher sollte überprüft werden, ob eine alleinige Expression von CAR im Herzen, zum Überleben des ansonsten embryonal letalen CAR-KO-Phänotyps führt. Dazu sollte das *CAR*-Gen aus dem Huhn herzsspezifisch in der CAR-KO-Maus exprimiert werden.

In seiner Rolle als viraler Rezeptor wird CAR für eine CVB3-Infektion des Herzens und des Pankreas benötigt. Der Pathomechanismus des Coxsackievirus B3 sollte unter Verwendung der neuen Maus näher untersucht werden. Dies ermöglicht den Verlauf einer Coxsackievirus-Infektion einschließlich der Immunreaktionen bei alleiniger Expression des gallinen CAR im Herzen zu untersuchen.

In kardialen Erkrankungen kommt es zu einer Induktion der CAR-Expression. Daher sollte die Funktion von CAR nach experimentellem Myokardinfarkt und die daraus resultierenden morphologischen, funktionellen und molekularen Veränderungen im zeitlichen Verlauf untersucht werden.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen tragen zu einem besseren Verständnis der Funktion von CAR in kardialen Umstrukturierungsprozessen bei, wie sie während der Embryonalentwicklung oder einer Erkrankung des Herzens stattfinden. Sie dienen somit als Grundlage für Therapieansätze unterschiedlicher kardialer Erkrankungen.

4 Material

4.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, falls nicht anders ausgewiesen, von Roth, GE Healthcare und Sigma-Aldrich bezogen.

4.2 Geräte

Tabelle 1: Verwendete Geräte.

Gerät	Hersteller und Typ
Absauggerät	Pharmacia, LKB-Pumpe P1
Anästhesie-Einheit	AgnTho's, Univentor 400, Stellar A30
Bioanalyzer	Agilent, Bioanalyzer 2100
Body compsition analyzer	Bruker, LF90II
Brutschrank	Haraeus, B6030
Chemilumineszenz-Detektionssystem	PeqLab, Fusion Fx7
Eckokardiographie-Gerät	Visual Sonics, Vevo2100
Einbettmaschine für Paraffinpräparate	Leica, EG 1140 H
EKG-Gerät	AD Instruments, PL3508 PowerLab 8/35
Elektronenmikroskop	Zeiss 910
Gelsystem für Agarosegele	Cosmo Bio Co, Mupid 21
Gelsystem für SDS-PAGE	Biorad, Mini-PROTEAN Tetra Cell
Homogenisator	Qiagen, Tissuelyzer II
Illumina-Gerät	Illumina, iScan
Tissue-Processor	Leica, TP1020
Inkubator für Zellkultur	Binder, APT Line CB 150
Konfokales Mikroskop	Leica, TCS SP5/Carl Zeiss, LSM 5 Pascal
Kryostat	Cryocut 3000 (Leica)
Luminex Gerät	Luminex, Luminex 200 TM
Mikrotom	Mirom coll cut HM3555
PCR-Maschine	MJ Research, PTC-225
PCR-Maschine für Real time-PCR	Applied Biosystems, 7900HT
Pipetten	Eppendorf

Gerät	Hersteller und Typ
Spannungsgerät	Biometra, 105BIO-LVD
Spektrophotometer	NanoDrop ND-1000
Stereomikroskop	Leica, MZ75
Thermoschüttler	Eppendorf, Thermomixer comfort
Tischzentrifuge	Eppendorf, Centrifuge 5415R
Transilluminator	Biometra, UVsolo
Wasserbad	Haake, DC10
Western Blot-Apparatur	BioRad, Mini Trans. Blot Cell
Zentrifuge für Well-Platten	Sigma, 4K15, Rotor: 09100

4.3 Enzyme

Tabelle 2: Verwendete Enzyme.

Enzym	Hersteller
DNasel	Qiagen
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase	Thermo scientific
Proteinase K	Merck
Restriktionsenzyme	New England Biolabs
Taq DNA Polymerase	Invitrogen

4.4 Kits

Tabelle 3: Verwendete Kits.

Kit	Hersteller
Coxsackievirus IgG ELISA Kit	Virion Serion
DNA Ligation Kit	TaKaRa
Masson Trichrome Stains-Kit	Sigma
Mouse cytokine Assay BioPlex	BioRad
MouseRef-8 v2.0 Expression BeadChip Kit	Illumina
PCR Purification Kit	Qiagen
RNA-to-cDNA Kit	Applied Biosystems
RNeasy Mini Kit	Qiagen
Plasmid Miniprep PureLink	Invitrogen
Plasmid Maxiprep PureLink HiPure	Invitrogen
RNeasy Micro Kit	Qiagen
RNA 6000 Nano Kit	Agilent
Illumina TotalPrep-96RNA Amplification Kit	Ambion
TaqMan Gene Expression Master Mix	Applied Biosystems
Thermoscript First-Strand Synthesis System	Invitrogen
Gel extraction Kit	Qiagen

4.5 Antikörper

4.5.1 Primäre Antikörper

Tabelle 4: Verwendete Primärantikörper.

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller
ACE	Kaninchen	1:200	Santa Cruz
HIF1α	Maus	1:200	BD Biosciences
CAR	Kaninchen	1:200	Santa Cruz
chCAR	Kaninchen	1:1000	AG Prof. Dr. Rathjen
GAPDH	Maus	1:5000	Calbiochem
Phospho ERK	Maus	1:1000	Millipore

4.5.2 Sekundäre Antikörper

Tabelle 5: Verwendete Sekundärantikörper.

Sekundärantikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller
Anti-Maus-IgG-HRP	Ziege	1:5000	Calbiochem
Anti-Kaninchen-IgG-HRP	Ziege	1:5000	GE Healthcare
Anti-Kaninchen-IgG-Cy3	Ziege	1:5000	Invitrogen
Anti-Maus-IgG-AP	Ziege	1:1000	Invitrogen

4.6 Oligonukleotide

4.6.1 Oligonukleotide zur Genotypisierung

Primer	Sequenz
β-Globin rev	ATGATGACCAGGATGTAGTT
CAR P1-3 fwd	CCATGCACAGGGTGATCTG
CAR P1-3 rev	TGAGACTAAAAACCAGCAGCTTC
CAR P1-5 fwd	AACCTAGCCATTCAAAAAGAAGG
chCAR 454 rev	GCATTTAGTGCTTGCTGGCT
Cre1200	GTAGTTATTCGGATCATCAGCTACAC
Cre800	GCTGCCACGACCAAGTGACAGCAATG

Tabelle 6: Verwendete Genotypisierungsprimer.

In 5` - 3`Orientierung, rev: reverse; fwd: forward

4.6.2 Oligonukleotide zur Klonierung

Tabelle 7: Verwendete Primer zur Klonierung.

Primer	Sequenz
chCAR Notl fwd	ATAGCGGCCGCTATGGAACC
chCAR pA Notl rev	ATATGGCGGCCGCTCTAGAG

In 5` - 3`Orientierung, rev: reverse; fwd: forward

4.6.3 Oligonukleotide zur real-time PCR

Primer und Sonden	Sequenz
18S RNA fwd	CGCCGCTAGAGGTGAAATTC
18S RNA rev	TGGGCAAATGCTTTCGCTC
18S RNA-Sonde	6-FAM-TGGACCGGCGCAAGACGGAC-TAMRA
CAR fwd	ACTTTGAACGTGCGCCTCAGA
CAR rev	TGTAATGCCATCGGTCTTGT
CAR-Sonde	6-FAM-CGTACTTGAACTTAGCGGGTGCCA-TAMRA
chCAR fwd	TGTATTATGACTGGAGAGTAGTA
chCAR rev	TTCAAGAGAAGTTCCCCTGTATTT
chACR-Sonde	6-FAM-AAGGACTTCCTGCCACTTCCGTACTAA-TAMRA
CVB3 fwd	CCCTGATGCGGCTAATCC
CVB3 rev	AAACACGGACACCCAAAGTAGTC
CVB3-Sonde	6-FAM-GCCTGCAGAGTTGCCCGTTACGA-TAMRA
TNFα fwd	CATCTTCTCAAAATTCGAGTGACAA
TNFα rev	CCAGCTGCTCCTCCACTTG
TNFα-Sonde	6-FAM-CCTGTAGCCCACGTCGTAGCAAACCA-TAMRA
IFNβ fwd	AAAACTGAAGACCTGTCAGTTGATG
IFNβ rev	CCGCCTCTGATGCTTAAAGG
IFNβ-Sonde	6-FAM-CAGAATGAGTGGTGGTTGCAGGCA-TAMRA
IL6 fwd	ACAAGTCGGAGGCTTAATTACACAT
IL6 rev	TTGCCATTGCACAACTCTTTTC
IL6-Sonde	6-FAM-TTCTCTGGGAAATCGTGGAAATG-TAMRA
IL10 fwd	CCAGAGCCACATGCTCCTAGA
IL10 rev	GGTCCTTTGTTTGAAAGAAAGTCTTC
IL10-Sonde	6-FAM-CTGCGGACTGCCTTCAGCCAGG-TAMRA

Tabelle 8: Verwendete Oligonukleotide zur *real-time* PCR.

In 5` - 3`Orientierung, rev: reverse; fwd: forward

Die Oligonukleotide wurden von der Firma BioTeZ synthetisiert. Die Primer und Sonden für RANTES, Connexin 43 und Connexin 45 wurden von Applied Biosystems bezogen.

5 Methoden

5.1 Tierexperimentelle Praxis

Die für die Experimente benötigten Mäuse stammten aus eigener Zucht. Die Tiere wurden in individuell belüfteten Käfigen in der tierexperimentellen Einrichtung des Max-Delbrück-Centrums in Berlin gehalten. Sie erhielten unbegrenzten Zugang zu Wasser und Futter und hatten einen 12 h Tag/Nacht Rhythmus. Die Versuche wurden gemäß der Richtlinien der europäischen Union durchgeführt und waren von der deutschen Tierschutzbehörde genehmigt (LaGeSo Berlin).

5.1.1 Genotypisierung

Zur Genotypisierung der Versuchsmäuse wurde eine Schwanzbiopsie von 1-2 mm Länge mit 100 µl Embryolysispuffer und 5 µl Proteinase K (10 µg/ml) verdaut. Für die Genotypisierung von Embryonen wurde der Kopf des Embryos verwendet und in 100µl Embryolysispuffer mit 5µl Proteinase K gegeben. Es folgte eine Inkubation der Proben über Nacht bei 54 °C und 700 rpm in einem Thermoschüttler. Zur Inaktivierung der Proteinase K wurden die Proben für 5 min auf 95 °C erhitzt.

Embryolysispuffer

50 mM KCl; 3 mM MgCl₂; 10 mM Tris pH 8,9; 0,01% Gelatine; 0,4% NP-40; 0,45% Tween-20

Die Bestimmung des CAR-Genotyps erfolgte unter Verwendung des Soriano-PCR Protokolls zur Detektion der WT-, recf- und rec-Allele. Für einen Reaktionsansatz wurde folgendes Pipettierschema verwendet: Tabelle 9: Pipettierschema zur Detektion von WT-, recf- und rec- Allelen.

Komponente	Endkonzentration	Volumen
Gitschierpuffer (10x)	1x	2,5 µl
DMSO	10%	2,5 µl
dNTP Mix (10 mM)	0,5 mM	1,25 µl
Primer fwd (10 µM)	0,2 µM	0,5 µl
Primer rev (10 µM)	0,2 µM	0,5 µl
BSA (10 mg/ml)	0,08 mg/ml	0,2 µl
DNA-Template	20-50 ng	1,0 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,025 U/µI	0,125 µl
Steriles ddH ₂ O		ad 25 µl

Gitschierpuffer (10x)

166 mM (NH₄)₂SO₄; 670 mM Tris, pH 8,8; 67 mM MgCl₂; 50 mM β -Mercaptoethanol; 67 mM EDTA

Die PCR wurde nach folgendem Programm durchgeführt:

Denaturierung (initial)	93 °C	3 min	
Annealing (initial)	60 °C	5 min	
Elongation (initial)	65 °C	5 min	
Denaturierung	93 °C	30 s	40x
Annealing	60 °C	1 min	
Elongation	65 °C	1 min	
Syntheseschritt (final)	65 °C	10 min	
Kühlung	4 °C	∞	

PCR	Primer	PCR Pro	dukt
CAR recf	P1-5 fwd	WT	(419) bp
	P1-3 rev	recf	(349) bp
CAR rec	P1-3 fwd	rec	(251) bp
	P1-3 rev		

Tabelle 10: Primer und Produktgrößen zur Bestimmung des CAR-Genotyps.

Der Nachweis der Cre-Rekombinase und des chicken CAR Transgens erfolgte durch eine PCR mit der Taq-Polymerase nach Herstellerangaben. Für einen PCR-Ansatz wurde folgendes Pipettierschema verwendet:

Tabelle 11: Pipettierschema zur Detektion der Cre-Rekombinase und des chCAR Transgens.

Komponente	Endkonzentration	Volumen
Puffer (10×) (Invitrogen)	1x	2,5 µl
dNTP Mix (10 mM)	0,5 mM	1,25 µl
Primer fwd (10 µM)	0,6 µM	1,5 µl
Primer rev (10 µM)	0,6 µM	1,5 µl
MgCl ₂ (50 mg/ml)	1,5 mg/ml	0,75 µl
DNA-Template	20-50 ng	1 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,04 U/µl	0,2 µl
Steriles ddH ₂ O		ad 25 µl

Die PCR für die Cre-Rekombinase wurde nach folgendem Programm durchgeführt:

Denaturierung (initial)	94°C	2 min	
Denaturierung	94 °C	15 sec	35x
Annealing	49 °C	45 sec	
Synthese	72 °C	45 sec	
Synthese (final)	72 °C	8 min	
Kühlung	4 °C	×	

Produktgrößen zur Detektion der Cre-Rekombinase.

Tabelle 12: Primer und
PCR	Primer	PCR Produkt
Cre-Rekombinase	Cre 800	Cre-Rekombinase 400 bp
	Cre 1200	

Die PCR für das chCAR Transgen wurde nach folgendem Programm durchgeführt:

Denaturierung (initial)	94°C	2 min	
Dopaturiorupa	04 °C	15 500	35v
Denaturierung	94 C	10 260	33%
Annealing	50 °C	45 sec	
Synthese	72 °C	120 sec	
Synthese (final)	72 °C	8 min	
Kühlung	4 °C	∞	

Tabelle 13: Primer und Produktgrößen zur Detektion des chicken CAR.

PCR	Primer	PCR Produkt
chicken CAR	B-Globin 1019 fwd	chicken CAR 800 bp
	chCAR 454 rev	

5.1.2 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der DNA-Fragmente wurde eine Elektrophorese in einem Agarosegel durchgeführt. Die Agarose wurde dazu mit 0,5x TAE-Puffer aufgekocht, mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und in einen Gelträger gegossen. Nach dem Auskühlen der Agarose wurde der Gelschlitten in die Elekrophoresekammer (Cosmo Bio Co, Mupid 21) überführt und diese mit 0,5x TAE-Puffer aufgefüllt. Die DNA-Proben wurden mit 5 µl Orange G Ladepuffer versetzt. Je 20 µl der Probe wurden in eine Geltasche aufgetragen. Als Größenstandard wurden 5 µl des GeneRuler[™] 50 bp DNA Ladder (Fermentas) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 V. Die DNA wurde anschließend unter UV-Licht mit dem Transilluminator UVsolo (Biometra) sichtbar gemacht.

0,5x TAE-Puffer

40 mM Tris; 5 mM Natriumacetat; 1 mM EDTA, pH 8,0

Orange-G Ladepuffer

0,5% Orange G; 50% Glycerol; 25 mM EDTA

5.1.3 Tamoxifenbehandlung

Für die Tamoxifenbehandlung des herzspezifischen, induzierbaren CAR-KOs wurden 100 mg Tamoxifen mit 0,6 ml Ethanol und 9,4 ml Erdnussöl versetzt und mittels Ultraschall gelöst. Anschließend wurde die Lösung aliquotiert und bei -20 °C gelagert (Kuhbandner et al., 2000). Für die Versuche wurden nur männliche Tiere verwendet, die bei Beginn der Tamoxifeninjektion 7 Wochen alt waren. Den Tieren wurde täglich mit 30 mg Tamoxifen/kg Körpergewicht intraperitoneal injiziert. Die Injektion erfolgte 5 Tage in Folge. Nach 2-tägiger Pause wurde die Injektion wie angegeben wiederholt. Als Kontrolltiere dienten MerCreMer negative Tiere, die ebenfalls mit Tamoxifen behandelt wurden.

5.1.4 Ligation der linken Koronararterie

Die Tiere wurden mit 2,4% IsoFlo (Abott) in einer Univentor 400 Narkosekammer (Univentor) narkotisiert, anschließend intubiert und mechanisch mit Hilfe des UNO Micro Ventilator Systems (UNO) beatmet. Um die Augen vor Austrocknung zu schützen, wurde eine Augensalbe (Bepanthen® Augen- und Nasensalbe, Roche) aufgetragen. Die Temperatur der Versuchstiere wurde während der Operation über eine rektale Temperatursonde gemessen. Über eine Wärmematte (FHC) wurde die Temperatur konstant auf 37 °C ± 0,5 °C gehalten. Die Brust der Maus wurde rasiert und das Tier in eine stabile Seitenlage gebracht. Anschließend wurde die Haut durch einen Schnitt von der Achsel zum Solarplexus geöffnet. Der Brustmuskel wurde in Faserrichtung geteilt und auseinandergespreizt. Anschließend wurde der Brustkorb zwischen der dritten und vierten Rippe geöffnet. Die Offnung wurde auseinandergespreizt um einen freien Blick auf das Herz zu haben. Nach Öffnung des Perikards wurde der vordere Seitenast des Ramus interventricularis anterior mit einem Polypropylenfaden (Ethicon) abgebunden. Das erfolgreiche Abbinden der Arterie wurde durch makroskopische Veränderungen überprüft. Anschließend wurde der Brustkorb wieder geschlossen, der Hautschnitt vernäht und die Tiere aus der Narkose entlassen. Durch eine Injektion von 0,5 ml NaCl-Lösung und eine Wärmezufuhr über eine Rotlichtlampe wurde ein Dehydrieren und Auskühlen der Tiere in der Aufwachphase verhindert. Kontrolltiere durchliefen die gleiche Operation, jedoch ohne die Ligation der Arterie (Schein-OP).

5.1.5 Echokardiographie

Für die echokardiographischen Messungen wurde das Schallgerät Vevo2100 (Visual Sonics) mit dem Schallkopf MS400 (Visual Sonics) verwendet. Vor der Messung wurden die Tiere mit 2,4% IsoFlo (Abott) in einer Univentor 400 Narkosekammer narkotisiert. Während der Untersuchung wurde die Temperatur des Tieres kontinuierlich über eine Rektalsonde kontrolliert und durch gezielte Wärmezufuhr ein Auskühlen des Tieres verhindert. Die Herzaktivität wurde durch die Aufnahme eines EKGs über die Extremitätenableitung verfolgt. Zur Untersuchung wurde das Bauchfell rasiert. Die Echokardiographie erfolgte unter Narkose mit 1,5% IsoFlo (Abott). Gemessen wurde im M-Modus und B-Modus. Beim M-Modus handelt es sich um eine eindimensionale Darstellung, bei der die zeitliche Veränderung der Position der unterschiedlichen Herzstrukturen in einer Linie unter dem Schallkopf betrachtet wird. Der B-Modus hingegen gibt ein zweidimensionales Bild von der Tiefen- und Längenausdehnung des Gewebes unter dem Schallkopf wieder. Die Echokardiographie erfolgte in der Core-Facility zur kardiologischen Phänotypisierung des MDC.

5.1.6 Elektrokardiographie

Zur Ableitung der elektrischen Herzaktivität wurden die Tiere mit 2,4% IsoFlo (Abott) in einer Univentor 400 Narkosekammer narkotisiert und die Narkosetiefe durch Überprüfung der Reflexe und der Atmung beobachtet. Während der Untersuchung wurde mit 1,5% IsoFlo anästhesiert. Das Oberflächen-EKG wurde von den vier Extremitäten abgeleitet und mit dem PL3508 PowerLab 8/35 (AD Instruments) aufgenommen. Von jedem Versuchstier wurden 90 Sekunden des EKGs aufgezeichnet. Die Auswertung erfolgte mit der LabChart 7.3 (AD Instruments) Software. Die Elektrokardiographie erfolgte in der Core-Facility zur kardiologischen Phänotypisierung des MDC.

5.1.7 Messung der Körperzusammensetzung

Die Körperzusammensetzung wurde mit dem Body composition analyzer LF90II (Bruker) gemessen. Mittels Magnet-Resonanz-Technologie kann innerhalb kürzester Zeit eine Bestimmung von Fett, Gewebe und Flüssigkeiten im Körper erfolgen. Eine Narkose der Tiere ist daher nicht nötig. Die Messung der Körperzusammensetzung erfolgte in der Core-Facility zur kardiologischen Phänotypisierung des MDC.

5.1.8 Virusinfektion von Mäusen

Zur Infektion mit Coxsackievirus wurde Mäusen 2×10^5 plaque-forming units (pfu) intraperitoneal oder mit 1×10^6 pfu intravenös des kardiotrophen CVB3-Stamms Nancy injiziert. Die Infektionen wurden von Dr. Martina Sauter in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Karin Klingen in Tübingen durchgeführt.

5.2 Nukleinsäureanalytik

5.2.1 Amplifizierung von DNA-Fragmenten

Zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten, für eine anschließende Klonierung, wurde die Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase (Thermo scientific) verwendet, welche sich durch eine sehr geringe Fehlerrate auszeichnet. Die PCR wurde verwendet, um das chicken CAR inklusive Polyadenylierungssequenz von einem Vektor zu amplifizieren und *Not I* Schnittstellen einzufügen.

Komponente	Endkonzentration	Volumen
Puffer (5x)	1x	4 µl
dNTP Mix (10 mM)	0,2 mM	0,4 µl
Primer chCAR fwd (10 µM)	0,5 µM	1 µl
Primer chCAR pA rev (10 µM)	0,5 µM	1 µl
DNA-Template	10 ng	1 µl
Taq-Polymerase (2 U/µI)	0,02 U/µl	0,2 µl
Steriles ddH ₂ O		ad 25 µl

Tabelle 14: Pipettierschema zur Amplifizierung des chicken CAR-Konstrukts.

Die PCR wurde nach folgendem Programm durchgeführt:

Denaturierung (initial) 98 °C 30 sec

Denaturierung	98 °C	10 sec	35x
Annealing	59 °C	30 sec	
Synthese	72 °C	40 sec	
Synthese (final)	72 °C	8 min	
Kühlung	4 °C	∞	

Die Phusion Polymerase produziert DNA-Fragmente mit glatten Enden, die anschließend über eine Gelextraktion aufgereinigt und mit entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten wurden.

5.2.2 DNA Gelextraktion

Nach der Kontrolle der DNA-Fragmente in einem Agarosegel wurden diese zur weiteren Prozessierung mit dem QIAquick Gel extraction Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die DNA wurde in 15 µl destilliertem Wasser aufgenommen und die Konzentration am Nanodrop (Nanodrop ND-1000) gemessen.

5.2.3 Restriktionsverdau von DNA

Um DNA-Fragmente in einen Vektor einzufügen, wurden diese mit Restriktionsenzymen geschnitten. Der Restriktionsverdau erfolgte nach Herstellerangaben (New England Biolabs) für 2 h bei 37 °C in einem Volumen von 20 µl. Anschließend erfolgte eine Aufreinigung der Produkte mittels PCR Aufreinigung oder Gelextraktion.

5.2.4 PCR Aufreinigung

Das Qiaquick PCR Purification Kit (Qiagen) wurde nach Herstellerangaben verwendet um DNA-Fragmente von Puffern, Enzymen oder kleinen DNA-Fragmenten bis 80 bp zu trennen. Die DNA wurde in 30 µl destilliertem Wasser eluiert und die Konzentrationen mittels Nanodrop (Nanodrop ND-1000) gemessen.

5.2.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Die verdauten und aufgereinigten DNA-Fragmente wurden über eine Ligationsreaktion durch die T4 DNA Ligase zusammengefügt. Für die Reaktion wurde das DNA Ligation Kit (TaKaRa) verwendet. 50 ng des Vektors wurden mit der dreifachen molaren Menge des Inserts in einem Volumen von 5 µl gemischt. Zu diesem Reaktionsansatz wurden 25 µl des Reaktionspuffers und 5 µl der Enzymlösung gegeben und dann für 30 min bei 16 °C inkubiert. Der Ligationsmix wurde direkt für eine Transformation in Bakterien verwendet.

5.2.6 Transformation

Für die Transformation von Plasmid-DNA wurden chemisch kompetente *E. coli* DH5a verwendet. 200 µl der Bakterien wurden auf Eis aufgetaut, mit 10 µl des Ligationsansatzes vermischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Die Transformation erfolgte durch einen Hitzeschock von 45 sec bei 42 °C. Nach Zugabe von 1 ml SOC-Medium wurden die Zellen für 1 h bei 37 °C und 350 rpm geschüttelt. 100 µl der Zellsuspension wurden anschließend auf eine LB-Agarplatte mit Ampicillin ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Insertion des DNA-Fragmentes wurde durch einen Restriktionsverdau überprüft.

SOC-Medium

2% Bacto Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 2.5 mM KCl, 20 mM Glukose, pH 7.0).

LB-Agarplatte

1% Bacto Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 171 mM NaCl, 1,5% Agar, 50 µg/ml Ampicillin, pH 7.0)

5.2.7 Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Zur Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien wurden die Kits PureLink Quick Plasmid Miniprep (Invitrogen) für DNA-Mengen bis 30 µg bzw. PureLink HiPure Plasmid Filter Maxiprep (Invitrogen) für DNA-Mengen bis 1 mg nach Herstellerangaben verwendet.

5.2.8 Isolation von RNA aus Geweben

Die entnommenen Gewebe wurden in flüssigen Stickstoff gefroren und bei -80°C gelagert. Zur Aufarbeitung wurden die Proben in einem Mörser zu Pulver gemahlen. Eine ständige Kühlung von Mörser und Pistill erfolgte durch Trockeneis und flüssigen Stickstoff. 50 mg des Pulvers wurden in ein 2 ml Reaktionsgefäß mit 1 ml Trizol und einer Keramikkugel überführt. Mit Hilfe des Tissuelyzers (Tissuelyzer II, Qiagen) wurde das Gewebe für 2 min bei einer Frequenz von 20 Schlägen pro Sekunde weiter aufgeschlossen. Es folgte eine Zentrifugation für 10 min bei 12.000 g und 4 °C. Der Überstand wurde abgenommen und mit 0,2 ml Chloroform versetzt. Nach Invertieren der Proben erfolgte eine 3 minütige Inkubation bei RT mit anschließender Zentrifugation bei 12.000 g und 4 °C für 15 min. Die obere Phase, welche die RNA enthält, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 0,5 ml Isopropanol versetzt und 10 min bei RT inkubiert. Danach erfolgte eine Zentrifugation bei 12.000 g und 4 °C für 10 min, um die RNA zu pelletieren. Die RNA wurde in 1 ml 75% Ethanol gewaschen und 10 min bei 7.500 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet bei RT getrocknet und in 89 µl DEPC-H₂O resuspendiert.

5.2.9 RNA-Aufreinigung

Die isolierte RNA wurde für 10 min bei RT mit DNase I (Qiagen) behandelt und anschließend mit dem RNeasy Mini-Kit von Qiagen nach Herstellerangaben aufgereinigt. Es erfolgte erneut eine Konzentrationsbestimmung mittels Nanodrop (Nanodrop ND-1000) nach Herstellerangaben bei 260 nm.

5.2.10 Messung der RNA-Qualität

Die Qualität der RNA wurde mit dem Bioanalyzer 2100 (Agilent) bestimmt. Bei dieser Methode wird durch eine Chip-basierte Gelelektrophorese die Konzentration sowie die Qualität der RNA bestimmt. Die RNA wurde mit dem RNA 6000 Nano Kit (Agilent) nach Herstellerangaben gemessen.

5.2.11 Illumina Genexpressionsanalyse

Zur Analyse des Genexpressionsprofils wurde die RNA aus Gewebe wie beschrieben aufgereinigt. Anschließend wurde eine biotinylierte cRNA mit dem Illumina TotalPrep-96RNA Amplification Kit (Ambion) nach Herstellerangaben hergestellt. Hierbei wird aus der RNA, unter Verwendung von oligo dT Primern mit T7 Promotorsequenz und einer reversen Transkriptase, eine cDNA synthetisiert. Nach Synthese des zweiten Stranges dient dieser als Vorlage zur Generierung der cRNA mittels T7 RNA-Polymerase. Für die biotinylierten genomweite Expressionsanalyse wurde das MouseRef-8 v2.0 Expression BeadChip Kit (Illumina) verwendet. Die Hybridisierung der cRNA an die genspezifischen Oligonukleotide sowie die Detektion des Fluoreszenssignals der Cy3-gekoppelten anti Strepavidinantikörper wurde von der AG Hübner am MDC durchgeführt. Das Auslesen der Chips erfolgte mit dem iScan (Illumina). Die Hintergrundkorrektur und Normalisierung wurde mit der Software GenomeStudio 1.9.0 (Illumina) durchgeführt. Für die Prozessierung und Darstellung der Daten wurde die Software Cytoscape (3.3.0) verwendet.

5.2.12 cDNA-Synthese

Zur Durchführung einer quantitativen *real time*-PCR (RT-PCR) wurden 2 µg der RNA in cDNA umgeschrieben. Dafür wurde das high capacity RNA-to-cDNA Kit von Applied Biosystems verwendet und nach Herstellerangaben verfahren.

Die cDNA-Synthese erfolgte in einem Thermocycler für 1 h bei 37 °C mit anschließender Inaktivierung der reversen Transkriptase bei 95 °C für 5 min. Die cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

5.2.13 Quantitative real time -PCR

Für die quantitative *real time*-PCR (RT-PCR) wurde der TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) verwendet. Jeder Ansatz wurde in Triplets durchgeführt. Als interne Kontrolle diente die 18S RNA. Entsprechend der Herstellerangaben wurde folgendes Pipettierschema verwendet: Tabelle 15: Pipettierschema für die RT-PCR.

Komponente	Volumen
Taqman gene expression Master Mix (2x)	10 µl
Primer und Sonden Mix (20x)	1 µl
Primer und Sonden Mix 18s RNA (20x)	1 µl
cDNA (20ng)	8 µl

Es wurde folgendes Programm verwendet:

Annealing (initial)	50 °C	2 min	
Denaturierung (initial)	95 °C	10 min	
Denaturierung	95 °C	15 sec	50x
Synthese	60 °C	1 min	
Kühlung	4 °C	∞	

Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des Sequence Detection System 1.2 von Applied Biosystems unter Verwendung der $\Delta\Delta$ CT-Methode, welche im Handbuch des ABI PRISM 7900 Sequence Detection System beschrieben ist.

5.3 Proteinchemische Methoden

5.3.1 Proteinisolation aus Gewebe

Die entnommenen Gewebe wurden in flüssigen Stickstoff gefroren und bei -80 °C gelagert. Zur Aufarbeitung wurden die Proben in einem Mörser zu Pulver gemahlen. Mörser und Pistill wurden dabei durch Trockeneis und flüssigen Stickstoff ständig gekühlt. 50 mg des Pulvers wurden anschließend in ein 2 ml Reaktionsgefäß mit einer Keramikkugel überführt. Die Gewebe wurden mit 500 ml RIPA-Puffer, welcher mit einem Proteaseinhibitor Cocktail (Invitrogen) versehen wurde, versetzt. Im Tissuelyzer (Tissuelyzer II, Qiagen) wurde das Gewebe für 30 sec bei einer Frequenz von 20 Schlägen pro Sekunde weiter aufgeschlossen. Nach 30 minütiger Inkubation auf Eis erfolgte eine Zentrifugation für 15 min bei 12.000 g und 4 °C, um

Zellkerne und Zellbruchstücke abzutrennen. Die Proteinkonzentration wurde mit der Amidoschwarz-Methode bestimmt (Schaffner and Weissmann, 1973).

RIPA-Puffer

50 mM Tris pH 8; 150 mM NaCl; 1% IGPAL; 0,1% Na-DOC; 5 mM EDTA; 0,1% SDS; 0,2 mM PMSF; 0,01 mM Leupeptin

5.3.2 Proteinkonzentrationsbestimmung durch Amidoschwarz

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde eine 96-well Platte mit gleichgroßen Stücken einer Nitrozellulosemembran (Schleicher & Schuell) ausgelegt. Auf die Membran wurde 1 µl der Proteinlösung aufgetragen. Danach erfolgte die Inkubation der Membran in 0,1% Amidoschwarzlösung für 1 min. In mehreren Waschschritten wurde die Membran mit Entfärbelösung unter Schütteln entfärbt bis die Proteinspots deutlich sichtbar waren. Nach Inkubation in 500 µl Elutionslösung für 30 min unter Schütteln erfolgte die photometrische Messung der eluierten Lösung bei 630 nm. Als Standard wurde eine BSA-Eichreihe mitgeführt.

Amidoschwarzlösung

45% Methanol; 10% Essigsäure; 0,1% Amidoschwarz Entfärbelösung 90% Methanol; 2% Essigsäure Elutionslösung 50% Ethanol; 0,05 mM EDTA; 25 mM NaOH

5.3.3 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) (Laemmli, 1970) wurden jeweils 50 µg Proteinlysat mit 4-fachem Laemmlipuffer versetzt, 5 min bei 95 °C inkubiert und auf ein SDS-Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte mit dem Mini-PROTEAN Tetra Cell Elektrophoresesystem (BioRad) bei 120 V. Als Größenstandard wurden 5 µl des Page Ruler Prestained Protein Ladder (Fermentas) verwendet.

SDS-Gelpuffer

1% SDS; 0,2 M Glycin; 25 mM Tris-HCl, pH 7,5

4x Lämmlipuffer

0,08% Bromphenolblau; 50% Glycerin; 5% ß-Mercaptoethanol; 4% SDS

5.3.4 Western blotting

Nach der SDS-PAGE wurden die Proteine in einer Blotkammer (Mini Trans Blot Cell, Biorad) auf eine Hybond-C+-Nitrocellulosemembran (GE-Healthcare) übertragen. Der Vorgang erfolgte unter Verwendung eines Blotpuffers für 2 h bei 200 mA.

Blotpuffer

25 mM Tris; 160 mM Glycin; 10% Ethanol

5.3.5 Immunologischer Nachweis von Proteinen

Der spezifische Nachweis der geblotteten Proteine erfolgte immunologisch durch Antikörper. Zur Blockierung von unspezifischen Bindungsstellen wurde die Membran 30 Minuten in 5% (w/v) Magermilchpulver in PBS inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation des primären Antikörpers über Nacht bei 4°C. Anschließend wurde die Membran dreimal für 5 Minuten mit PBS gewaschen. Es folgte die Inkubation mit dem sekundären HRP- (*horseradish peroxidase*) konjugierten Antikörper für 1 h bei RT. Nach der Inkubation wurde die Membran 1x 5 min mit PBS-T und 2x 5 min mit PBS gewaschen. Zur Entwicklung des Blots wurde das Supersignal Kit (Pierce) nach Herstellerangaben verwendet. Die Detektion des Chemilumineszenssignals erfolgte mit dem Fusion Fx7 Detektionssystem (PeqLab).

PBS

137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄ x 2 H₂O; 1,8 mM KH₂PO₄ **PBS-T** PBS + 0,1% Tween

5.3.6 Immunfärbung von Proteinen

Für eine Immunfärbung wurden auf Objektgläsern gewachsene Zellen für 15 min mit 4% PFA fixiert und anschließend 3x mit PBS gewaschen. In einer Feuchtkammer erfolgte die Permeabilisierung und Blockierung mit Blockierungspuffer für 1 h bei RT. Die Zellen wurden über Nacht bei 4 °C mit entsprechend in PBS verdünnten ersten Antikörpern inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen 3x für jeweils 5 min mit PBS gewaschen. Es folgte die Inkubation mit einem fluoreszenzgekoppelten zweiten Antikörper und DAPI (1:10.000) für 2 h bei RT. Anschließend wurden die Zellen 3x für jeweils 5 min mit PBS gewaschen. Das Eindeckeln auf dem Objektträger erfolgte mit Fluorescence Mounting Medium (Dako). Die Färbungen wurden am konfokalen Mikroskop Leica SP5 und der Software Leica LAS AF ausgewertet.

Blockierungspuffer

10% Serum, 0,3% Triton X-100, 0,2% BSA in PBS

5.3.7 Coxsackievirus B3 Serum ELISA

Zur Bestimmung der Coxsackievirus-spezifischen Antikörper im Serum wurde das SERION ELISA classic Coxsackievirus IgG Kit (Virion Serion) verwendet. Die Serumproben wurden initial 1:200 verdünnt. Die Testdurchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Da der Test für humane Proben ausgelegt ist, wurde der Substrat-Antikörper durch einen Alkaline Phospatase gekoppelten anti Maus IgG Antikörper (Invitrogen) ersetzt. Die Extinktionsmessung erfolgte am Lesegerät Infinite F200 Pro (TECAN).

5.3.8 Multiplex bead-Immunoassay

Für die Messung von Zytokinen im Serum wurde das BioPlex Pro Mouse Cytokine Assay (BioRad) nach Herstellerangaben verwendet. Bei dieser Methode wird ein Biomarker aus dem Serum über einen spezifischen Antikörper an ein magnetisches Trägermaterial gebunden. Die Detektion des Biomarkers erfolgt schließlich über einen Strepavidin-Phycoerythrin gekoppelten Antikörper. Das Fluoreszenssignal wurde mit dem Luminex 200[™] Gerät (Luminex) und der Bio-Plex Manager Software 6.0 (BioRad) ausgelesen. Die Konzentration der Analyte wurde über eine Standardkurve ermittelt.

5.4 Zellkulturtechniken

5.4.1 Transfektion von Säugerzellen

Die Transfektion von Säugerzellen erfolgte mit Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Dabei interagiert die Plasmid-DNA mit positiv geladenen Liposomen, welche dann die Zellwand der Säuger-Zellen passieren können. Die Zellen waren zum Zeitpunkt der Transfektion zu etwa 80% konfluent. Pro Kavität einer 6-Well-Platte wurden 2,6 µg Plasmid-DNA und 2,6 µl Lipofektamine 2000 in 80 µl serumfreies Medium gegeben. Nach 5 min wurden die beiden Ansätze miteinander vermischt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Transfektionsansatz wurde mit 500 µl serumfreiem Medium auf die Zellen gegeben und nach 5 Stunden durch normales Zellkulturmedium ersetzt.

5.4.2 Infektion von Säugerzellen

Die Infektion der Säugerzellen mit dem CVB3 Stamm Nancy erfolgte 48 h nach der Transfektion. Die Zellen wurden mit einer *multiplicity of infection* (MOI) von 0,1 für 30 min bei 37 °C infiziert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Für die Gewinnung der RNA wurden die Zellen 4 h nach der Infektion mit 1ml Trizol lysiert und die RNA wie beschrieben aufgereinigt. Für den Plaqueassay wurden die Zellen nach 24 h inklusive des Zellkulturüberstandes geerntet. Die Infektion der Säugerzellen wurde von Dr. Sandra Pinkert in der Arbeitsgruppe von Dr. Henry Fechner durchgeführt.

5.4.3 Plaqueassay

Für den Plaqueassay wurden die Zellen inklusive Zellkulturüberstand 24 h nach der Infektion durch mehrfaches Einfrieren und Auftauen aufgeschlossen. Anschließend wurden 440 µl des Inokulats auf einen Monolayer von HeLa Zellen in einer Kavität einer 6-Well-Platte gegeben. Nach einer Inkubation von 30 min bei 37 °C wurde der Überstand entfernt. Die Zellen wurden anschließend mit einer Schicht aus Agar, der in Zellkulturmedium gelöst wurde, überschichtet. Nach dreitägiger Inkubation erfolgte die Färbung der Zellen mit 0,025% Neutralrot. Der Virustiter wurde anhand der entstandenen Plaques bestimmt. Die Plaqueassays wurden von Dr. Sandra Pinkert in der Arbeitsgruppe von Dr. Henry Fechner durchgeführt.

5.5 Histologische Arbeiten

5.5.1 Einbetten von Gewebe in Paraffin

Entnommene Gewebe wurden über Nacht in 4% PFA in PBS bei 4 °C fixiert. Am nächsten Tag erfolgte das Wässern des Gewebes für 1 h. Die Dehydrierung und Paraffinisierung der Organe wurde im Tissue-Processor (TP1020) von Leica durchgeführt.

Es wurde folgendes Programm verwendet:

Komponente	Anzahl	Zeit
70% Ethanol	1x	1 h
90% Ethanol	1x	1 h
96% Ethanol	2x	1 h
100% Ethanol	3x	1 h
Rotihistol	3x	1 h
Paraffin	2x	1 h

Tabelle 16: Programm zur Einbettung von Geweben in Paraffin.

Zum Einbetten der Gewebe in Paraffin wurden Rotilabo-Einbettkassetten (Roth) und die EG 1140 H-Maschine (Leica) verwendet.

5.5.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H&E-Färbung) ist eine Übersichtsfärbung histologischer Präparate, bei der die Zellkerne durch Hämatoxylin blau und das Zytoplasma durch das Eosin rot gefärbt werden.

Zur Färbung der Gewebeschnitte mit Hämatoxylin und Eosin wurden 10 µm dünne Paraffinschnitte angefertigt. Die Schnitte wurden 3x 5 min in Rotihistol (Roth) deparaffinisiert und in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 90%, 70%) jeweils 5 Minuten rehydriert und in destilliertem Wasser gespült. Dann erfolgte eine Inkubation in Meyers Haemalaun-Lösung für 5 min und eine Bläuung der Schnitte für 5 min unter fließendem Leitungswasser. Die Färbung wurde mit destilliertem Wasser gestoppt. Anschließend wurden die Schnitte für 30 sec mit Eosin gefärbt und in einer aufsteigender Alkoholreihe (70%, 90%, 100%) jeweils für 20 sec dehydriert und mit Roti Histokitt (Roth) eingedeckelt.

5.5.3 Masson-Trichrom-Färbung

Die Masson-Trichrom-Färbung ist eine histologische Färbung zur Detektion fibröser Gewebestrukturen. Die Zellkerne werden schwarz und das Zytoplasma rot gefärbt. Das Bindegewebe kann durch eine Blaufärbung vom umliegenden Gewebe unterschieden werden.

Nach Deparaffinisierung und Rehydrierung wurden die Schnitte mit dem Accustain Masson Trichrome Stains-Kit (Sigma) nach Herstellerangaben gefärbt. Es folgte eine Dehydrierung durch Alkohollösungen in aufsteigender Konzentration und das Einbetten in Roti Histokitt (Roth).

5.5.4 CVB3 in situ Hybridisierung

CVB3 RNA wurde mittels einer radioaktiven *in situ* Hybridisierung in Paraffinschnitten nachgewiesen. Dazu wurden die Schnitte zunächst deparaffinisiert und rehydriert. Zur Detektion wurde eine ³⁵S-gekoppelte Enterovirus-spezifische RNA Sonde verwendet. Der Nachweis wurde wie beschrieben durchgeführt (Klingel et al., 1992). Anschließend erfolgte eine Färbung der Schnitte mit Hämatoxylin und Eosin. Die Färbungen wurden von Dr. Martina Sauter in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Karin Klingel in Tübingen durchgeführt.

5.5.5 Elektronenmikroskopie

Für die Ultrastrukturellen Analysen der Herzen wurden die getöteten Tiere mit 4% PFA in Phosphatpuffer perfundiert. Die Gewebe aus den linken Ventrikeln wurden über Nacht in 2,5% Glutaraldehyd in Phosphatpuffer fixiert. Anschließend wurden die Gewebe mit Cacodylatpuffer gewaschen, mit 1% Osmiumtetroxid für 2 h nachfixiert und in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Die Gewebe wurden

dann in Epon eingebettet und Ultradünnschnitte von 70 nm angefertigt. Die Schnitte wurden mit Uranylazetat und Bleizitrat kontrastiert und mittels einer CCD Kamera (Proscan) am Elektronenmikroskop (Zeiss 910) dokumentiert. Die Anfertigung und Dokumentation der Schnitte erfolgte in der Core-Facility für Elektronenmikroskopie des MDC.

5.6 Statistik

Für die Auswertung wurde die GraphPad Prism 5.0-Software (GraphPad Software Inc.) verwendet. Die Messwerte wurden gemittelt und als Mittelwert mit Standartabweichung (SEM) dargestellt. Der Vergleich von zwei Gruppen erfolgte mittels Student T-Test. Um den Einfluss von zwei Parametern zu vergleichen, wurde der two-way ANOVA-Test durchgeführt. P-Werte mit * $P \le 0.05$; ** $P \le 0.01$; *** $P \le 0.001$ wurden als signifikant betrachtet.

6 Ergebnisse

6.1 CAR in der Herzentwicklung

6.1.1 Erzeugung der herzspezifischen CAR-Rescue-Maus

Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptor Der und ist essentiell für die Embryonalentwicklung. CAR defiziente Maus-Embryonen sterben zwischen Tag E11,5 und E12,5 an einer Fehlentwicklung des Herzens mit kardialen Einblutungen (Asher et al., 2005; Dorner et al., 2005; Chen et al., 2006). Um kardiale und nichtkardiale Funktionen von CAR zu untersuchen, wurde ergänzend zum konditionellen herzspezifischen Knockout ein transgener Mausstamm hergestellt und anschließend mit CAR-defizineten Tieren verpaart. Die homozygoten Nachkommen sollten CAR allein im Herzen exprimieren und überleben, wenn CAR ausserhalb des Herzens keine essentielle Funktion übernimmt.

Zur Herstellung der transgenen Maus wurde *CAR* aus dem Huhn (chCAR) vor den herzspezifischen MLC 2-Promotor und das β-Globin-Intron 2 kloniert (Abbildung 8). Der MLC 2-Promotor stellt eine alleinige Expression des Transgens im Herzen sicher. Zudem ist dieser Promotor im embryonalen Herzen sehr aktiv. Nach der Geburt wird die Expression herunterreguliert (Franz et al., 1993). Somit entspricht der Expressionsverlauf des Transgens dem der natürlichen Expression von CAR.

Die Funktionalität des Konstrukts wurde in H9C2-Zellen überprüft - einer stabilen Kardiomyoblasten-Zelllinie aus der Ratte. Diese Zellen wurden gewählt, um die Aktivität des MLC 2-Promotors zu erhalten. 24 h nach der Transfektion mit MLC 2-chCAR wurden die Zellen fixiert. Die Expression und Lokalisation des Proteins wurde durch eine Immunfärbung mit einem spezifischen chCAR Antikörper im konfokalen Mikroskop dokumentiert. Die Lokalisation des chCAR-Proteins an der Plasmamembran entspricht der natürlichen Verteilung von CAR in nicht polarisierten Zellen.



Abbildung 8: Erzeugung und Validierung des chCAR Expressionsvektors.

(A) *CAR* aus dem Huhn (chCAR) wurde nach den MLC 2-Promotor und das β -Globin-Intron 2 kloniert. Zusätzlich wurde eine SV40 Polyadenylierungssequenz (SV40pA) angefügt. (B) Die Expression und Lokalisation des chCAR Proteins wurde nach Transfektion von H9C2-Zellen mittels konfokaler Mikroskopie einer Immunfärbung überprüft.

Nach Validierung der Funktionalität des Konstrukts wurde das Plasmid mit den Restriktionsenzymen *KpnI* und *SacI* linearisiert und das Plasmid-Rückgrat abgetrennt. Das aufgereinigte Konstrukt, bestehend aus dem MLC 2-Promotor, dem β -Globin-Intron 2, der *chCAR*-cDNA und der SV40 Polyadenylierungssequenz, wurde in den Vorkern einer befruchteten Eizelle injiziert. Das linerarisierte DNA-Konstrukt kann dann zufällig in die chromosomale DNA integrieren. Die Eizelle wurde anschließend in eine scheinschwangere Ammenmutter transferiert und der Nachwuchs mittels PCR auf das Vorhandensein des Transgens überprüft.

Daraufhin erfolgte eine Verpaarung der so hergestellten chCAR transgenen Tiere mit heterozygot CAR-defizienten Tieren. Daraus resultierende heterozygot CAR-defiziente Mäuse mit Transgen wurden mit heterozygot CAR-defizienten Tieren ohne Transgen verpaart, um CAR-defiziente Tiere mit Expression des chCAR im Herzen zu erhalten (Abbildung 9).

Tiere, die das Transgen tragen, wurden nicht untereinander verpaart, so dass immer ein Wildtyp-Allel ohne Transgen vorhanden ist. Damit wurden potentielle Integrations-Effekte des Transgens reduziert.

Die Genotypisierung des Nachwuchses in der F2-Generation zeigte, dass die herzspezifische Expression des chCAR ein Überleben der CAR-KO-Tiere ermöglicht. Daher wird das neu generierte Mausmodell als herzspezifischer CAR-Rescue (Rettung) bezeichnet.



herzspezifischer CAR Rescue (k)

Abbildung 9: Herstellung der CAR-Rescue-Maus.

chCAR transgene Tiere (a) wurden mit heterozygot CAR-defizienten Tieren (b) verpaart. In der F1-Generation entstanden somit CAR-WT-Tiere mit (c) und ohne (d) Transgen, sowie heterozygot CAR-defiziente Tiere mit (e) und ohne (f) Transgen. Letztere (e+f) wurden weiter verpaart um in der F2-Generation CAR-WT-Tiere mit (g) und ohne (h) Transgen, CAR heterozygote Tiere mit (i) und ohne (j) Transgen sowie den CAR-Rescue (k) zu erhalten. Bei dem CAR-Rescue ist das Exon 1 des *CAR*-Gens auf beiden Allelen rekombiniert (rec). Somit kann kein murines CAR hergestellt werden. Das Vorhandensein des transgenen chCAR ist hierbei essentiell, um ein Überleben der Tiere sicherzustellen.

6.1.2 Verifizierung der CAR-Rescue-Maus

Durch die Expression des chCAR-Transgens im Herzen überleben die sonst embryonal letalen CAR-KO-Mäuse. Zur Verifizierung des Mausstammes wurde die relative Menge des endogenen, murinen CAR (mCAR) und chCAR in der CAR-Rescue-Maus durch eine quantitativer RT-PCR bestimmt (Abbildung 10). Dies erfolgte mittels spezifischer Primer und Sonden gegen mCAR und chCAR. Die mRNA wurde aus verschiedenen Organen 10 Wochen alter Tiere gewonnen und in cDNA umgeschrieben.

Die Expression von CAR in Wildtyp-Mäusen variiert in den unterschiedlichen Organen. Das chCAR ist in diesen Tieren nicht vorhanden. Bei den Rescue-Tieren ist trotz Deletion ein geringes Signal von mCAR vorhanden, das dem Hintergrund entspricht. Das transgene chCAR war nur im Herzen der CAR-Rescue-Tiere exprimiert. Der Promotor war in in anderen Geweben nicht aktiv.



Abbildung 10: Expression von mCAR und chCAR in unterschiedlichen Geweben. (A) Die Expression des murinen CAR (mCAR) variiert in den unterschiedlichen Geweben der WT-Maus. In den Rescue-Tieren ist mCAR deletiert. (B) Das chCAR Transgen ist in den WT-Mäusen nicht vorhanden und somit nicht über eine RT-PCR nachweisbar. In den Rescue-Tieren ist die Expression von chCAR spezifisch im Herzen. WT n = 3, Rescue n = 3

Die chCAR transgenen Tiere sowie die CAR-Rescue-Tiere waren unauffällig und entwickelten sich normal. Das Gewicht im Alter von 10 Wochen war vergleichbar mit dem von WT-Mäusen. Eine Messung der Körperzusammensetzung ergab keine Unterschiede in den prozentualen Anteilen von Fett, Wasser und Muskelmasse (Tabelle 17).

	WT (n = 6)	Transgen (n = 6)	Rescue (n = 6)
Gewicht [g]	23,00 ± 4,22	24,07 ± 4,79	20,93 ± 4,72
Fett [%]	15,19 ± 1,08	14,43 ± 1,01	16,95 ± 3,41
Wasser [%]	6,43 ± 0,42	6,75 ± 0,74	6,67 ± 0,56
Muskel [%]	75,96 ± 1,18	76,51 ± 1,46	74,16 ± 3,97

Tabelle 17: Körperzusammensetzung der chCAR transgenen- und Rescue-Tiere.

Aufgrund der Bedeutung von CAR in der Entwicklung und Funktion des Herzens, wurde die kardiale Morphologie und Funktion in den chCAR Transgenen und CAR-Rescue-Tieren untersucht. Die Histologie der Herzen von 10 Wochen alten Tieren war unauffällig. Die Herzen waren normal entwickelt und ohne morphologischen Veränderungen. Auch die Relation zwischen Herzgewicht und Körpergewicht war zwischen den Gruppen nicht verändert (Abbildung 11).



Abbildung 11: Morphologische Untersuchung der Herzen.

(A) Paraffinschnitte von Herzen 10 Wochen alter Tiere wurden nach der Masson Trichrome Methode gefärbt (WT n = 3, Transgen n = 3, Rescue n = 3). Es gab keine morphologischen Unterschiede zwischen WT, Transgen und Rescue. (B) Das Verhältnis zwischen Herzgewicht und Körpergewicht (HG/KG) war ebenfalls nicht verändert. WT n = 5, Transgen n = 5, Rescue n = 7.

Neben der Morphologie wurde auch die Ultrastruktur der Herzen untersucht (Abbildung 12). im Gegensatz zum embryonalen CAR-KO (Dorner et al., 2005) waren die Myofilamentstruktur oder die Mitochondrien unverändert. Auch die Glanzstreifen waren weder in den Transgenen, noch in den CAR-Rescue-Tieren verändert.



Abbildung 12: Ultrastrukturelle Analysen der Herzen.

Die Herzen von 10 Wochen alten Tieren wurden perfundiert, fixiert und in Epoxidharz eingebettet. Die angefertigten Schnitte wurden elektronenmikroskopisch untersucht. Die obere Reihe zeigt eine Übersicht der Sarkomerstruktur mit einer regelmäßigen Anordnung der I- (I) und A-Bande (A). Die eingelagerten Mitochondrien (M) waren unverändert. In der unteren Reihe ist die Struktur der Glanzstreifen (G) abgebildet. Es wurden keine Veränderungen zwischen den Genotypen festgestellt. WT n = 2, Transgen n = 2, Rescue n = 2 Nach den morphologischen und strukturellen Analysen der Herzen, wurde die kardiale Funktion der chCAR Transgenen und der CAR-Rescue-Tiere untersucht. Dies erfolgte zunächst durch eine Echokardiographie (Tabelle 18). Vor der Durchführung wurde das Körpergewicht gemessen. Das Herzgewicht wurde anhand der Echokardiographien errechnet. Beide Werte unterschieden sich nicht zwischen WT, chCAR Transgenen und CAR-Rescue-Tieren. Auch das Verhältnis zwischen unverändert zur WT-Kontrolle. Herzgewicht und Körpergewicht war Der Durchmesser des linken Ventrikels kann Hinweise auf eine mögliche Hypertrophie sowie über die Füllung und Entleerung des Herzens geben. Die Messwerte unterschieden sich zwischen den Gruppen nicht. Um die Pumpleistung des Herzens zu überprüfen, wurden fractional shortening (FS) und ejection fraction (EF) bestimmt. Das fractional shortening beschreibt die Verkürzung des Ventrikeldurchmessers während des Pumpvorgangs. Es berechnet sich aus dem Durchmesser des linken Ventrikels in der Diastole und der Systole. Die ejection fraction gibt den prozentualen Anteil des Blutes an, der während der Systole aus dem Herzen gepumpt wird. Dies wird aus dem Volumen des linken Ventrikels während der Diastole und Systole berechnet. Auch hier waren keine Unterschiede zwischen den Genotypen vorhanden.

	WT (n = 8)	Transgen (n = 5)	Rescue $(n = 6)$
KG [g]	21,84 ± 3,05	25,14 ± 3,84	20,92 ± 4,64
HG [mg]	99,16 ± 11,06	116,71 ± 2,94	106,45 ± 2,95
HG/KG [mg/g]	4,57 ± 0,41	4,63 ± 0,50	5,15 ± 1,01
LVD Diastole [mm]	4,16 ± 0,18	4,13 ± 0,52	3,99 ± 0,45
LVD Systole [mm]	3,09 ± 0,23	3,06 ± 0,29	2,99 ± 0,41
FS [%]	25,64 ± 4,46	26,24 ± 2,32	25,12 ± 4,57
EF [%]	50,92 ± 7,61	51,12 ± 4,71	48,96 ± 6,71

Tabelle 18: Echokardiographie.

KG: Körpergewicht, HG: Herzgewicht, LVD: linksventrikulärer Durchmesser, FS: fracional shortening, EF: ejection fraction

Mittels Elektrokardiographie (EKG) erfolgte die Bestimmung der elektrischen Funktion der Herzen (Tabelle 19). Dies war von besonderem Interesse, da es in den kardialen CAR-KO-Tieren zu einer Störung der Reizweiterleitung von den Atrien zu den Ventrikeln kommt (Lim et al., 2008; Lisewski et al., 2008), was sich im EKG durch ein deutlich höheres PR-Intervall nachweisen lässt. In den chCAR Transgenen und den CAR-Rescue-Tieren war das PR-Intervall nicht verlängert. Auch andere

Parameter zum zeitlichen Verlauf oder zur Amplitude der einzelnen Phasen waren unverändert.

	WT (n = 6)	Transgen (n = 6)	Rescue (n = 6)
PR Interval [ms]	39,70 ± 1,14	41,22 ± 1,36	39,49 ± 3,08
QRS Interval [ms]	13,26 ± 1,55	11,74 ± 1,65	11,32 ± 1,45
QT Interval [ms]	25,66 ± 1,79	26,05 ± 2,14	25,70 ± 0,91
P Amplitude [mV]	0,08 ± 0,02	0,09 ± 0,02	0,11 ± 0,02
Q Amplitude [mV]	-0,05 ± 0,03	-0,06 ± 0,04	$-0,08 \pm 0,08$
R Amplitude [mV]	1,55 ± 0,34	1,53 ± 0,35	1,60 ± 0,37
S Amplitude [mV]	-0.45 ± 0,15	-0,33 ± 0,27	-0,49 ± 0,26

Tabelle 19: Elektrokardiographie.

Die CAR-Rescue-Maus zeigt, dass eine alleinige Expression von CAR im Herzen ausreichend ist, um den embryonal letalen Phänotyp des CAR-Knockouts zu umgehen. Das CAR-Protein aus dem Huhn kann das murine CAR funktionell ersetzen. Die körperliche und kardiale Entwicklung sowohl der chCAR Transgenen als auch die CAR-Rescue-Tiere ist normal.

6.2 CAR in der CVB3-Pathogenese

6.2.1 Infektionsstudien in der CAR-Rescue-Maus

Als Rezeptor für bestimmte Coxsackie- und Adenoviren ist CAR wichtig für die Vermittlung der Virusaufnahme. Die Deletion von CAR im Herzen verhindert die kardiale Infektion mit CVB3 (Kallewaard et al., 2009; Shi et al., 2009). Durch Infektionsstudien in der CAR-Rescue-Maus sollten neue Erkenntnisse über die Virusaufnahme und -ausbreitung gewonnen werden.

CAR-WT- und Rescue-Tiere wurden dazu intraperitoneal mit dem kardiotrophen Coxsackievirus B3-Stamm Nancy infiziert. 10 Tage nach der Infektion wurden die Organe der Versuchstiere entnommen. Nach Hämatoxylin und Eosin Färbung von Paraffinschnitten waren in den Herzen der WT-Tiere deutliche Läsionen zu erkennen (Abbildung 13). Diese entstehen durch eine Schädigung des Gewebes durch das Virus und eine anschließende Einwanderung von Immunzellen. Das Pankreas der WT-Tiere war ebenfalls stark befallen. In Milz, Leber, Niere und Lunge gab es keine Anzeichen einer Virusinfektion. In den Rescue-Tieren kam es in keinem der untersuchten Organe zu einer Schädigung durch das Virus. Auch das Herz, welches chCAR als Rezeptor exprimiert, wies keine Läsionen auf.



Abbildung 13: Hämatoxylin-Eosin-Färbung nach CVB3-Infektion.

CAR-WT- und Rescue-Tiere wurden intraperitoneal mit $2x10^5$ pfu CVB3 infiziert. 10 Tage nach der Infektion wurden Herz, Pankreas, Milz, Leber, Niere und Lunge entnommen. H&E Färbungen der Organe machten eine Infektion von Herz und Pankreas der WT-Tiere deutlich. Andere Organe waren frei von Läsionen. Bei den Rescue-Tieren kam es in keinem Organ zu Anzeichen einer Infektion. WT n = 12, Rescue n = 11

Um das Virus im Gewebe nachzuweisen, wurde eine *in situ* Hybridisierung mit einer CVB3-spezifischen RNA-Sonde durchgeführt (Abbildung 14). Der Nachweis viraler RNA in Herz und Pankreas lässt auf eine Virusreplikation in diesen Organen schließen. In den Organen der infizierten Rescue-Tiere gab es hingegen keine Anzeichen einer Virusreplikation.



Abbildung 14: In situ Hybridisierung nach CVB3-Infektion.

Herz und Pankreas wurden 10 Tage nach intraperitonealer Infektion mit CVB3 entnommen. An Paraffinschnitten der Organe wurde eine *in situ* Hybridisierung mit einer CVB3-spezifischen RNA-Sonde durchgeführt. Die Schnitte wurden mit H&E gegengefärbt. Virale RNA wurde in Herz und Pankreas infizierter WT-Tiere nachgewiesen. In den Organen infizierter Rescue-Tiere wurde keine virale RNA detektiert.

morphologischen Anzeichen einer Neben den Infektion wurde auch die Immunantwort der infizierten Tiere analysiert (Abbildung 15). Im Serum der infizierten WT-Tiere kam es zu einer deutlichen Aktivierung des Immunsystems. Das Chemokin Regulated on Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted (RANTES) war 4 Tage nach der Infektion in den WT-Tieren deutlich hochreguliert, wohingegen die Rescue-Tiere keine signifikante Erhöhung der Expression von RANTES vorwiesen. CVB3-spezifische IgG-Antikörper wurden nur in den WT-Tieren detektiert. Auch 10 Tage nach der Infektion war die Expression von RANTES in den WT-Tieren noch leicht erhöht und die Sekretion von CVB3-spezifischen Antikörpern hatte weiter zugenommen. In den infizierten Rescue-Tieren hingegen kam es auch 10 Tage nach der Infektion zu keiner Bildung CVB3-spezifischer Antikörper.



Abbildung 15: Immunantwort im Serum CVB3-infizierter Tiere.

4 und 10 Tage nach CVB3-Infektion wurde die Immunantwort von CAR-WT und Rescue aus dem Serum untersucht. (A) Mit der Luminex bead assay-Technologie wurde über ein Fluoreszenzsignal die Konzentration des Chemokins RANTES im Serum bestimmt. 4 Tage nach der Infektion war die Expression von RANTES deutlich erhöht. (B) Die Bildung von CVB3-spezifischen Antikörpern wurde durch einen *Enzyme Linked Immuno Assay* (ELISA) bestimmt. 4 Tage nach der Infektion kam es in den WT-Tieren bereits zu einer Sekretion der Antikörper. (C) 10 Tage nach der Infektion war die Expression von RANTES noch leicht erhöht. (D) Die Freisetzung von CVB3-spezifischen Antikörpern war 10 Tage nach der Infektion deutlich gesteigert. In den infizierten Rescue-Tieren kam es zu keiner Antikörperproduktion. # stellt einen signifikanten Unterschied ($P \le 0.05$) zu uninfizierten WT-Tieren dar (n = 4). 4 dpi: WT: n = 4, KO n = 3; 10 dpi: WT n = 6, KO n = 8

Der Nachweis des Virusgenoms auf RNA-Ebene war, im Gegensatz zu infizierten WT-Tieren, in den Rescue-Tieren negativ. Das virale Kapsidprotein VP1 war ebenfalls nur in den WT-Tieren vorzufinden. Auch die mRNA-Expression verschiedener Inflammationsmarker war nur in den infizierten WT-Tieren erhöht.





(A) 4 Tage nach der Infektion mit Coxsackievirus wurden die Herzen von WT- und Rescue-Tieren entnommen und die RNA isoliert. In einer quantitativen RT-PCR wurde nur in WT-Tieren Coxsackievirus RNA nachgewiesen. (B) An Paraffinschnitten wurde eine Immunfärbung gegen das virale Kapsidprotein VP1 durchgeführt. Die viralen Proteine waren nur in den Herzen der WT-Tiere detektierbar. (C) Die RNA der Inflammationsmarker RANTES, Tumor Necrosis Factor alpha (TNFa), Interferon beta (IFNb), Interleukin 6 (IL6) und Interleukin 10 (IL10) waren nur in den Herzen der WT-Tiere vermehrt exprimiert. WT: n = 4, Rescue n = 3

In den Rescue-Tieren kam es nach intraperitonealer Inokulation zu keiner Infektion und entsprechend auch zu keiner Immunantwort, obwohl die Tiere das CAR-Protein aus dem Huhn im Herzen exprimieren. Daher war es denkbar, dass das Virus durch die Deletion von CAR in den anderen Geweben nicht bis zum Herzen vordringen kann. Um dies zu überprüfen, wurden intravenöse Infektionen durchgeführt (Abbildung 17). Der Virusnachweis mittels *in situ* Hybridisierung gegen die RNA des Coxsackievirus bestätigt die Infektion von Herz und Pankreas in den WT-Tieren. Die Herzen der Rescue-Tiere wurden auch nach intravenöser Inokulation nicht infiziert. Coxsackievirus-spezifische Antikörper wurden zwar in beiden Mausstämmen detektiert, in den WT-Tieren war die Antikörperproduktion durch die akute Infektion der Organe jedoch signifikant höher.



Abbildung 17: Intravenöse Inokulation mit CVB3.

CAR WT- und Rescue-Mäuse wurden intravenös mit 1×10^6 pfu CVB3 infiziert. 10 Tage nach der Infektion wurden die Organe sowie das Blut entnommen. (A) An Paraffinschnitten der Organe wurde eine *in situ* Hybridisierung gegen die RNA des Coxsackievirus durchgeführt. Replizierendes Virus war nur in Herz und Pankreas der WT-Tiere vorhanden. (B) Antikörper gegen das Coxsackievirus wurden über einen Serum ELISA nachgewiesen. In den WT-Tieren war die Antikörperproduktion deutlich höher als in den Rescue-Tieren. # stellt einen signifikanten Unterschied (P \leq 0,05) zu uninfizierten WT-Tieren dar (n = 4). WT: n = 4, Rescue n = 5

6.2.2 Virusreplikation in Abhängigkeit verschiedener CAR-Spezies

Die bisherigen Experimente weisen darauf hin, dass CAR aus dem Huhn die Funktion des Maus-Proteins im Herzen übernehmen kann. Eine Virusinfektion in vivo scheint es jedoch nicht zu vermitteln. Daher wurde die Virusinfektion und -replikation in Abhängigkeit verschiedener CAR-Spezies in vitro untersucht (Abbildung 18). Dazu wurden Chinese Hamster Ovary (CHO)-Zellen verwendet, von denen bekannt ist, dass sie kein CAR exprimieren (Kramer et al., 1997). Diese Zellen wurden mit dem humanen (hCAR), dem murinen (mCAR) und dem CAR aus dem Huhn transfiziert. 24 Transfektion Stunden nach der wurden die Zellen mit dem Coxsackievirus B3-Stamm Nancy infiziert. Der Nachweis der Virusreplikation erfolgte Stunden nach der Infektion durch ein Plaqueassay. Die Anzahl der 24 replikationsfähigen Viren wird dabei in plaque forming units (pfu) angegeben.



Abbildung 18: Virusreplikation in Abhängigkeit verschiedener CAR-Spezies. CAR negative CHO-Zellen wurden mit dem humanen (hCAR), dem murinen (mCAR) und dem *CAR* aus dem Huhn (chCAR) transfiziert. Nach Infektion mit dem Coxsackievirus B3-Stamm Nancy wurde ein Plaqueassay durchgeführt. (A) Replizierendes Virus war nur in den Zellen, die mit dem humanen und murinen CAR transfiziert wurden, detektierbar. Als Kontrolle wurden die Zellen auch mit dem CVB3-Stamm PD infiziert, der CAR unabhängig in die Zellen gelangt. Zudem wurde 4 Stunden nach der Infektion RNA aus den Zellen gewonnen. mCAR (B) und chCAR (C) waren nur in den entsprechend transfizierten Zellen vorhanden. (D) Eine signifikante Menge der CVB3-RNA entstand nur in den mCAR exprimierenden Zellen.

Da untransfizierte CHO-Zellen kein CAR exprimieren, konnte das Virus in diesen Zellen auch nicht replizieren. In CHO-Zellen, die mit dem humanen oder dem murinen CAR transfiziert wurden, repliziert das Virus hingegen effektiv. In den Zellen, die mit dem *CAR* aus dem Huhn transfiziert wurden, fand keine Virusreplikation statt. Als Kontrolle wurden untransfizierte CHO-Zellen mit dem Coxsackievirus B3-Stamm PD infiziert. Dieser Stamm entstand durch multiples Passagieren auf humanen Fibroblasten und kann Zellen unabhängig von CAR und dessen Korezeptor DAF infizieren (Schmidtke et al., 2000). Im Gegensatz zum CVB3-Stamm Nancy kann das CVB3 PD in untransfizierten CHO-Zellen replizieren, was im Plaqueassay deutlich zu erkennen war. Eine quantitative RT-PCR bestätigte, dass die Zellen nur das jeweils transfizierte CAR-Konstrukt exprimieren und untransfizierte CHO-Zellen frei von CAR sind. Die CVB3 RNA-Menge war in den mCAR positiven Zellen signifikant erhöht. Die Menge der CVB3 RNA in den chCAR positiven Zellen hingegen entspricht dem Hintergrund, der auch in den CAR negativen CHO-Zellen detektiert wurde.

Um die Unterschiede zwischen zellulärer und viraler Funktion von CAR zu erklären, wurden Sequenzanalysen durchgeführt (Abbildung 19). Dabei wurde insbesondere die D1-Region untersucht, da hier die Bindung zweier CAR-Moleküle, sowie die Bindung zwischen CAR und dem CVB3-Kapsid stattfindet (van Raaij et al., 2000; He et al., 2001; Patzke et al., 2010).

A	CAR-CVB3 Interaktion		
	hCAR mCAR chCAR	LSITTPEEMIEKAKGETAYLPCKFTLSPEDQGPLDIEWLISPADNQKVDQVIILYSGD LSITTPEQRIEKAKGETAYLPC <mark>KFTLSPEDQGP</mark> LDIEWLISPSDNQIVDQVIILYSGD LSITSAESAFEKAQGERVTLPCTFELSEEDVGTLDIEWVLIPADIQKKEETIILYSGD)****:.*. :***:** . ***.* ** ** *.*****:: *:* * ::.******78	
	hCAR mCAR chCAR	KIYDDYYPDLKGRVHFTSNDLKSGDASINVTNLQLSDIGTYQCKVKKAPGVANKKIHL KIYDNYYPDLKGRVHFTS <mark>ND</mark> VKSGDASINVTNLQLSDIGTYQCKVKKAPGVANKKIHL RIYNHYHPALAGRLQFTSSDPKSGDGSVDILNLKSADTGTYQCKVKKAPGVESLKIQL 9:**:.*:* * **::***.* ****.*::: **: :* ********	
в	CAR-CAR	Interaktion	
	hCAR mCAR chCAR	LSITTPEEMIEKAKGETAYLPCKFTLSPEDQGPLDIEWLISPADNQKVDQVIILYSGD LSITTPEQRIEKAKGETAYLPCKFTLSPEDQGPLDIEWLISPSDNQIVDQVIILYSGD LSITSAESAFEKAQGERVTLPCTFELSEEDVGTLDIEWVLIPADIQKKEETIILYSGD)****:.*. :***:** . ***.* ** ** *.****:: *:* * ::.*******78	
	hCAR mCAR chCAR	KIYDDYYPDLKGRVHFTSNDLKSGDASINVTNLQ <mark>L</mark> SDIGTYQCKVKKAPGVANKKIHL KIYDNYYPDLKGRVHFTSNDVKSGDASINVTNLQLSDIGTYQCKVKKAPGVANKKFLL RIYNHYHPALAGRLQFTSSDPKSGDGSVDILNLKSADTGTYQCKVKKAPGVESLKIQL):**:.*:* * **::***.* ****.*::: **: :* ********	

Abbildung 19: Sequenzanalysen der CAR-Bindungsstellen.

Die Sequenz der D1-Region des humanen CAR (hCAR) wurde mit den Sequenzen des CAR aus der Maus (mCAR) und dem Huhn (chCAR) verglichen. Publizierte Bindungsstellen mit dem Coxsackievirus B3 (nach He et al., 2001) (A) beziehungsweise mit einem anderen CAR-Protein (nach van Raaij et al, 2000 und Patzke et al., 2010) (B) wurden grau markiert. Übereinstimmende Aminosäuren wurden grün unterlegt.

Die Homologie zwischen dem humanen und dem murinen CAR ist sehr hoch. Das galline CAR weist jedoch einige Sequenzunterschiede auf. Dies trifft auch auf die Aminosäuren, die an der Interaktion zwischen CAR und CVB3 beteiligt sind, zu. Zwischen Mensch und Maus sind 24 von 27 (89%) publizierten Aminosäuren identisch. Die Sequenz des chCAR weist hingegen nur 17 übereinstimmende Aminosäuren auf (63%). Betrachtet man die Aminosäuren, die für eine Interaktion zwischen zwei CAR-Proteinen verantwortlich sind, zeigt sich eine 100%ige Übereinstimmung zwischen Mensch und Maus. Die AS der CAR-CAR-Interaktion sind jedoch zwischen allen drei Spezies hoch konserviert und zeigen mit 16 von 20 Aminosäuren (80%) auch im Huhn eine Homologie.

Zusammenfassend ist die CAR-Rescue-Maus vor einer Coxsackievirus B3-Infektion geschützt. Untersuchungen in CHO-Zellen bestätigten, dass die Expression von mCAR aber nicht chCAR Voraussetzung für eine Infektion mit Virusreplikation ist. Sequenzanalysen der CAR-Spezies zeigten deutliche Unterschiede in den Aminosäuren, die für eine CVB3-Bindung verantwortlich sind. Die AS einer CAR-CAR-Interaktion hingegen sind hoch konserviert.

6.3 CAR im Verlauf des Myokardinfarkts

6.3.1 Analyse der Umstrukturierungsprozesse nach Myokardinfarkt

Nach experimentellem Myokardinfarkt in der Ratte wurde eine Induktion von CAR in der Randzone des Infarkts beobachtet (Fechner et al., 2003). Die höhere CAR-Expression bleibt während der assoziierten Umbauprozesse bestehen. Daher sollte untersucht werden, welche Rolle CAR während des Myokardinfarkts und in den anschließenden Umstrukturierungsprozessen übernimmt.

Das verwendete Tiermodell - ein induzierbarer, kardialer CAR-KO wurde bereits publiziert (Lisewski et al., 2008). Zeitliche und örtliche Kontrolle der CAR-Defizienz ermöglicht das Tamoxifen-induzierbare Cre-Transgen (MerCreMer), das unter Kontrolle des herzspezifischen αMHC-Promotors exprimiert wird. Zur Induktion des kardialen Knockouts wurde den 7 Wochen alten Versuchstieren über einen Zeitraum von 2 Wochen Tamoxifen injiziert. Dies ermöglicht die Lokalisation der Cre-Rekombinase in den Kern und bewirkt damit die Deletion des *CAR* Exons 1. Nach einer weiteren Woche wurde ein Myokardinfarkt, durch Ligation des vorderen Seitenastes des *Ramus interventricularis anterior* induziert. Die Herzen wurden nach 2, 7 oder 30 Tagen entnommen. Als Wildtyp-Kontrolle dienten Cre-negative Tiere, die mit Tamoxifen behandelt wurden. Kontrolltiere ohne Myokardinfarkt wurden ebenfalls der Operation unterzogen, jedoch ohne dabei die Koronararterie zu Ligieren (Schein-OP).



Abbildung 20: CAR-abhängige Überlebensrate nach einem Myokardinfarkt.

(A) Zeitlicher Ablauf der Experimente. Induzierbare, herzspezifische CAR-KO- und Kontrolltiere wurden über einen Zeitraum von 2 Wochen zur Deletion von CAR mit Tamoxifen injiziert. Nach einer weiteren Wocher erfolgte die Ligation der Koronararterie (MI). Die Herzen wurden nach 2, 7 oder 30 Tagen analysiert. (B) In den KO-Tieren nach Schein-OP (Ktr.) und Infarkt war die Deletion von CAR deutlich. Die CAR-Expression war zwei Tage nach dem Myokardinfarkt im Randbereich des Infarkts signifikant hochreguliert. (C) Im restlichen linken Ventrikel (LV) bleibt sie unverändert. (D) Die Überlebensrate der kardialen CAR-KO-Mäuse war nach einem Myokardinfarkt signifikant höher als die der Vergleichsgruppe (D).

Bereits zwei Tage nach Ligation der Koronararterie war die CAR-Expression deutlich erhöht (Abbildung 20). Die Induktion war auf den Randbereich des Infarkts begrenzt. Die Expressions im restlichen linken Ventrikel blieb unverändert. Die Herzen der induzierbaren, herzspezifischen CAR-KO-Tiere wiesen eine deutliche Reduktion der CAR-Expression um ca. 90% auf. Die Expression in den KO-Herzen blieb auch nach dem Infarkt unverändert. Die Überlebensrate nach dem Infarkt zeigte signifikante Unterschiede zwischen WT- und kardialen KO-Mäusen. In der ersten Woche nach dem Infarkt starben etwa 30% der WT-Tiere. Die kardialen KO-Tiere hingegen überlebten nahezu alle diesen Zeitraum. Ab dem 7. Tag nach der Operation starben in beiden Gruppen keine weiteren Tiere.

In der Infarktregion der Knockout Herzen überlebten in der ersten Woche nach dem Infarkt mehr Kardiomyozyten als im Wildtyp Herzen (Abbildung 21). Entsprechend war die Infarktregion im Wildtyp sehr dünn und enthielt kaum Kardiomyozyten. Die Erhöhte Anzahl von Zellkernen ist auf einwandernde mononukleäre Zellen zurückzuführen. In den KO-Herzen war die Wand des linken Ventrikels in der Infarktregion noch deutlich dicker, bei verbessertem Überleben der Kardiomyozyten.



Abbildung 21: Morphologie der Infarktregion 7 Tage nach dem Infarkt

(A) CAR-WT- und KO-Herzen wurden 7 Tage nach der Induktion des Infarkts (MI) oder einer Schein-OP (Ktr.) entnommen und Paraffinschnitte angefertigt. Kardiomyozyten sind durch ein endogenes Titin DsRed rot markiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) eingefärbt. In den WT-Herzen ist Infarktregion dünner mit weniger Kardiomyozyten. (B) Die Wanddicke des linken Ventrikels wurde mit der Software ImageJ ausgemessen und ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen WT- und KO-Herzen festgestellt. WT Ktr. n = 4, KO Ktr. n = 4, WT MI n = 4, KO MI n = 4

Auch 30 Tage nach dem Infarkt sind die histologischen Unterschiede zwischen den WT- und KO-Herzen deutlich (Abbildung 22). In den WT-Herzen kam es zu einer exzentrischen Hypertrophie mit erhöhtem Kammervolumen bei gleichbleibender Wanddicke. Dies wurde durch die Messung des linksventrikulären Durchmessers bestätigt. Dieser war in den WT-Tieren nach dem Infarkt signifikant erhöht, wohingegen die Größe der KO-Herzen unverändert blieb. Eine Trichromefärbung verdeutlichte die Zusammensetzung des Gewebes in der Infarktregion. In den WT-Herzen setzte sie sich fast ausschließlich aus Kollagen zusammen, welches die abgestorbenen Kardiomyozyten ersetzte. Die Infarktregion der KO-Herzen bestand dagegen nur zu etwa 60% aus Kollagen, welches von intaktem Herzgewebe umgeben war. Entsprechend war die Wand des linken Ventrikels in der Infarktregion bei den KO-Tieren breiter und die Länge der Infarktregion geringer.



Abbildung 22: Histologie der Herzen 30 Tage nach dem Infarkt.

(A) Die Herzen von CAR-WT- und KO-Mäusen wurden 30 Tage nach dem Myokardinfarkt (MI) oder der Schein-OP (Ktr.) entnommen und Paraffinschnitte angefertigt. Die Schnitte wurden nach der Masson Trichrome Methode gefärbt. Verschiedene Parameter wurden mittels der Software ImageJ vermessen. (B) Der Durchmesser des linken Ventrikels war im Vergleich zu den Schein-operierten Tieren nur in den Wildtypen nach dem Infarkt erhöht. (C) Der Kollagengehalt (blau) in der Infarktregion war in den WT-Herzen deutlich höher als in den KO-Herzen. (D) Die Ventrikelwand in der Infarktregion war in den KO-Herzen dicker und (E) die Infarktregion signifikant kürzer. WT Ktr. n = 4, KO Ktr. n = 4, WT MI n = 4, KO MI n = 4

Durch die Hypertrophie der Herzen in den WT-Tieren kam es auch zu einem erhöhten Herzgewicht (Abbildung 23). Das Herzgewicht war in den WT-Tieren 30 Tage nach dem Infarkt signifikant erhöht. In den KO-Tieren war das Herzgewicht, im Vergleich zu den Schein-operierten Tieren nicht verändert. Jedoch waren die KO-Herzen auch ohne Myokardinfarkt leichter als die der WT-Kontrollen. Da das Körpergewicht zwischen den Genotypen unverändert war, zeigte das Verhältnis zwischen Herz- und Körpergewicht die gleiche Tendenz wie das Herzgewicht.



Abbildung 23: Messung des Herz- und Körpergewichts nach dem Infarkt.

(A) Das Herzgewicht (HG) von WT- und kardialen KO-Tieren wurde 30 Tage nach der Schein-OP (Ktr.) oder dem Myokardinfarkt (MI) mittels Echokardiographie bestimmt. Nur in den WT-Tieren war das Herzgewicht in Folge des Infarkts erhöht. Das Herzgewicht in den KO-Tieren war nach dem Infarkt unverändert, jedoch insgesamt geringer, als das der WT-Kontrolle. (B) Das Körpergewicht (KG) ist zwischen den Genotypen und nach dem Infarkt unverändert. (C) Das Verhältnis zwischen Herzgewicht und Körpergewicht ist mit der Tendenz des Herzgewichts vergleichbar. WT Ktr. n = 12, KO Ktr. n = 7, WT MI n = 11, KO MI n = 9

In der Echokardiographie wurde die Funktion der Knockout- im Vergleich zu den Wildtyp-Herzen nach Infarkt gemessen (Tabelle 20). Dazu wurde zunächst der Durchmesser des linken Ventrikels in der Diastole und Systole ermittelt. Beide Werte waren im WT nach dem Infarkt deutlich größer. Dies bestätigt die Hypertrophie der WT-Herzen, die schon in den histologischen Untersuchungen beobachtet wurde. In den KO-Herzen war ebenfalls ein erhöhter Durchmesser nach dem Infarkt gemessen worden, allerdings war die Vergrößerung des Herzens hier signifikant geringer als bei den WT-Tieren. Wie beim Herzgewicht wurden auch beim Durchmesser des linken Ventrikels bereits Genotyp-spezifische Unterschiede in den Tieren ohne Infarkt beobachtet. Entsprechend des geringeren Herzgewichtes hatten die Herzen auch eine geringere Ausdehnung.

Aus dem Durchmesser des linken Ventrikels in der Diastole und der Systole wird das *fractional shortening* (FS) errechnet, das somit Auskunft über die Pumpfunktion des Herzens gibt. Der stark erhöhte systolische Durchmesser in den WT-Herzen ist konsistent mit einer verminderten Pumpfunktion nach dem Infarkt. In den KO Herzen war das FS nicht signifikant verändert. Die *ejection fraction* beschreibt den prozentualen Anteil des Blutes, das während der Systole aus dem Herzen gepumpt

wird. Auch dieser Wert verschlechterte sich nur in den WT-Tieren nach dem Infarkt signifikant.

	WT Ktr. (n = 12)		KO Ktr. (n = 7)		WT MI (n = 11)			KO MI (n = 9)		
KG [g]	28,88	± 1,00	28,50	± 1,25	29,58	± 0,96		29,82	± 0,79	
HG [mg]	162,30	± 8,07	118,87	± 15,55	198,34	± 12,86	*	143,18	± 10,52	
HG/KG [mg/g]	5,62	± 0,20	4,14	± 0,43	6,70	± 0,35	*	4,84	± 0,39	
LVD Diastole [mm]	4,66	± 0,11	3,96	± 0,21	5,26	± 0,14	**	4,53	± 0,11	*
LVD Systole [mm]	3,51	± 0,08	2,98	± 0,19	4,34	± 0,13	***	3,57	± 0,09	*
FS [%]	24,72	± 0,73	24,88	± 1,98	17,64	± 0,86	***	21,01	± 1,04	
EF [%]	48,81	± 1,35	49,86	± 3,49	36,95	± 1,75	***	42,59	± 1,94	

Tabelle 20: Kardiale Funktion 30 Tage nach dem Myokardinfarkt.

Ktr.: Schein-operierte Kontrolle, MI: Myokardinfarkt, KG: Körpergewicht, HG: Herzgewicht, LVD: linksventrikulärer Durchmesser, FS: *fracional shortening*, EF: *ejection fraction*

6.3.2 Molekulare Veränderungen nach Myokardinfarkt

Durch molekulare Analysen sollten die zugrundelegenden Mechanismen der beobachteten Unterschiede in den Umstrukturierungsprozessen nach einem Myokardinfarkt geklärt werden.

In einem genomweiten Screen wurde die Transkriptionsrate einer Vielzahl von Genen ermittelt. Dazu wurde die RNA aus den linken Ventrikeln 7 Tage nach experimentellen Myokardinfarkt oder Schein-OP von WT- und KO-Herzen isoliert. Nach Bestimmung der Expressionslevel in Illumina Chip-Assays wurden Gene ermittelt, die signifikant reguliert und in WT- und KO-Herzen mindestens 30% differentiell exprimiert waren. Unter Verwendung der Software Cytoscape wurden diese Gene einem molekularen Mechanismus zugeordnet (Abbildung 24). Zwischen WT- und KO-Herzen nach einem Myokardinfarkt waren eine Vielzahl von Genen unterschiedlich reguliert, die an intrazellulären Proteinkinase-Kaskaden beteiligt sind. Entsprechend waren auch der Nukleotidstoffwechsel, die Regulation der Transkription oder die RNA-Prozessierung unterschiedlich reguliert. Unterschiede in der Differenzierung von Myeloidzellen und der Entwicklung von Blutgefäßen deuten Ungleichheiten in der Geweberegeneration hin. Auch Proteine der auf Zytoskelettorganisation waren unterschiedlich exprimiert.


Differenzierung von Myeloidzellen

Abbildung 24: Expressionsunterschiede nach einem Myokardinfarkt.

7 Tage nach experimentellem Myokardinfarkt wurde die RNA aus den linken Ventrikeln von WT- und KO-Herzen isoliert und für einen genomweiten Screen mittels Illumina Chip-Assays verwendet. Die Gene mit signifikanten (p>0,05) Unterschieden von mindestens 30% wurden mit des Software Cytoscape molekularen Mechanismen zugeordnet. WT MI n = 5, KO MI n = 5

Die Expression von CAR bestätigte die Deletion in den KO-Herzen (Abbildung 25). Zwischen den Tieren mit Schein-OP und Myokardinfarkt unterschied sich die Menge der CAR-mRNA nicht. Da für diese Analysen der ganze linke Ventrikel verwendet wurde, entspricht dies den Daten der RT-PCR.

Hypoxia Induced Factor 1 alpha (HIF1α) war eines der differentiell regulierten Gene im Vergleich von WT und KO Herzen nach Infarkt. Als Transkriptionsfaktor induziert HIF1α nach einer Unterversorgung mit Sauerstoff die Expression von Genen, die an einer Antwort auf den Infarkt beteiligt sind. Der Hypoxiemarker HIF1α war nur in den WT-Herzen induziert, die Expression in KO-Herzen war unverändert. Ähnlich reguliert war das Angiotensin Converting Enzyme (ACE), ein zentrales Protein des Renin-Angiotensin-Systems, welches in verschiedenen Herzkrankheiten aktiviert wird. ACE spaltet das Angiotensin I in seine aktive form Angiotensin II. Der Angiotensin Rezeptor 1 (AGTR1), der als zellulärer Rezeptor für das Angiotensin II dient, war ebenfalls nur in den WT-Tieren nach dem Infarkt vermehrt exprimiert.



Abbildung 25: Expressionslevel relevanter Gene nach einem Myokardinfarkt.

7 Tage nach dem Myokardinfarkt wurde die RNA aus den linken Ventrikeln von WT- und KO-Herzen isoliert und für einen genomweiten Screen mittels Illumina Chip-Assays verwendet. (A) Die CAR-Expression bestätigt den kardialen KO. (B) Der Hypoxiemarker Hypoxia Induced Factor 1 alpha (HIF1 α) war nur in den WT-Herzen nach Myokardinfarkt induziert. Auch die Komponenten des Renin-Angiotensin-Systems (C) das Angiotensin Converting Enzyme (ACE) und (D) der Angiotensin Rezeptor 1 (AGTR1) waren in den WT- und KO-Herzen nach dem Myokardinfarkt unterschiedlich exprimiert. WT Ktr. n = 3, KO Ktr. n = 3, WT MI n = 5, KO MI n = 5

HIF1α und ACE waren auch auf Proteinebene induziert (Abbildung 26). Da in dem Assay viele Proteine von intrazellulären Proteinkinase-Kaskaden reguliert waren, wurde auch die Phosphorylierung der Extracellular Regulated Kinase 1/2 (ERK) überprüft. Als zentrale Kinase in der Zellproliferation spielt ERK eine wichtige Rolle in intrazellulären Signalkaskaden, die zu einer Hypertrophie des Herzens führen (Vidal et al., 2012). Die phospgorylierte, aktive Form von ERK ist in den WT-Herzen nach dem Infarkt deutlich erhöht.



Abbildung 26: Westernblot-Analysen veränderter Gene.

Die Proteinexpression der veränderten Gene wurde mittels Westernblot analysiert. Die Proteine HIF1α und ACE zeigten eine erhöhte Expression in WT-Herzen nach dem Infarkt. Auch die Phosphorylierung der Extracellular Regulated Kinase 1/2 (ERK) war erhöht.

Die Expressionslevel der *gap junction* Proteine Connexin 43 (CX43) und Connexin 45 (CX45) wurden bestimmt (Abbildung 27), da Connexine mit der Ausbreitung der Gewebeschädigung und somit der Infarktgröße nach lokaler Ischämie in Verbindung gebracht wurden (Kanno et al., 2003). Eine quantitative RT-PCR 7 Tage nach dem Infarkt zeigte keine Unterschiede in der mRNA-Menge von CX43. Die Expression von CX45 hingegen war in den KO-Herzen deutlich geringer als in den WT-Kontrollen.



Abbildung 27: Expression der Connexine in WT- und KO-Herzen.

Die mRNA von CAR-WT- und KO-Herzen wurde 7 Tage nach experimentellem Myokardinfarkt bzw. Schein-OP isoliert. Durch eine quantitative RT-PCR wurde die mRNA-Menge der *gap junction*-Proteine Connexin 43 (CX43) und Connexin 45 (CX45) bestimmt. Die Expression von CX43 war unverändert, CX45 war in den KO-Herzen deutlich geringer exprimiert. WT Ktr. n = 3, KO Ktr. n = 3, WT MI n = 3, KO MI n = 3

Die *in vivo* Analysen haben ergeben, dass eine Deletion von CAR im Herzen positive Auswirkungen auf die Folgen eines Infarkts hat. Der kardiale KO von CAR führte zu einer höheren Überlebensrate nach dem Myokardinfarkt. Die KO-Herzen hatten weniger pathologische Veränderungen sowie eine bessere Herzfunktion. Auf molekularer Ebene kam es nur in den WT-Herzen zu einer Aktivierung von Hypoxie-induzierten Signalkaskaden. In den KO-Herzen waren die Folgen des Myokardinfarkts insgesamt gering. Somit ist eine Deletion von CAR förderlich für den Verlauf eines Myokardinfarkts, was CAR zu einem Angriffspunkt bei Therapien macht.

7 Diskussion

Der Coxsackievirus- und Adenovirus-Rezeptor (CAR) lokalisiert in den Glanzstreifen des Herzens. Als Rezeptor für das Coxsackievirus B3 spielt CAR eine wichtige Rolle in der Pathogenese inflammatorischer Herzkrankheiten (Kühl et al., 2005; Shi et al., 2009) und als Zell-Kontakt-Protein ist CAR essentiell für die kardiale Entwicklung und Funktion (Asher et al., 2005; Chen et al., 2006; Lim et al., 2008; Lisewski et al., Die CAR Autoimmunmyokarditis, 2008). Induktion von bei dilatativer Kardiomyopathie und nach Myokardinfarkt weist außerdem auf eine Funktion von CAR im erkrankten Herzen hin (Fechner et al., 2003; Ito et al., 2000; Noutsias et al., 2001).

Der Coxsackievirus- und Adenovirus-Rezeptor ist somit ein multifunktionelles Protein, das die Entwicklung, Funktion und Erkrankung des Herzens beeinflussen kann. In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle von CAR in kardialen Umstrukturierungsprozessen während der Embryonalentwicklung, bei Coxsackievirus B3-Infektion und nach Myokardinfarkt in unterschiedlichen Mausmodellen untersucht.

7.1 Die kardiale Expression von CAR rettet den letalen CAR-KO-Phänotyp

Um die Funktion von CAR *in vivo* zu untersuchen, wurden bereits unterschiedliche KO-Modelle hergestellt, bei denen das Exon 1 oder das Exon 2 fehlt. Die Deletion des ersten Exons im *CAR*-Gen entfernt das Startcodon, wodurch das Gen nicht mehr translatiert wird. Die Deletion des Exons 2 verschiebt das Leseraster, was zu einem Transkriptionsabbruch nach 75 Basen führt. Das entstandene Produkt wurde als funktionslos beschrieben (Asher et al., 2005). Alle konventionellen CAR-KO-Modelle sind embryonal letal - zwischen dem Tag 11,5 und 13,5 nach der Befruchtung (Asher et al., 2005; Chen et al., 2006; Dorner et al., 2005; Lim et al., 2008). Das Ausschalten von CAR führt zu Herzfehlbildungen in den Embryonen. Ultrastrukturelle Analysen zeigten unorganisierte und weniger dichte Myofibrillen im Herzen der Exon1 Knockouts. Außerdem kam es zu Ödemen (Dorner et al., 2005). Die Deletion des Exons 2 führte zur embryonalen Letalität an Tag E11,5 mit vermehrtem Zelltod der Kardiomyozyten und Degeneration der Herzwände mit kardialen Einblutungen (Asher

et al., 2005). In einem unabhängigen Exons 2 Knockout mit Letalität an Tag E11,5 wurde zusätzlich eine Hyperplasie des linken Ventrikels festgestellt (Chen et al., 2006).

Aufgrund der Letalität konventioneller CAR-KO-Tiere wurden verschiedene herzspezifische Knockouts hergestellt. Diese unterscheiden sich in der KO-Strategie und den Auswirkungen der CAR-Deletion. Die Verwendung der kardialen Troponin T (TNT) -Cre-Linie führte zu dem Phänotyp des konventionellen KOs. Es kam zu einer Hyperplasie des linken Ventrikels und embryonaler Letalität an Tag E11,5 (Chen et al., 2006). Die Deletion von CAR durch die Myosin Heavy Chain (MHC) - Cre-Linie wurde von drei Gruppen beschrieben. Das Entfernen des CAR Exons 1 führte zum Tod aller Embryonen (Lisewski et al., 2008). Nach Deletion des Exons 2 erreichten 20% (Chen et al., 2006) bzw. alle Tiere das Erwachsenenalter. (Lim et al., 2008). Die unterschiedlichen Phänotypen nach der Deletion von CAR durch die MHC-Cre könnten mit den verschiedenen KO-Strategien oder mit Unterschieden im genetischen Hintergrund der Tiere zusammenhängen Offenbar ist der Zeitpunkt der Cre-Aktivität von großer Bedeutung für die Schwere des Phänotyps. Die TNT-Cre ist etwa ab dem Tag E9 aktiv und führt zur embryonalen Letalität. Die MHC-Cre ist erst ca. 2 Tage später aktiv und führt zu unterschiedlichen Phänotypen. Vermutlich ist der Tag E11 ein kritischer Wendepunkt in der CAR-abhängigen Entwicklung des Herzens und CAR nach diesem Zeitpunkt nicht mehr essentiell. So hat die Deletion von CAR ab dem Tag E13,5 (Mirza et al., 2012), in 2 Wochen alten Mäusen (Pazirandeh et al., 2011) oder in adulten Tieren (Lisewski et al., 2008) keinen Einfluss auf das Überleben der Tiere.

Anhand der beschriebenen CAR-Knockout-Mäuse kann auf eine wichtige Funktion von CAR in der frühen Embryonalentwicklung geschlossen werden. Daher stellte sich die Frage, ob eine alleinige Expression von CAR im Herzen ausreichend ist, um den embryonal letalen Phänotyp zu retten. Um dies zu überprüfen, wurde eine Maus erzeugt, die CAR unter Kontrolle des Myosin Light Chain (MLC) 2-Promotors exprimiert. Der MLC 2-Promotor wurde gewählt, da er ausschließlich in den Myozyten des Herzens aktiv ist und die zeitliche Regulation der des *CAR*-Gens entspricht. Die Aktivität des Promotors wurde mittels eines Luziferasekonstruktes untersucht (Franz et al., 1993). An Tag E9 ist der Promotor bereits aktiv. Ab Tag E15 nimmt das Expressionsniveau stetig ab und verbleibt ab dem 15. Tag nach der Geburt auf einem sehr geringen Niveau. Die CAR-mRNA ist im Embryo bereits ab

73

Tag E7 nachweisbar (Asher et al., 2005). Sowohl die CAR mRNA, als auch das Protein ist in großen Mengen im embryonalen Herzen vorhanden und beide werden ab etwa 7 Tage nach der Geburt deutlich herunterreguliert (Fechner et al., 2003; Ito et al., 2000; Kashimura et al., 2004). Somit entspricht die Aktivität des MLC 2-Promoters der beschriebenen Regulation von CAR im Herzen.

Zur Erzeugung des neuen Mausstammes wurde zunächst eine transgene Maus hergestellt, die CAR aus dem Huhn unter Kontrolle des MLC 2-Promotors exprimiert. Durch die Verwendung einer anderen CAR-Spezies kann das transgene chCAR vom endogenen CAR eindeutig sowohl auf RNA- als auch auf Protein-Ebene unterscheiden werden. Die transgenen Tiere wurden anschließend mit heterozygot CAR-defizienten Tieren verpaart, um CAR-KO-Tiere mit der transgenen Expression des chCAR im Herzen zu erhalten. Die Genotypisierung des Nachwuchses bestätigte, dass CAR-KO-Tiere mit der Expression des chCAR im Herzen überlebensfähig sind. KO-Tiere ohne das Transgen sterben während der Embryonalentwicklung. Der Mausstamm wird daher als kardialer Rescue (Rettung) des CAR-Knockouts bezeichnet. Zur Überprüfung des Mausstamms wurde das Expressionsniveau der beiden CAR-Spezies bestimmt. Das endogene CAR der Maus (mCAR) kann durch die Deletion des Exons 1 nicht mehr exprimiert werden. Das schwache Signal, welches in der RT-PCR detektiert wurde, entspricht dem Hintergrund, der aufgrund der niedrigen Expression von CAR im adulten Tier recht hoch ist. Das transgene chCAR war nur in den Herzen der Rescue-Tiere exprimiert. Somit wurde erstmals nachgewiesen, dass die alleinige Expression von CAR im Herzen ausreichend ist, um das Überleben der CAR-KO-Embryonen sicherzustellen.

7.2 CAR-Rescue-Tiere entwickeln sich normal

Die Entwicklung bis ins Erwachsenenalter verlief in den CAR-Rescue-Tieren unauffällig. Im Alter von 10 Wochen hatten die Rescue-Tiere ein normales Körpergewicht und die prozentualen Anteile von Muskelmasse, freiem Wasser und von Fett waren vergleichbar mit denen von WT-Tieren. Die Herzen wiesen keine morphologischen Veränderungen auf und das Verhältnis zwischen Herzgewicht und Körpergewicht war normal. Bei ultrastrukturellen Analysen der Herzen konnten keine Veränderungen festgestellt werden, welche infolge einer veränderten CAR Expression in anderen Tiermodellen vorkommen. So waren im konventionellen CAR-KO Mitochondrien vergrößert und die Myofilament-Bündel schmaler (Dorner et al., 2005). In einem kardialen CAR-KO waren die Glanzstreifen und deren Verbindung zu den Myofilamenten verändert (Lim et al., 2008). Bei einer Überexpression von CAR wurden ebenfalls Veränderungen der Glanzstreifen beobachtet (Caruso et al., 2010). Da es bei den CAR-Rescue-Tieren zu keinen morphologischen sowie ultrastrukturellen Veränderungen kam, ist von einer korrekten Entwicklung der Herzen vom Embryo bis zum adulten Tier auszugehen.

Mögliche Funktionen von CAR in anderen Geweben, wie sie von verschiedenen Arbeitsgruppen beschrieben wurden, können ohne weitere Untersuchungen nicht ausgeschlossen werden. CAR-mRNA und -Protein sind in den Sertoli- und Keimzellen der Hoden stark exprimiert (Mirza et al., 2007). Das Protein lokalisiert auch in den Akrosomen humaner und muriner Spermien (Mirza et al., 2006). Daher wurde eine Funktion von CAR in der Ausbildung der Blut-Hoden-Schranke, der Einwanderung von Keimzellen in den Samenkanal und in der Befruchtung der Eizelle vermutet. Die Permeabilität der Blut-Hoden-Schranke sowie die Reifung, Einwanderung und Befruchtung der Spermien wurde im CAR-Rescue nicht näher untersucht. Da die Tiere Nachwuchs erzeugen, kann eine essentielle Funktion von CAR in der männlichen Fertilität jedoch ausgeschlossen werden.

Durch eine Tamoxifen-induzierbare Cre-Linie unter Kontrolle eines ubiquitär aktiven Promotors wurde das CAR Exon 2 in einer Vielzahl von Geweben entfernt. Die Deletion von CAR in 2 Wochen alten Tieren führte zu einem vergrößerten Intestinaltrakt sowie einer Atrophie des exokrinen Pankreas (Pazirandeh et al., 2011). Dies wurde in den CAR-Rescue-Tieren nicht beobachtet. Auch in einem pankreasspezifischen CAR-KO kam es zu keinen Veränderungen des Pankreas (Kallewaard et al., 2009). Die Veränderungen des Pankreas könnten mit einer Pankreatitis durch die Verabreichung von Tamoxifen in Verbindung stehen, wie bereits in Patienten beobachtet (Elisaf et al., 2000; Kanel et al., 1997). Im gleichen Tiermodell wurde eine Deletion von CAR in der Embryonalentwicklung durch eine Tamoxifeninjektion der Mutter untersucht. Die Deletion ab dem Tag E13,5 hatte dabei keine Auswirkungen auf die embryonale Entwicklung. Die Deletion von CAR ab Tag E12,5 hingegen führte zu Hämorrhagien und die Embryonen starben am Ende der Schwangerschaft. Erklärt wurde dies durch Defekte im lymphatischen System und durch eine unzureichende Trennung von Lymph- und Blutgefäßen (Mirza et al., 2012). Dieser Phänotyp war CAR-Rescue-Tieren nicht vorhanden. Es ist denkbar, dass die Hämorrhagien durch Defekte in der kardialen Entwicklung hervorgerufen werden. So könnte die Fehlentwicklung der Herzen zu Veränderungen im Blutkreislauf-System führen, was wiederum Defekte in der Trennung von Blut- und Lymphgefäßen bewirkt.

Aufgrund der Lokalisation von CAR in den Epithelzellen adulter Mäuse und der Kolokalisation mit anderen *tight junction*-Proteinen wurde CAR eine wichtige Funktion in der Regulierung der Gewebepermeabilität zugesprochen (Raschperger et al., 2006). Außerdem ist CAR an der Migration von Neutrophilen beteiligt ist. Dabei kommt es zu einer Interaktion von CAR in den *tight junctions* mit dem Junctional Adhesion Molecule-Like Protein (JAML) auf der Oberfläche von Neutrophilen. In Zellkultur ist die Migration von Neutrophilen durch einen Monolayer von polarisierten Epithelzellen nach der Blockierung von CAR und JAML durch Peptide oder Antikörper stark vermindert (Zen et al., 2005).

Um nicht kardiale Funktionen von CAR wie beispielsweise in der männlichen Fertilität oder der Gewebepermeabilität in vivo zu überprüfen, wurde der CAR-Rescue geschaffen. Da die Rescue-Tiere sich normal entwickeln, kann CAR ausserhalb des Herzens jedoch nicht von essentieller Bedeutung für den Organismus sein.

7.3 CAR aus dem Huhn kann die kardiale Funktion des murinen CAR ersetzen

Nach der kardialen Entwicklung wurde auch die Funktion des adulten Herzens der CAR-Rescue-Tiere untersucht. Die Echokardiographie ergab keine veränderte Pumpfunktion der Herzen. Die kontraktile Funktion - gemessen als fractional shortening und ejection fraction - war in den Rescue-Tieren nicht verändert. Die Untersuchung der elektrischen Funktion der Herzen erfolgte mittels Elektrokardiogramm. Dabei wurden die Intervalle zwischen verschiedenen Phasen des EKGs sowie deren Amplituden gemessen. Bei den kardialen CAR-KO-Tieren war die Reizweiterleitung von den Atrien zu den Ventrikeln verändert (AV-Block)(Lim et al., 2008; Lisewski et al., 2008; Pazirandeh et al., 2011). Bei einem AV-Block befindet sich die P-Welle in veränderten Abständen zum QRS-Komplex, was sich in einem erhöhten PR-Interwall wiederspiegelt. Die Deletion des CAR Exons 2 durch die MHC-Cre führte in den KO-Herzen nicht aber in heterozygot defizienten Herzen zu einem AV-Block (Lim et al., 2008). Da es nach Deletion des CAR Exons 1 durch

die MHC-Cre zur embryonalen Letalität kommt, wurde eine Tamoxifen-induzierter Cre-Linie zur Deletion von CAR im Herzen verwendet. Dabei stieg der Grad des AV-Blocks mit der Zeit nach der Tamoxifeninjektion. Während zu Beginn der Injektion alle Tiere ein normales EKG vorwiesen, war nach einer Woche bereits bei einigen Tieren ein AV-Block ersten Grades festzustellen. 4 Wochen nach Beginn der *CAR*-Deletion wiesen alle kardialen CAR-KO-Tiere ein verändertes EKG auf (Lisewski et al., 2008). Der AV-Block kann durch eine verminderte Expression des *gap junction*-Proteins Connexin 45 (CX45) in den CAR-KO-Herzen erklärt werden (Lim et al., 2008; Lisewski et al., 2008). CX45 ist besonders im AV-Knoten für die Weiterleitung des elektrischen Signals wichtig. In den CAR-Rescue-Tieren war das EKG unverändert.

Das Herz der CAR-Rescue-Tiere entwickelt sich über die Embryonalphase hinaus und zeigt eine unveränderte mechanische und elektrische Funktion. Somit kann die zelluläre Funktion des murinen CAR-Proteins im Herzen durch das CAR aus dem Huhn ersetzt werden.

7.4 Kardiale Veränderungen infolge der Überexpression von CAR sind dosisabhängig

Bei der Generierung der chCAR transgenen Tiere, welche zusätzlich zum endogenen CAR das chCAR im Herzen exprimieren, kam es zu dosisabhängigen Effekten. Nach der Mikroinjektion des Konstrukts gab es mehrere positive Founder, von denen einige noch vor dem Erreichen der Geschlechtsreife verstarben. Eine quantitative RT-PCR ergab eine deutlich erhöhte Expression des Transgens im Vergleich zum Nachwuchs überlebender Founder. Die Todesursache wurde nicht weiter untersucht, sie scheint allerdings direkt mit der erhöhten Expression von CAR zusammenzuhängen. Dies steht im Einklang mit einem Tiermodell, das CAR im Herzen unter dem MHC-Promoter überexprimiert. Dort war die Expression von CAR um das 6-fache erhöht. Diese Tiere entwickelten eine Kardiomyopathie und starben innerhalb von 4 Wochen nach der Geburt. Eine Hypertrophie des Herzen führte ein erhöhtes Verhältnis des Herzgewichts zum Körpergewicht mit sich. Außerdem waren Kardiomyozyten desorganisiert und degeneriert. Ultrastrukturell wurden die Veränderungen in den Glanzstreifen der Kardiomyozyten festgestellt (Caruso et al., 2010). Die chCAR transgenen Tiere mit geringerer Expression des Transgens entwickelten sich hingegen normal und unauffällig Die Herzen dieser Mäuse wiesen keine morphologischen Unterschiede, eine normale Funktion und keine ultrastrukturellen Veränderungen auf.

Die Effekte einer Überexpression von CAR scheinen somit dosisabhängig zu sein. Eine starke Überexpression von CAR im Herzen kann eine Kardiomyopathie mit Hypertrophie des Herzens auslösen, was zum Tod der Tiere führt. Eine geringe Überexpression in den chCAR transgenen Tieren, hat hingegen keine Auswirkungen auf die kardiale Entwicklung und Funktion.

7.5 Der herzspezifische CAR-Rescue ist vor einer CVB3-Infektion geschützt

Neben der Rolle von CAR in der kardialen Entwicklung und Funktion wurde auch die Funktion als viraler Rezeptor im CAR-Rescue untersucht. Durch die Infektion dieser Tiere sollten Erkenntnisse über die Pathogenese der virusinduzierten Myokarditis in Abhängigkeit von CAR gewonnen werden. Nach intraperitonealer Inokulation der Tiere kam es zu keinen Läsionen in Herz, Pankreas, Milz, Leber, Niere oder Lunge. Auch molekulare Untersuchungen der Herzen konnten keine Anzeichen einer Infektion in den CAR-Rescue-Tieren nachweisen. Bei WT-Tieren hingegen waren Herz und Pankreas infiziert, was durch eine in situ Hybridisierung gegen die RNA des Coxsackievirus bestätigt wurde. Aus Infektionsstudien in der Maus ist bekannt, dass das Herz und das Pankreas zu den primären Zielorganen des CVB3 gehören (Kallewaard et al., 2009; Shi et al., 2009). Über eine in situ Hybridisierung konnte eine CVB3-Infektion nur in Herz, Pankreas und Milz nachweisen werden. Darm, Leber, Lunge und Niere waren frei von Virus (Shi et al., 2009). Durch einen Plaqueassay wurden ebenfalls in Herz und Pankreas die höchsten Virustiter detektiert, aber auch in Leber und Milz waren geringe Virusmengen nachweisbar (Kallewaard et al., 2009).

Da es zu keiner Virusreplikation in den Organen der Rescue-Tiere kam, wurde das Serum der infizierten Tiere auf eine Immunreaktion hin untersucht. Eine Immunreaktion in den Rescue-Tieren könnte auf eine milde Infektion hinweisen, die eventuell nicht in der Histologie zu sehen ist. Bei den WT-Tieren war das Chemokin Regulated on Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted (RANTES) 4 Tage nach der Infektion deutlich induziert. Auch 10 Tage nach der Infektion war die Expression noch höher als in den Rescue-Tieren, bei denen RANTES nicht induziert war. Coxsackievirus B3-spezifische Antikörper waren in den Rescue-Tieren nicht nachzuweisen. In den WT-Tieren waren diese bereits 4 Tage nach der Infektion vorhanden, ihre Zahl war 10 Tage nach der Infektion noch deutlich höher. Dies entspricht dem normalen Verlauf der Immunantwort nach einer Coxsackievirus-Infektion. Innerhalb der ersten 4 Tage nach der Infektion kommt es zu einer Lyse von Kardiomyozyten durch das Virus. Dadurch wird das angeborene Immunsystem aktiviert und Zytokine freigesetzt. Anschließend erfolgt eine zunehmende Aktivierung der spezifischen Immunantwort. Dabei reifen die B-Zellen zu Antikörper freisetzenden Plasmazellen (Andréoletti et al., 2009).

Bei den Rescue-Tieren waren keine histologischen oder immunologischen Anzeichen einer Infektion vorhanden. Infektionsstudien an organspezifischen CAR-KO-Tieren belegen eine wichtige Funktion von CAR in der CVB3-Infektion. Die Deletion von CAR durch eine Pankreas-spezifische Cre-Linie führte zu einer deutlich geringeren Viruslast im Pankreas. Die Virus-Titer, die durch ein Plagueassay bestimmt wurden, waren im CAR-KO-Pankreas 1000-fach geringer als in den WT-Kontrollen. Histologisch waren wenige Läsionen und nur geringe Anzeichen einer Pankreatitis zu sehen. In Herz, Milz oder Leber hingegen blieb der Infektionsverlauf unverändert (Kallewaard et al., 2009). Die geringe Infektion des Pankreas in dieser Maus könnte mit einer nicht vollständigen Deletion von CAR durch die PDX-Cre-Linie zusammenhängen. Nach Deletion von CAR im Herzen waren ebenfalls keinerlei Läsionen, virale RNA oder das Kapsidprotein VP1 nachweisbar. Entsprechend war auch die Immunantwort im Herzen signifikant geringer als in den WT-Kontrollen. Auch die kardiale Funktion blieb nach Infektion der herzspezifischen CAR-KO-Tiere erhalten (Shi et al., 2009). Allerdings wurden geringe Virusmengen über einen Plaqueassay nachgewiesen. Ein Zellkulturexperiment mit primären Kardiomyozyten ergab jedoch, dass diese Viren vermutlich aus Zellen im Herzen stammen, die keine Kardiomyozyten sind (Kallewaard et al., 2009). Die Infektion von Pankreas und Milz und auch die Virustiter von Pankreas, Milz und Leber waren unverändert (Kallewaard et al., 2009; Shi et al., 2009). Aus diesen Experimenten geht hervor, dass die Deletion von CAR in einem Organ dieses vor einer Infektion schützt. Dies hat jedoch keinen Einfluss auf die Infektion anderer Organe. Somit hängt der Schutz vor einer Infektion in den CAR-Rescue-Herzen nicht mit der Deletion von CAR in anderen Organen zusammen.

Da in den Rescue-Tieren CAR in alle Geweben deletiert ist, war es denkbar, dass das Virus nach einer intraperitonealen Infektion nicht bis zu den Kardiomyozyten des Herzens vordringen kann. Daher wurde eine intravenöse Inokulation mit dem Virus vorgenommen. Auch bei dieser Applikationsart kam es zu keiner Infektion der Herzen in den Rescue-Tieren. ES wurden weder Läsionen, noch virale RNA Blut der Rescue-Tiere kam es nachgewiesen. Im zu einer geringen Antikörperproduktion. Diese war deutlich geringer als in den WT-Kontrollen. Vermutlich sind die Antikörper eine Reaktion auf das zirkulierende Virus im Blut, denn auch bei nicht replizierendem Virus kommt es zu einer Immunreaktion. Nach einer Immunisierung von Mäusen mit leeren Coxsackievirus B3-Hüllen, die nur aus den vier Strukturproteinen VP1 - VP4 bestehen, wurde eine deutliche Antikörperproduktion nachgewiesen (Zhang et al., 2012). Die beobachtete Antikörperproduktion in den Rescue-Tieren nach intravenöser Inokulation war also vermutlich nicht Folge einer Virusinfektion, sondern wurde von zirkulierendem Virus in Blut hervorgerufen.

Die durchgeführten Experimente belegen somit, dass die CAR-Rescue-Tiere vor einer Coxsackievirus B3-Infektion geschützt sind.

7.6 CAR aus dem Huhn ermöglicht keine Virusreplikation

In den CAR-Rescue-Tieren kam es zu keiner Virusinfektion des Herzens, obwohl dort CAR aus dem Huhn exprimiert wird. Dies lässt vermuten, dass chCAR keine Virusreplikation ermöglicht. Um dies zu überprüfen, wurden *in vitro*-Studien an *Chinese Hamster Ovarian* (CHO)-Zellen durchgeführt. Von CHO-Zellen ist bekannt, dass sie kein CAR exprimieren und nicht von CVB3 infizierbar sind (Kramer et al., 1997). Für das Experiment wurden CHO-Zellen mit dem *CAR* des Menschen, der Maus und des Huhns transfiziert und anschießend mit CVB3 infiziert. In den Zellen mit dem murinen und humanen CAR wurden hohe Virustiter detektiert. In Zellen, die mit dem *CAR* aus dem Huhn transfiziert wurden, war jedoch, wie in den untransfizierten Zellen, kein Virus nachzuweisen. Auch die virale RNA war in den chCAR transfizierten Zellen nicht detektierbar. Daher kann angenommen werden, dass CAR aus dem Huhn keine Virusinternalisation ermöglicht.

Das Coxsackievirus B3 ist als humanes Pathogen bekannt. Zu Übertragungen auf andere Spezies kommt es nur selten (Modrow et al., 2010). Neben Infektionen des Menschen sind Infektionen in anderen Primaten beobachtet worden. So wurde nach dem Tod eines Stumpfnasenaffens (Rhinopithecus roxellana) Coxsackievirus B3 im Herzen des Tieres nachgewiesen. Die ermittelte Genomsequenz (He et al., 2009) zeigte eine Homologie von 93% zu einem humanen CVB3-Isolat (He et al., 2012). Auch andere Primaten waren mit diesen Virusisolat infizierbar (Han et al., 2012). Experimentell konnten Paviane (Papio papio) mit einem murinen CVB3-Stamm infiziert werden. Die Tiere entwickelten ebenfalls eine Myokarditis (Paque et al., 1981). Als experimentelles Modell für Coxsackievirus-Infektionen wird in der Regel die Maus verwendet, die somit ein Wirt außerhalb der Primaten ist. Andere Coxsackieviren des Subgenus B wurden ebenfalls in Primaten, aber auch in Hunden nachgewiesen (Kelly et al., 1978; Lundgren et al., 1971). Im Schwein sind Infektionen des Swine Vesicular Disease Virus bekannt, welches eine Adaption des humanen CVB5 an das Schwein ist (Verdaguer et al., 2003). Coxsackievirus-Infektion in niedriger entwickelten Lebewesen sind nicht bekannt. Allerdings kam es in einem Zellkulturexperiment zu einer Virusreplikation in Abhängigkeit des CAR-Proteins aus dem Zebrafisch. CHO-Zellen, die mit dem CAR des Zebrafisches transfiziert wurden, ermöglichten eine CVB3-Replikation, im Gegensatz zu untransfizierten Zellen (Petrella et al., 2002). Die Transfektion von CHO-Zellen mit dem CAR aus dem Huhn führte jedoch zu keiner Virusreplikation. Die Unterschiede zwischen dem **CAR-Protein** Zebrafisch aus dem und dem Huhn können durch Sequenzunterschiede erklärt werden, da die Homologie zwischen den beiden Spezies nur bei 51% liegt.

Anhand der *in vivo* Experimente in den CAR-Rescue-Tieren und der *in vitro* Daten transfizierter CHO-Zellen ist davon auszugehen, dass eine CVB3-Infektion über das CAR-Protein des Huhns nicht möglich ist. Diese Annahme wird durch die Beobachtungen unterstützt, dass Coxsackievirus-Infektionen nur in Säugetieren stattfinden und Infektionen von Vögeln bisher nicht beschrieben sind.

81

7.7 Speziesspezifische Unterschiede zwischen zellulärer und viraler Funktion von CAR

Durch die Erzeugung des CAR-Rescue-Mausstamms konnte nachgewiesen werden, dass das CAR-Protein aus dem Huhn die zelluläre Funktion im Herzen übernehmen kann. Eine Infektion in vivo und in vitro vermittelt es, im Gegensatz zum humanen oder murinen CAR, jedoch nicht. Um die Unterschiede in der zellulären Funktion und der Vermittlung einer Virusinfektion zwischen den unterschiedlichen CAR-Spezies zu erklären, wurden Sequenzanalysen durchgeführt. Die Homologie der Aminosäuresequenz ist zwischen dem Menschen und der Maus sehr hoch (89%), die zum Huhn dagegen ist mit 53% wesentlich geringer. Die Sequenzen der zytoplasmatischen Domäne, welche an wichtigen Interaktionen im Zellinneren beteiligt ist, sind zwischen allen drei Spezies sehr ähnlich (95% zwischen Mensch und Maus, 84% zwischen Mensch und Huhn). Auch die PDZ-Bindedomäne ist in allen Spezies vorhanden. Beim Vergleich der extrazellulären D1-Domäne, welche sowohl für die Interaktion zweier CAR-Moleküle, als auch für die Bindung des CVB3 verantwortlich ist, gibt es jedoch große Unterschiede zwischen Maus und Huhn. Daher erfolgte eine genauere Analyse der Bindungsstellen, die an der CAR-CAR-Interaktion sowie an der CAR-CVB3-Interaktion beteiligt sind. Diese Aminosäuren wurden von verschiedenen Gruppen mittels Röntgenstrukturanalysen ermittelt. Für die Interaktion zweier CAR-Proteine gibt es Veröffentlichungen zum humanen und murinen CAR, die ähnliche Interaktionsstellen beschreiben (Patzke et al., 2010; van Raaij et al., 2000). Vergleicht man die Aminosäuren, die an der CAR-CAR-Interaktion beteiligt sind, lässt sich eine 100%ige Übereinstimmung zwischen Mensch und Maus feststellen. Aber auch die Seguenz des Huhns ist mit 80% Übereinstimmung zum Menschen recht hoch. Diese Bereiche entsprechen zudem den Interaktionsstellen von CAR mit den Junctional Adhesion Molecule-L (JAML), einem anderen Protein der IgSF (Verdino et al., 2010). Die Aminosäuren, die an einer CAR-CVB3-Interaktion beteiligt sind (He et al., 2001) zeigten eine 89%ige Übereinstimmung zwischen Mensch und Maus, jedoch nur 63% zwischen Mensch und Huhn.

Die Sequenzanalysen haben ergeben, dass der zytoplasmatische Bereich sowie die Aminosäuren von CAR, die an einer Interaktion mit andern Adhäsionsmolekülen beteiligt sind, unter den drei untersuchten Spezies hoch konserviert sind. Dadurch kann das CAR aus dem Huhn in den CAR-Rescue-Tieren die zelluläre Funktion des endogenen, murinen CAR ersetzen. Die Bereiche, die für eine Interaktion mit dem Virus verantwortlich sind, zeigen eine hohe Homologie zwischen Mensch und Maus, jedoch nicht zum Huhn. Dies erklärt, weshalb eine Virusinfektion durch das chCAR nicht vermittelt werden kann und die CAR-Rescue-Tiere vor einer CVB3 Infektion geschützt sind. Diese Erkenntnisse können für eine gezieltere Behandlung einer CVB3-infektion genutzt werden. Dadurch könnte eine Virusinfektion verhindert, die Zelluläre Funktion von CAR jedoch erhalten bleiben. Mögliche Nebeneffekte würden dadurch minimiert werden.

7.8 Die Deletion von CAR minimiert die Folgen eines Myokardinfarkts

In verschiedenen kardialen Krankheitsmodellen kommt es zu einer Induktion von CAR. Die CAR-Expression ist in humanen Herzgewebe mit einer dilatativen Kardiomyopathie erhöht (Noutsias et al., 2001). Auch in Herzen mit viraler Mvokarditis konnte eine erhöhte Expression des CAR-Proteins mittels Immunhistochemie nachgewiesen werden (Li et al., 2007). Experimentell wurde nach einer induzierten Autoimmunmyokarditis in der Ratte eine Induktion der CAR-mRNA und des Proteins im Herzen beobachtet. Die Expression stieg dabei ab Tag 20 nach der Induktion an und nahm mit Abklingen der Inflammation wieder ab (Ito et al., 2000). Nach experimentellem Myokardinfarkt in der Ratte war CAR ebenfalls induziert. Hier stieg die Expression von CAR im Randbereich des Infarkts an, während sie im gesunden Gewebe unverändert blieb. Die Menge der CAR-Expression erhöhte sich dabei stetig bis 3 Wochen nach dem Infarkt (Fechner et al., 2003). Aufgrund dieser Beobachtungen wurde vermutet, dass CAR eine wichtige Funktion im erkrankten Herzen übernimmt. Ob die Induktion von CAR Teil des Pathomechanismus ist, oder zur Regeneration des Herzens beiträgt war jedoch noch unbekannt.

Um die Funktion von CAR im erkrankten Herzen zu definieren, sollten Veränderungen in der Pathologie und Funktion des Herzens nach lokaler Ischämie untersucht werden. Für die Experimente wurden induzierbare kardiale CAR-KO-Mäuse verwendet (Lisewski et al., 2008). Bei diesen Tieren kommt es durch die Injektion von Tamoxifen zu einer spezifischen Deletion von CAR im

Herzen. Die Induktion des Myokardinfarkts erfolgte durch die Ligation des vorderen Seitenastes des *Ramus interventricularis anterior.*

Die CAR-Expression war im Randbereich des Infarkts deutlich erhöht, jedoch nicht im restlichen Myokard. Dies entspricht den Beobachtungen nach experimentellem Myokardinfarkt in der Ratte (Fechner et al., 2003). In den CAR-KO-Herzen mit und ohne Infarkt wurden nur sehr geringe Mengen der CAR-mRNA detektiert, was den kardialen KO bestätigt. Die nicht vollständige Deletion im Herzen ist vermutlich durch die Expression von CAR in nicht-Kardiomyozyten bedingt. In der ersten Woche nach dem Infarkt starben wenigner KO- als WT-Tiere. Daher wurden histologische Untersuchungen der Herzen durchgeführt. Die Ventrikelwand in der Infarktregion der KO-Tiere war deutlich dicker und es überlebten mehr Myozyten als in den WT-Tieren. Der Tod der WT-Tiere könnte somit durch eine Ruptur der Ventrikelwand eingetreten sein. Aufgrund der dickeren Ventrikelwand waren die KO-Tiere davor geschützt. Auch in der Histologie 30 Tage nach experimentellem Myokardinfarkt war die Ventrikelwand der KO-Herzen in der Infarktregion deutlich dicker. Es zeigten sich weniger Kollageneinlagerungen und mehr überlebende Kardiomyozyten. Die Infarktregion war in den kardialen KO-Tieren insgesamt kleiner. In den WT-Herzen kam es zudem zu einer konzentrischen Hypertrophie, die in den KO-Herzen nach dem Infarkt nicht zu beobachten war. Die Hypertrophie in den WT-Herzen wurde durch echokardiographische Untersuchungen bestätigt. Während das Herzgewicht der WT-Tiere nach dem Myokardinfarkt erhöht war, blieb es in den kardialen Knockouts unverändert. Auch die Pumpfunktion der Herzen verschlechterte sich in den KO-Tieren nach dem Myokardinfarkt nicht, während sie in den Wildtypen signifikant abnahm.

Um diesen Phänotyp zu erklären, wurde die Expression der *gap junction*-Proteine Connexin 43 (CX43) und Connexin 45 (CX45) überprüft. Connexine werden mit der Ausbreitung der Herzschädigung nach einem Infarkt in Verbindung gebracht. Erste Beobachtungen dazu wurden unter Verwendung des *gap junction*-Blockers Heptanol gemacht. Die Verabreichung von Heptanol nach einer Ligation der linken Koronararterie im Schweineherzen führte zu deutlich weniger nekrotischen Kardiomyozyten. Entsprechend kam es auch zu kleineren Infarkten (Garcia-Dorado et al., 1997). In heterozygot CX43-defizienten Mäusen konnten ebenfalls signifikant kleinere Infarkte 8 Tage und 10 Wochen nach einem experimentellem Myokardinfarkt nachgewiesen werden (Kanno et al., 2003). Auch die Verabreichung eines dem CX43 nachempfundenen Peptides hatte diesen Effekt. Hier kam es nach einem Infarkt mit anschließender Reperfusion in der Ratte zu einer Reduktion der Infarktgröße (Hawat et al., 2012).

Die Messung der mRNA im CAR-KO-Herzen ergab eine Reduktion von CX45 nach dem Myokardinfarkt. Eine Verringerung der CX45 mRNA und des Proteins in CAR-KO-Herzen wurde bereits von zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander beschrieben (Lim et al., 2008; Lisewski et al., 2008). In diesem Zusammenhang wurde auch eine Interkation zwischen CAR und CX45 nachgewiesen (Lim et al., 2008). Da im Arbeitsmyokard überwiegend CX43 vorkommt ist dieses in der Ausbreitung der Zellschädigung nach einem Myokardinfarkt, von größerer Bedeutung. Die Menge der CX43 mRNA war jedoch unverändert. Eine geringere CX43 Proteinmenge, trotz unveränderter mRNA Konzentration, im CAR-KO Herzen wurde jedoch bereits beschrieben (Lisewski et al., 2008). Die Lokalisation von CX43 in den Glanzstreifen war nach der Deletion von CAR unverändert (Lim et al., 2008; Lisewski et al., 2008).

Erste Ergebnisse sowie bereits veröffentlichte Daten deuten somit auf eine Rolle von Connexinen im CAR-defizienten Herzen nach einem Myokardinfarkt hin. Um dies näher zu beschreiben, bedarf es weiterer Experimente. So sollte die Menge das CAR-Proteins sowie dessen Lokalisation vor und nach dem Infarkt untersucht werden. Es ist denkbar, dass die Lateralisierung der Connexine, die nach einem Myokardinfarkt beobachtet wird, im CAR-KO-Herzen verändert ist. Effekte auf die Ausbreitung einer Schädigung könnten in Zellkulturexperimenten, durch einen lokal induzierten Zelltod in CAR-KO-Kardiomyozyten, näher untersucht werden.

7.9 CAR beeinflusst kardiale Wachstumsprozesse

In den CAR-KO-Herzen entwickelte sich nach dem Myokardinfarkt keine Hypertrophie. Zudem sind die KO-Herzen insgesamt kleiner und leichter als die WT-Tiere. spricht Funktion CAR Herzen der Dies für eine von in Wachstumsprozessen des Herzens, die durch Hypertrophie nach 6-facher Überexpression von CAR bestätigt wird (Caruso et al., 2010). Der erhöhte Durchmesser der Kardiomyozyten wurde mit einer erhöhten Expression von β-Catenin in Verbindung gebracht. β-Catenin ist Bestandteil des Wnt -Signalweges und ein bekannter Regulator der kardialen Hypertrophie. Die Stabilisierung von β -Catenin in der Zelle führt zu dessen Translokation in den Zellkern, wo es an der Aktivierung von Hypertrophie-Genen beteiligt ist (Shevtsov et al., 2006). Ensprechend der erhöhten Expression von β -Catenin bei einer Überexpression von CAR ist im CAR-KO-Herzen die Expression von β -Catenin vermindert. Zwischen CAR und β -Catenin besteht eine direkte Interaktion (Lim et al., 2008). Dies weist darauf hin, dass CAR, vermutlich durch eine Interaktion mit β -Catenin, an kardialen Wachstumsprozessen beteiligt ist und somit die Entwicklung einer Hypertrophie des Herzens beeinflusst.

Um die Mechanismen der Umstrukurierungsprozesse in Abhängigkeit von CAR nach einem Infarkt näher zu beschreiben, wurde ein genomweiter Screen durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass es nur in den WT-Herzen zu einer Induktion von Hypoxiesignalwegen nach einem Myokardinfarkt kommt. Die Expression des Hypoxia Induced Factor 1 alpha (HIF1α) des Angiotensin Converting Enzyme (ACE) und des Angiotensin Rezeptor 1 (AGTR1) waren erhöht. HIF1a ist ein Transkriptionsfaktor, der bei Hypoxie exprimiert wird. Durch die Bindung an das Hypoxia Response Element (HRE) reguliert HIF1a die Expression vieler Gene, die kardiale Umstrukturierungsprozesse nach einem Myokardinfarkt beeinflussen. In Zellkulturexperimenten konnte ein Zusammenhang zwischen HIF1a und dem Renin-Angiotensin-System (RAS) hergestellt werden. Bei einer Hypoxie kommt es neben der Induktion von HIF1α und Genen, die über das HRE reguliert werden, auch zu einer höheren Expression von ACE und AGTR1. Auch Hypoxie unabhängig wird durch die Überexpression von HIF1α sowohl ACE als auch AGTR1 induziert. Eine Inhibierung von HIF1a durch eine small interfering RNA hingegen verhinderte die Hypoxie-induzierte Expression von ACE und AGTR1 (Krick et al., 2005). Als Komponenten des Renin-Angiotensin-Systems spielen ACE und AGTR1 ebenfalls eine wichtige Rolle in kardialen Umstrukturierungsprozessen. Beim RAS wird Angiotensinogen von Renin in Angiotensin I transformiert, welches wiederum von ACE in Angiotensin II gespalten wird. Die Bindung von Angiotensin II an Angiotensinrezeptoren führt zu einer Erhöhung des Blutdruckes. Eine Aktivierung Renin-Angiotensin-Systems bewirkt aber auch die Entwicklung des einer Hypertrophie des Herzens infolge kardialer Erkrankungen (Bader et al., 2001). So werden ACE-Inhibitoren und Angiotensin II-Rezeptorblocker nicht nur zur Behandlung von Bluthochdruck, sondern auch bei Herzkrankheiten mit verminderter

ejection fraction und nach einem Myokardinfarkt eingesetzt. Positive Effekte konnten in zahlreichen klinischen Studien nachgewiesen werden (Lang and Struthers, 2013).

Somit könnte CAR durch eine Interaktion mit β-Catenin und eine verminderte Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems an der Entwicklung einer Hypertrophie beteiligt sein. Ob die beobachteten positiven Effekte im CAR-KO-Herzen nach einem Myokardinfarkt wirklich mit der Deletion von CAR zusammenhängen, oder durch die geringere Gewebeschädigung bedingt sind, müsste zusätzlich untersucht werden. Dazu ist ein hypoxie-unabhängiges Hypertrophiemodell vonnöten. *In vivo* könnte dies durch eine induzierte Volumenüberbelastung des Herzens in WT- und KO-Tieren untersucht werden. Außerdem wäre eine Überprüfung der Hypoxie-Signalwege in primären Kardiomyozyten oder im Langendorf perfundierten Herzen unter hypoxischen Bedingungen möglich.

Aus den vorliegenden Daten lässt sich schließen, dass eine verminderte Expression von Connexinen im CAR-KO-Herzen zu einer geringeren Schädigung des Gewebes führt. Zusätzlich könnte CAR direkt an einer Regulation des Hypoxie-Signalweges beteiligt sein. Die möglichen zugrundeliegenden Mechanismen sind in Abbildung 28 zusammengefasst. Es ist davon auszugehen, dass die Induktion von CAR in der Randzone des Infarkts Teil des Pathomechanismus ist und nicht dazu beiträgt die Folgen eines Infarkts zu minimieren.



Abbildung 28: Modell der CAR-abhängigen Protektion nach Myokardinfarkt.

Die Ausbreitung der Gewebeschädigung über Connexine (CX43) führt im WT-Herzen zu größeren Infarkten und einer höheren Mortalität. Zudem kommt es zu einer Aktivierung von Hypoxie-Signalwegen über den Hypoxia Induced Factor 1 α (HIF1 α) und zur Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems. Dabei führt eine erhöhte Expression des Angiotensin Converting Enzyme (ACE) zu einer vermehrten Spaltung von Angiotensin I (ANGI) zu Angiotensin II (ANGII). Dieses bindet an den Angiotensinrezeptor 1 (AGTR1), der das Signal ins Innere der Zelle weiterleitet. Zusätzlich führt eine translokation von β -Catenin (β -cat) in den Kern, zur Aktivierung von Hypertrophie-Genen. Die Deletion von CAR bewirkt eine geringere Gewebeschädigung durch die Reduktion von Connexinen. Eine verminderte Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems und eine geringere β -Catenin-Expression schützt das Herz vor einer Hypertrophie.

7.10 Therapieansätze zur Verbesserung der Herzfunktion nach einem Myokardinfarkt

Die Untersuchung der Funktion von CAR nach einem Myokardinfarkt führen zu der Hypothese, dass die Induktion von CAR in Erkrankungen des Herzens Teil des Pathomechanismus ist und nicht zu einer bessern Heilung beiträgt. Vielmehr vermindert die Deletion von CAR die Folgen eines Myokardinfarktes. Zusätzlich wurde durch die Erzeugung der CAR-Rescue-Maus eine essentielle Funktion von CAR in anderen Geweben ausgeschlossen. Diese Eigenschaften machen CAR zu einem therapeutischen Angriffspunkt in der Behandlung kardialer Erkrankungen. Dazu bedarf es Möglichkeiten die Expression oder die Funktion von CAR nach einem Myokardinfarkt einzuschränken. Diese Ansätze können auch auf die Therapie inflammatorischer oder dilatativer Kardiomyopathien übertragen werden. Ein möglicher Ansatzpunkt ist eine Behandlung mit löslichen CAR-Proteinen, welche die extrazelluläre Domäne von CAR blockieren. Eine Behandlung von Mäusen mit einer löslichen CAR-Isoform, die an den konstanten Teil des humanen Immunglobulin fusioniert ist, wurde bereits erfolgreich Antikörpers bei einer Coxsackievirus-bedingten Myokarditis eingesetzt (Pinkert et al., 2009; Yanagawa et al., 2004). Ähnliche Effekte könnten mit einem CAR spezifischen Antikörper erzielt werden. Auch die Interaktion von CAR mit dem Adenovirus Fiberprotein würde bestehende Interaktionen von CAR aufbrechen und die Proteine an weiteren Interaktionen hindern. Auf diese Weise könnte auch eine Behandlung mit leeren Coxsackievirus-Kapsiden wirken. Für dieses Modell sind bereits positive Effekte auf eine Coxsackievirus-Infektion nachgewiesen (Zhang et al., 2012). Durch antisens Oligonukleotid-Morpholinos kann eine CAR-Proteinexpression verhindert werden (Raschperger et al., 2008). Durch die Anwendung von Morpholinos wäre auch ein verändertes alternatives Spleißen von CAR denkbar. Die Deletion des Exons 6, welches die Transmembrandomäne von CAR kodiert, würde zu einer Synthese von löslichem CAR anstelle des Membranständigen führen. Das entstandene lösliche CAR kann dann auf noch bestehenden CAR-Interaktionen einwirken. Diese Therapieansätze gilt es in Zukunft auf ihre Wirksamkeit hin zu untersuchen. Somit ist CAR ein idealer Angriffspunkt, um die Überlebenschancen und die Lebensqualität nach einem Myokardinfarkt zu verbessern.

8 Literaturverzeichnis

Andréoletti, L., Lévêque, N., Boulagnon, C., Brasselet, C., and Fornes, P. (2009). Viral causes of human myocarditis. Arch Cardiovasc Dis *10*2, 559–568.

Asher, D.R., Cerny, A.M., Weiler, S.R., Horner, J.W., Keeler, M.L., Neptune, M.A., Jones, S.N., Bronson, R.T., Depinho, R.A., and Finberg, R.W. (2005). Coxsackievirus and adenovirus receptor is essential for cardiomyocyte development. Genesis *42*, 77–85.

Bader, M., Peters, J., Baltatu, O., Muller, D.N., Luft, F.C., and Ganten, D. (2001). Tissue renin-angiotensin systems: new insights from experimental animal models in hypertension research. J Mol Med *79*, 76–102.

Bazzoni, G., Martinez-Estrada, O.M., Orsenigo, F., Cordenonsi, M., Citi, S., and Dejana, E. (2000). Interaction of junctional adhesion molecule with the tight junction components ZO-1, cingulin, and occludin. J. Biol. Chem. *275*, 20520–20526.

Bergelson, J.M., Cunningham, J.A., Droguett, G., Kurt-Jones, E.A., Krithivas, A., Hong, J.S., Horwitz, M.S., Crowell, R.L., and Finberg, R.W. (1997). Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. Science *275*, 1320–1323.

Bergelson, J.M., Krithivas, A., Celi, L., Droguett, G., Horwitz, M.S., Wickham, T., Crowell, R.L., and Finberg, R.W. (1998). The murine CAR homolog is a receptor for coxsackie B viruses and adenoviruses. J Virol *72*, 415–419.

Bernal, R.M., Sharma, S., Gardner, B.K., Douglas, J.T., Bergelson, J.M., Dubinett, S.M., and Batra, R.K. (2002). Soluble coxsackievirus adenovirus receptor is a putative inhibitor of adenoviral gene transfer in the tumor milieu. Clin Cancer Res *8*, 1915–1923.

Bewley, M.C., Springer, K., Zhang, Y.B., Freimuth, P., and Flanagan, J.M. (1999). Structural analysis of the mechanism of adenovirus binding to its human cellular receptor, CAR. Science *286*, 1579–1583.

Bezzina, C.R., Pazoki, R., Bardai, A., Marsman, R.F., de Jong, J.S.S.G., Blom, M.T., Scicluna, B.P., Jukema, J.W., Bindraban, N.R., Lichtner, P., et al. (2010). Genome-

wide association study identifies a susceptibility locus at 21q21 for ventricular fibrillation in acute myocardial infarction. Nat. Genet *42*, 688–691.

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

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

Caruso, L., Yuen, S., Smith, J., Husain, M., and Opavsky, M.A. (2010). Cardiomyocyte-targeted overexpression of the coxsackie-adenovirus receptor causes a cardiomyopathy in association with beta-catenin signaling. J. Mol. Cell. Cardiol *48*, 1194–1205.

Chen, J.W., Ghosh, R., Finberg, R.W., and Bergelson, J.M. (2003). Structure and chromosomal localization of the murine coxsackievirus and adenovirus receptor gene. DNA Cell Biol *22*, 253–259.

Chen, J.W., Zhou, B., Yu, Q.C., Shin, S.J., Jiao, K., Schneider, M.D., Baldwin, H.S., and Bergelson, J.M. (2006). Cardiomyocyte-specific deletion of the coxsackievirus and adenovirus receptor results in hyperplasia of the embryonic left ventricle and abnormalities of sinuatrial valves. Circ Res *98*, 923–930.

Cohen, C.J., Shieh, J.T., Pickles, R.J., Okegawa, T., Hsieh, J.T., and Bergelson, J.M. (2001). The coxsackievirus and adenovirus receptor is a transmembrane component of the tight junction. Proc Natl Acad Sci U S A *98*, 15191–15196.

Coyne, C.B., and Bergelson, J.M. (2006). Virus-induced Abl and Fyn kinase signals permit coxsackievirus entry through epithelial tight junctions. Cell *124*, 119–131.

Coyne, C.B., Voelker, T., Pichla, S.L., and Bergelson, J.M. (2004). The coxsackievirus and adenovirus receptor interacts with the multi-PDZ domain protein-1 (MUPP-1) within the tight junction. J Biol Chem *279*, 48079–48084.

Dennert, R., Crijns, H.J., and Heymans, S. (2008). Acute viral myocarditis. Eur. Heart J. 29, 2073–2082.

Dorner, A., Xiong, D., Couch, K., Yajima, T., and Knowlton, K.U. (2004). Alternatively spliced soluble coxsackie-adenovirus receptors inhibit coxsackievirus infection. J Biol Chem *279*, 18497–18503.

Dorner, A., Grunert, H.P., Lindig, V., Chandrasekharan, K., Fechner, H., Knowlton, K.U., Isik, A., Pauschinger, M., Zeichhardt, H., and Schultheiss, H.P. (2006). Treatment of coxsackievirus-B3-infected BALB/c mice with the soluble coxsackie adenovirus receptor CAR4/7 aggravates cardiac injury. J Mol Med *84*, 842–851.

Dorner, A.A., Wegmann, F., Butz, S., Wolburg-Buchholz, K., Wolburg, H., Mack, A., Nasdala, I., August, B., Westermann, J., Rathjen, F.G., et al. (2005). Coxsackievirus-adenovirus receptor (CAR) is essential for early embryonic cardiac development. J Cell Sci *118*, 3509–3521.

Elisaf, M.S., Nakou, K., Liamis, G., and Pavlidis, N.A. (2000). Tamoxifen-induced severe hypertriglyceridemia and pancreatitis. Ann Oncol *11*, 1067–1069.

Excoffon, K.J., Traver, G.L., and Zabner, J. (2005). The role of the extracellular domain in the biology of the coxsackievirus and adenovirus receptor. Am J Respir Cell Mol Biol *32*, 498–503.

Excoffon, K.J.D.A., Hruska-Hageman, A., Klotz, M., Traver, G.L., and Zabner, J. (2004). A role for the PDZ-binding domain of the coxsackie B virus and adenovirus receptor (CAR) in cell adhesion and growth. J. Cell. Sci *117*, 4401–4409.

Excoffon, K.J.D.A., Gansemer, N., Traver, G., and Zabner, J. (2007). Functional effects of coxsackievirus and adenovirus receptor glycosylation on homophilic adhesion and adenoviral infection. J. Virol *81*, 5573–5578.

Excoffon, K.J.D.A., Gansemer, N.D., Mobily, M.E., Karp, P.H., Parekh, K.R., and Zabner, J. (2010). Isoform-specific regulation and localization of the coxsackie and adenovirus receptor in human airway epithelia. PLoS ONE *5*, e9909.

Fanning, A.S., Jameson, B.J., Jesaitis, L.A., and Anderson, J.M. (1998). The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. J. Biol. Chem 273, 29745–29753.

Fanning, A.S., Ma, T.Y., and Anderson, J.M. (2002). Isolation and functional characterization of the actin binding region in the tight junction protein ZO-1. FASEB J *16*, 1835–1837.

Fechner, H., Haack, A., Wang, H., Wang, X., Eizema, K., Pauschinger, M., Schoemaker, R., Veghel, R., Houtsmuller, A., Schultheiss, H.P., et al. (1999). Expression of coxsackie adenovirus receptor and alphav-integrin does not correlate with adenovector targeting in vivo indicating anatomical vector barriers. Gene Ther *6*, 1520–1535.

Fechner, H., Noutsias, M., Tschoepe, C., Hinze, K., Wang, X., Escher, F., Pauschinger, M., Dekkers, D., Vetter, R., Paul, M., et al. (2003). Induction of coxsackievirus-adenovirus-receptor expression during myocardial tissue formation and remodeling: identification of a cell-to-cell contact-dependent regulatory mechanism. Circulation *107*, 876–882.

Fok, P.T., Huang, K.C., Holland, P.C., and Nalbantoglu, J. (2007). The Coxsackie and adenovirus receptor binds microtubules and plays a role in cell migration. J Biol Chem *282*, 7512–7521.

Franz, W.M., Breves, D., Klingel, K., Brem, G., Hofschneider, P.H., and Kandolf, R. (1993). Heart-specific targeting of firefly luciferase by the myosin light chain-2 promoter and developmental regulation in transgenic mice. Circ. Res. *73*, 629–638.

Garcia-Dorado, D., Inserte, J., Ruiz-Meana, M., González, M.A., Solares, J., Juliá, M., Barrabés, J.A., and Soler-Soler, J. (1997). Gap junction uncoupler heptanol prevents cell-to-cell progression of hypercontracture and limits necrosis during myocardial reperfusion. Circulation *96*, 3579–3586.

Han, T., He, W., Song, D., Zhao, K., Wu, C., Gao, F., Lu, H., Gai, X., Wang, X., Li, F., et al. (2012). Experimental SSM-CVB3 infection in macaques. Experimental and Molecular Pathology *92*, 131–139.

Hawat, G., Hélie, P., and Baroudi, G. (2012). Single intravenous low-dose injections of connexin 43 mimetic peptides protect ischemic heart in vivo against myocardial infarction. J. Mol. Cell. Cardiol. *53*, 559–566.

He, W., Lu, H., Song, D., Zhao, K., Gai, X., Wang, X., Chen, Q., and Gao, F. (2009). The evidence of Coxsackievirus B3 induced myocarditis as the cause of death in a Sichuan snub-nosed monkey (Rhinopithecus roxellana). Journal of Medical Primatology *38*, 192–198.

He, W., Lu, H., Zhao, K., Song, D., Gai, X., and Gao, F. (2012). Complete Genome Sequence of a Coxsackievirus B3 Isolated from a Sichuan Snub-Nosed Monkey. J. Virol. *86*, 13134–13135.

He, Y., Chipman, P.R., Howitt, J., Bator, C.M., Whitt, M.A., Baker, T.S., Kuhn, R.J., Anderson, C.W., Freimuth, P., and Rossmann, M.G. (2001). Interaction of coxsackievirus B3 with the full length coxsackievirus-adenovirus receptor. Nat. Struct. Biol *8*, 874–878.

Honda, T., Saitoh, H., Masuko, M., Katagiri-Abe, T., Tominaga, K., Kozakai, I., Kobayashi, K., Kumanishi, T., Watanabe, Y.G., Odani, S., et al. (2000). The coxsackievirus-adenovirus receptor protein as a cell adhesion molecule in the developing mouse brain. Brain Res Mol Brain Res *77*, 19–28.

Hotta, Y., Honda, T., Naito, M., and Kuwano, R. (2003). Developmental distribution of coxsackie virus and adenovirus receptor localized in the nervous system. Brain Res. Dev. Brain Res *143*, 1–13.

Huang, K.C., Yasruel, Z., Guerin, C., Holland, P.C., and Nalbantoglu, J. (2007). Interaction of the Coxsackie and adenovirus receptor (CAR) with the cytoskeleton: binding to actin. FEBS Lett *581*, 2702–2708.

Hung, A.Y., and Sheng, M. (2002). PDZ domains: structural modules for protein complex assembly. J. Biol. Chem *277*, 5699–5702.

Ito, M., Kodama, M., Masuko, M., Yamaura, M., Fuse, K., Uesugi, Y., Hirono, S., Okura, Y., Kato, K., Hotta, Y., et al. (2000). Expression of coxsackievirus and adenovirus receptor in hearts of rats with experimental autoimmune myocarditis. Circ Res *86*, 275–280.

Itoh, M., Furuse, M., Morita, K., Kubota, K., Saitou, M., and Tsukita, S. (1999). Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins. J. Cell Biol *147*, 1351–1363.

Jiang, S., and Caffrey, M. (2005). NMR assignment and secondary structure of the Coxsackievirus and Adenovirus receptor domain 2. Protein Pept. Lett *12*, 537–539.

Jiang, S., Jacobs, A., Laue, T.M., and Caffrey, M. (2004). Solution structure of the coxsackievirus and adenovirus receptor domain 1. Biochemistry *43*, 1847–1853.

Kallewaard, N.L., Zhang, L., Chen, J.-W., Guttenberg, M., Sanchez, M.D., and Bergelson, J.M. (2009). Tissue-specific deletion of the coxsackievirus and adenovirus receptor protects mice from virus-induced pancreatitis and myocarditis. Cell Host Microbe *6*, 91–98.

Kanel, K.T., Wolmark, N., and Thompson, P.D. (1997). Delayed severe hypertriglyceridemia from tamoxifen. N Engl J Med 337, 281.

Kanno, S., Kovacs, A., Yamada, K.A., and Saffitz, J.E. (2003). Connexin43 as a determinant of myocardial infarct size following coronary occlusion in mice. J. Am. Coll. Cardiol. *41*, 681–686.

Kashimura, T., Kodama, M., Hotta, Y., Hosoya, J., Yoshida, K., Ozawa, T., Watanabe, R., Okura, Y., Kato, K., Hanawa, H., et al. (2004). Spatiotemporal changes of coxsackievirus and adenovirus receptor in rat hearts during postnatal development and in cultured cardiomyocytes of neonatal rat. Virchows Arch *444*, 283–292.

Kelly, M.E., Soike, K., Ahmed, K., and latropoulos, M.J. (1978). Coxsackievirus in an infant chimpanzee. J. Med. Primatol. *7*, 119–121.

Kramer, B., Huber, M., Kern, C., Klingel, K., Kandolf, R., and Selinka, H.C. (1997). Chinese hamster ovary cells are non-permissive towards infection with coxsackievirus B3 despite functional virus-receptor interactions. Virus Res. *48*, 149– 156.

Krick, S., Hänze, J., Eul, B., Savai, R., Seay, U., Grimminger, F., Lohmeyer, J., Klepetko, W., Seeger, W., and Rose, F. (2005). Hypoxia-driven proliferation of human pulmonary artery fibroblasts: cross-talk between HIF-1alpha and an autocrine angiotensin system. FASEB J. *19*, 857–859.

Kuhbandner, S., Brummer, S., Metzger, D., Chambon, P., Hofmann, F., and Feil, R. (2000). Temporally controlled somatic mutagenesis in smooth muscle. Genesis *28*, 15–22.

Kühl, U., Pauschinger, M., Noutsias, M., Seeberg, B., Bock, T., Lassner, D., Poller, W., Kandolf, R., and Schultheiss, H.-P. (2005). High prevalence of viral genomes and multiple viral infections in the myocardium of adults with "idiopathic" left ventricular dysfunction. Circulation *111*, 887–893.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature *227*, 680–685.

Lang, C.C., and Struthers, A.D. (2013). Targeting the renin-angiotensin-aldosterone system in heart failure. Nat Rev Cardiol *10*, 125–134.

Li, H., Li, Y., and Zhu, T. (2007). [The expression of coxsackie B virus adenovirus receptor (CAR) in viral myocarditis and dilated cardiomyopathy patients]. Fa Yi Xue Za Zhi 23, 247–249.

Lim, B.-K., Xiong, D., Dorner, A., Youn, T.-J., Yung, A., Liu, T.I., Gu, Y., Dalton, N.D., Wright, A.T., Evans, S.M., et al. (2008). Coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR) mediates atrioventricular-node function and connexin 45 localization in the murine heart. J. Clin. Invest *118*, 2758–2770.

Lisewski, U., Shi, Y., Wrackmeyer, U., Fischer, R., Chen, C., Schirdewan, A., Jüttner, R., Rathjen, F., Poller, W., Radke, M.H., et al. (2008). The tight junction protein CAR regulates cardiac conduction and cell-cell communication. J Exp Med *205*, 2369–2379.

Luissint, A.-C., Lutz, P.G., Calderwood, D.A., Couraud, P.-O., and Bourdoulous, S. (2008). JAM-L-mediated leukocyte adhesion to endothelial cells is regulated in cis by alpha4beta1 integrin activation. J. Cell Biol *183*, 1159–1173.

Lundgren, D.L., Hobbs, C.H., and Clapper, W.E. (1971). Experimental infection of beagle dogs with Coxsackievirus type B1. Am. J. Vet. Res. *32*, 609–613.

Martino, T.A., Petric, M., Weingartl, H., Bergelson, J.M., Opavsky, M.A., Richardson, C.D., Modlin, J.F., Finberg, R.W., Kain, K.C., Willis, N., et al. (2000). The coxsackie-

adenovirus receptor (CAR) is used by reference strains and clinical isolates representing all six serotypes of coxsackievirus group B and by swine vesicular disease virus. Virology 271, 99–108.

Mirza, M., Hreinsson, J., Strand, M.L., Hovatta, O., Soder, O., Philipson, L., Pettersson, R.F., and Sollerbrant, K. (2006). Coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR) is expressed in male germ cells and forms a complex with the differentiation factor JAM-C in mouse testis. Exp Cell Res *312*, 817–830.

Mirza, M., Petersen, C., Nordqvist, K., and Sollerbrant, K. (2007). Coxsackievirus and adenovirus receptor is up-regulated in migratory germ cells during passage of the blood-testis barrier. Endocrinology *148*, 5459–5469.

Mirza, M., Pang, M.-F., Zaini, M.A., Haiko, P., Tammela, T., Alitalo, K., Philipson, L., Fuxe, J., and Sollerbrant, K. (2012). Essential role of the coxsackie- and adenovirus receptor (CAR) in development of the lymphatic system in mice. PLoS ONE *7*, e37523.

Modrow, S., Falke, D., Schatzl, H., and Truyen, U. (2010). Molekulare Virologie (Springer DE).

Nalbantoglu, J., Pari, G., Karpati, G., and Holland, P.C. (1999). Expression of the primary coxsackie and adenovirus receptor is downregulated during skeletal muscle maturation and limits the efficacy of adenovirus-mediated gene delivery to muscle cells. Hum Gene Ther *10*, 1009–1019.

Noutsias, M., Fechner, H., de Jonge, H., Wang, X., Dekkers, D., Houtsmuller, A.B., Pauschinger, M., Bergelson, J., Warraich, R., Yacoub, M., et al. (2001). Human coxsackie-adenovirus receptor is colocalized with integrins alpha(v)beta(3) and alpha(v)beta(5) on the cardiomyocyte sarcolemma and upregulated in dilated cardiomyopathy: implications for cardiotropic viral infections. Circulation *104*, 275–280.

Paque, R.E., Gauntt, C.J., and Nealon, T.J. (1981). Assessment of cell-mediated immunity against coxsackievirus B3-induced myocarditis in a primate model (Papio papio). Infect Immun *31*, 470–479.

Patzke, C., Max, K.E.A., Behlke, J., Schreiber, J., Schmidt, H., Dorner, A.A., Kröger, S., Henning, M., Otto, A., Heinemann, U., et al. (2010). The coxsackievirusadenovirus receptor reveals complex homophilic and heterophilic interactions on neural cells. J. Neurosci *30*, 2897–2910.

Pazirandeh, A., Sultana, T., Mirza, M., Rozell, B., Hultenby, K., Wallis, K., Vennström, B., Davis, B., Arner, A., Heuchel, R., et al. (2011). Multiple Phenotypes in Adult Mice following Inactivation of the Coxsackievirus and Adenovirus Receptor (Car) Gene. PLoS ONE *6*, e20203.

Petrella, J., Cohen, C.J., Gaetz, J., and Bergelson, J.M. (2002). A zebrafish coxsackievirus and adenovirus receptor homologue interacts with coxsackie B virus and adenovirus. J Virol *76*, 10503–10506.

Pinkert, S., Westermann, D., Wang, X., Klingel, K., Dörner, A., Savvatis, K., Grössl, T., Krohn, S., Tschöpe, C., Zeichhardt, H., et al. (2009). Prevention of cardiac dysfunction in acute coxsackievirus B3 cardiomyopathy by inducible expression of a soluble coxsackievirus-adenovirus receptor. Circulation *120*, 2358–2366.

Van Raaij, M.J., Chouin, E., van der Zandt, H., Bergelson, J.M., and Cusack, S. (2000). Dimeric structure of the coxsackievirus and adenovirus receptor D1 domain at 1.7 A resolution. Structure *8*, 1147–1155.

Raschperger, E., Thyberg, J., Pettersson, S., Philipson, L., Fuxe, J., and Pettersson, R.F. (2006). The coxsackie- and adenovirus receptor (CAR) is an in vivo marker for epithelial tight junctions, with a potential role in regulating permeability and tissue homeostasis. Exp Cell Res *312*, 1566–1580.

Raschperger, E., Neve, E.P., Wernerson, A., Hultenby, K., Pettersson, R.F., and Majumdar, A. (2008). The coxsackie and adenovirus receptor (CAR) is required for renal epithelial differentiation within the zebrafish pronephros. Dev Biol *313*, 455–464.

Schaffner, W., and Weissmann, C. (1973). A rapid, sensitive, and specific method for the determination of protein in dilute solution. Anal Biochem *56*, 502–514.

Schmidtke, M., Selinka, H.C., Heim, A., Jahn, B., Tonew, M., Kandolf, R., Stelzner, A., and Zell, R. (2000). Attachment of coxsackievirus B3 variants to various cell lines: mapping of phenotypic differences to capsid protein VP1. Virology *275*, 77–88.

Sheng, M., and Sala, C. (2001). PDZ domains and the organization of supramolecular complexes. Annu. Rev. Neurosci 24, 1–29.

Shevtsov, S.P., Haq, S., and Force, T. (2006). Activation of β-catenin Signaling Pathways by Classical G-Protein-Coupled Receptors: Mechanisms and Consequences in Cycling and Non-cycling Cells. Cell Cycle *5*, 2295–2300.

Shi, Y., Chen, C., Lisewski, U., Wrackmeyer, U., Radke, M., Westermann, D., Sauter, M., Tschöpe, C., Poller, W., Klingel, K., et al. (2009). Cardiac deletion of the Coxsackievirus-adenovirus receptor abolishes Coxsackievirus B3 infection and prevents myocarditis in vivo. J Am Coll Cardiol *53*, 1219–1226.

Shieh, J.T.C., and Bergelson, J.M. (2002). Interaction with decay-accelerating factor facilitates coxsackievirus B infection of polarized epithelial cells. J. Virol. *76*, 9474–9480.

Sollerbrant, K., Raschperger, E., Mirza, M., Engstrom, U., Philipson, L., Ljungdahl, P.O., and Pettersson, R.F. (2003). The Coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR) forms a complex with the PDZ domain-containing protein ligand-of-numb protein-X (LNX). J Biol Chem *278*, 7439–7444.

Thoelen, I., Magnusson, C., Tagerud, S., Polacek, C., Lindberg, M., and Van Ranst, M. (2001). Identification of alternative splice products encoded by the human coxsackie-adenovirus receptor gene. Biochem Biophys Res Commun *287*, 216–222.

Thomas, C., Gebert, G., and Hombach, V. (1990). Herz und Gefäße: mit 189 Abbildungen, davon 163 mehrfarbig (Stuttgart [u.a.]: Schattauer).

Thygesen, K., Alpert, J.S., Jaffe, A.S., Simoons, M.L., Chaitman, B.R., White, H.D., Thygesen, K., Alpert, J.S., White, H.D., Jaffe, A.S., et al. (2012). Third universal definition of myocardial infarction. J. Am. Coll. Cardiol. *60*, 1581–1598.

Tomko, R.P., Xu, R., and Philipson, L. (1997). HCAR and MCAR: the human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses. Proc Natl Acad Sci U S A *94*, 3352–3356.

Verdaguer, N., Jimenez-Clavero, M.A., Fita, I., and Ley, V. (2003). Structure of swine vesicular disease virus: mapping of changes occurring during adaptation of human coxsackie B5 virus to infect swine. J. Virol. *77*, 9780–9789.

Verdino, P., Witherden, D.A., Havran, W.L., and Wilson, I.A. (2010). The molecular interaction of CAR and JAML recruits the central cell signal transducer PI3K. Science *329*, 1210–1214.

Vidal, M., Wieland, T., Lohse, M.J., and Lorenz, K. (2012). β -Adrenergic receptor stimulation causes cardiac hypertrophy via a G $\beta\gamma$ /Erk-dependent pathway. Cardiovasc. Res. *96*, 255–264.

Waldeyer, A. (2002). Anatomie des Menschen (Gruyter).

Wang, C.Q., Mruk, D.D., Lee, W.M., and Cheng, C.Y. (2007). Coxsackie and adenovirus receptor (CAR) is a product of Sertoli and germ cells in rat testes which is localized at the Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell interface. Exp Cell Res *313*, 1373–1392.

Wang, J., Wilhelmsson, H., Graff, C., Li, H., Oldfors, A., Rustin, P., Bruning, J.C., Kahn, C.R., Clayton, D.A., Barsh, G.S., et al. (1999). Dilated cardiomyopathy and atrioventricular conduction blocks induced by heart-specific inactivation of mitochondrial DNA gene expression. NatGenet *21*, 133–137.

Yanagawa, B., Spiller, O.B., Proctor, D.G., Choy, J., Luo, H., Zhang, H.M., Suarez, A., Yang, D., and McManus, B.M. (2004). Soluble recombinant coxsackievirus and adenovirus receptor abrogates coxsackievirus b3-mediated pancreatitis and myocarditis in mice. J Infect Dis *189*, 1431–1439.

Zen, K., Liu, Y., McCall, I.C., Wu, T., Lee, W., Babbin, B.A., Nusrat, A., and Parkos, C.A. (2005). Neutrophil migration across tight junctions is mediated by adhesive interactions between epithelial coxsackie and adenovirus receptor and a junctional adhesion molecule-like protein on neutrophils. Mol. Biol. Cell *16*, 2694–2703.

Zhang, L., Parham, N.J., Zhang, F., Aasa-Chapman, M., Gould, E.A., and Zhang, H. (2012). Vaccination with coxsackievirus B3 virus-like particles elicits humoral immune response and protects mice against myocarditis. Vaccine *30*, 2301–2308.

Duale Reihe Physiologie, 2010, Georg Thieme Verlag.

Cause-specific mortality, 2008: WHO region by country.

The European health report 2012: charting the way to well-being.

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Das Herz	4
Abbildung 2: Blutversorgung des Herzens	5
Abbildung 3: Komponenten des Oberflächen-EKGs.	7
Abbildung 4: Todesursachen in Europa	8
Abbildung 5: Die CAR-Genstruktur und Spleißvarianten.	11
Abbildung 6: Interaktionen von CAR	14
Abbildung 7: Die Coxsackievirus Genom- und Proteinstruktur	20
Abbildung 8: Erzeugung und Validierung des chCAR Expressionsvektors	49
Abbildung 9: Herstellung der CAR-Rescue-Maus	50
Abbildung 10: Expression von mCAR und chCAR in unterschiedlichen Geweben	51
Abbildung 11: Morphologische Untersuchung der Herzen.	52
Abbildung 12: Ultrastrukturelle Analysen der Herzen	52
Abbildung 13: Hämatoxylin-Eosin-Färbung nach CVB3-Infektion	55
Abbildung 14: In situ Hybridisierung nach CVB3-Infektion.	56
Abbildung 15: Immunantwort im Serum CVB3-infizierter Tiere	57
Abbildung 16: CVB3-Infektion im Herzen.	58
Abbildung 17: Intravenöse Inokulation mit CVB3.	59
Abbildung 18: Virusreplikation in Abhängigkeit verschiedener CAR-Spezies	60
Abbildung 19: Sequenzanalysen der CAR-Bindungsstellen	61
Abbildung 20: CAR-abhängige Überlebensrate nach einem Myokardinfarkt	63
Abbildung 21: Morphologie der Infarktregion 7 Tage nach dem Infarkt	64
Abbildung 22: Histologie der Herzen 30 Tage nach dem Infarkt	65
Abbildung 23: Messung des Herz- und Körpergewichts nach dem Infarkt	66
Abbildung 24: Expressionsunterschiede nach einem Myokardinfarkt	68
Abbildung 25: Expressionslevel relevanter Gene nach einem Myokardinfarkt	69
Abbildung 26: Westernblot-Analysen veränderter Gene	70
Abbildung 27: Expression der Connexine in WT- und KO-Herzen	70
Abbildung 28: Modell der CAR-abhängigen Protektion nach Myokardinfarkt	88

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Geräte. 24
Tabelle 2: Verwendete Enzyme
Tabelle 3: Verwendete Kits
Tabelle 4: Verwendete Primärantikörper 26
Tabelle 5: Verwendete Sekundärantikörper 27
Tabelle 6: Verwendete Genotypisierungsprimer. 27
Tabelle 7: Verwendete Primer zur Klonierung. 27
Tabelle 8: Verwendete Oligonukleotide zur real-time PCR
Tabelle 9: Pipettierschema zur Detektion von WT-, recf- und rec- Allelen
Tabelle 10: Primer und Produktgrößen zur Bestimmung des CAR-Genotyps
Tabelle 11: Pipettierschema zur Detektion der Cre-Rekombinase und des chCAR
Transgens
Tabelle 12: Primer und Produktgrößen zur Detektion der Cre-Rekombinase
Tabelle 13: Primer und Produktgrößen zur Detektion des chicken CAR
Tabelle 14: Pipettierschema zur Amplifizierung des chicken CAR-Konstrukts35
Tabelle 15: Pipettierschema für die RT-PCR 40
Tabelle 16: Programm zur Einbettung von Geweben in Paraffin
Tabelle 17: Körperzusammensetzung der chCAR transgenen- und Rescue-Tiere 51
Tabelle 18: Echokardiographie. 53
Tabelle 19: Elektrokardiographie 54
Tabelle 20: Kardiale Funktion 30 Tage nach dem Myokardinfarkt
11 Abkürzungsverzeichnis

11.1 Allgemeine Abkürzungen

AS	Aminosäure
AV	atrio-ventrikulär
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	komplementäre DNA
СНО	Chinese Hamster Ovary
Cre	Cre-Rekombinase
CVB3	Coxsackievirus Typ B3
СуЗ	Cyanine dye 3
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
dest.	destilliert
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidetriphosphat
dpi	Days post infection
E	Embryonischer Tag nach Fertilisation
ECM	Extrazelluläre Matrix
EKG	Elektrokardiogramm
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF	Ejection fraction
FS	Fractional shortening
FCS	Fötales Kälberserum
Fwd	forward
H&E	Hämatoxylin-Eosin
HG	Herzgewicht
HRE	Hypoxia Respone Element
HRP	Meerrettichperoxidase

Immunglobulin
Immunglobulin-Superfamilie
Internal Ribosome Entry Site
Kilo Dalton
Körpergewicht
Knockout
Linker Ventrikel
Links ventrikulärer Durchmesser
Myokardinfarkt
Multiplicity of infection
Messenger Ribonucleotide Acid
Polyacrylamidgelelektrophorese
Phosphate Buffered Saline
Polymerasekettenreaktion
Paraformaldehyd
Plaque forming units
Renin-Angiotensin-System
Ramus circumflexus
reverse
Ramus interventricularis anterior
Rounds per minute
Raumtemperatur
Real time-PCR
Standardfehler des Mittelwertes
Natriumdodecylsulfat
Tris-Acetat-EDTA
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Polyoxymethylenether
Einheit (unit)
Virales Protein genomassoziiert
Wildtyp

11.2 Abkürzungen von Proteinen

ACE	Angiotensin Converting Enzyme
AGTR1	Angiotensin-Rezeptor 1
ANG	Angiotensin
β-Cat	Beta Catenin
DAF	Decay Accelerating Factor
CAR	Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptor
CD155	Cluster of Differentiation 155
CX	Connexin
ERK	Extracellular Regulated Kinase
HIF1α	Hypoxia induced Factor 1 alpha
ICAM 1	Intercellular adhesion Molecule 1
IFNβ	Interferon beta
IL	Interleukin
MHC	Myosin Heavy Chain
MLC	Myosin Light Chain
MUPP1	Multi-PDZ Domain Protein 1
JAML	Junctional Adhesion Molecule-Like
JAM-3	Junctional Adhesion Molecule 3
LNX	Ligand of Numb Protein-X
MAGI-1b	Membraneassociated Guanylkinase 1b
MUPP1	Multi-PDZ Domain Protein 1
PSD 95	Postsynaptic Density 95
RANTES	Regulated on Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted
TNFα	Tumor Necrosos Factor alpha
TNT	Troponin T
ZO-1	Zona Occludines 1

12 Danksagungen

Ich danke Herrn Prof. Dr. Michael Gotthardt für die Möglichkeit meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen, sowie für seine individuelle Betreuung, Forderung und Förderung während meiner Zeit als Doktorand.

Des Weiteren danke ich Herrn Prof. Dr. Haucke für seine Bereitschaft die Betreuung von Seiten der Universität zu Übernehmen.

Ich bedanke mich bei der Arbeitsgruppe Gotthardt für das gute Arbeitsklima. Besonders bei Dr. Uta Wrackmeyer für die Hilfe bei projektbezogenen Fragestellungen. Bei Franziska Rudolph für die wissenschaftlichen und nicht wissenschaftlichen Gespräche. Bei Janine Fröhlich für eine ausgezeichnete technische Assistenz. Bei Mathias Pippow vor allem für die Hilfe bei den Myokardinfarktoperationen. Bei Michaela Naschke für die Unterstützung bei den histologischen Arbeiten und bei Beate Golbrich für die Labororganisation.

Franziska Rudolph und Claudia Fink danke ich für die Hilfe bei der Korrektur dieser Arbeit.

Bei Prof. Dr. Karin Klingel und Dr. Martina Sauter möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit bei den CVB3-Infektionen im Tiermodell bedanken.

Bei Dr. Henry Fechner und Dr. Sandra Pinkert bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit bei den CVB3-Infektionen der Zellkulturen.

Dr. Arnd Heuser, Martin Taube und Stefanie Schelenz möchte ich für die Durchführung der Echokardiographie und Elektrokardiographie danken.

Dr. Bettina Purfürst danke ich für die Hilfe bei den ultrastrukturellen Analysen.

Herrn Prof. Dr. Fritz Rathjen danke ich für die Bereitstellung des chCAR Genkonstrukts sowie des chCAR Antikörpers.

Bei Herrn Prof. Dr. Michael Bader bedanke ich mich für die Bereitstellung des MLC 2-Promotor Konstrukts.

Der internationalen Helmholtz reseach school TransCard danke ich für die finanzielle Unterstützung und diverse Weiterbildungsmöglichkeiten.

13 Anhang

Sequenzvergleich der CAR-Proteine des Menschen (Homo sapiens), der Maus (Mus musculus), des Huhns (Gallus gallus) und des Zebrafisches (Danio rerio). Das Signalpeptid ist kursiv dargestellt, die Transmembranregion ist unterstrichen.

Homo sapiens Mus musculus Gallus gallus Danio rerio	MALLLCFVLLCGVVDFARSLSITTP-EEMIEKAKGETAYLPCKFTL MARLLCFVLLCGIADFTSGLSITTP-EQRIEKAKGETAYLPCKFTL MEPPPLVLLVGLALLGAAGLTRSLSITSA-ESAFEKAQGERVTLPCTFEL MDMRTSFLCVTYVILLTGSACGLQITSTGQTSIEKASGESVKLDCQFTL :* ::.*.**:.: :***.** . * * * *	45 45 49 49
Homo sapiens Mus musculus Gallus gallus Danio rerio	SPEDQGPLDIEWLISPADNQKVDQVIILYSGDKIYDDYYPDLKGRVHFTS SPEDQGPLDIEWLISPSDNQIVDQVIILYSGDKIYDNYYPDLKGRVHFTS SEEDVGTLDIEWVLIPADIQKKEETIILYSGDRIYNHYHPALAGRLQFTS ASDDSGPLDIEWSLQPSDNQKEEKVVIVYSGDRAFEHYYDPLKGRVHFNS : :* *.***** : *:* * ::::*:****: ::.*: * **::*.*	95 95 99 99
Homo sapiens Mus musculus Gallus gallus Danio rerio	NDLKSGDASINVTNLQLSDIGTYQCKVKKAPGVANKKIHLVVLVKPSGAR NDVKSGDASINVTNLQLSDIGTYQCKVKKAPGVANKKFLLTVLVKPSGTR SDPKSGDGSVDILNLKSADTGTYQCKVKKAPGVESLKIQLNVLVKPASTK PDPKNGDASMNIMGLKATDTGTYQCKIKKVPGIASRKYLLTVMVRPSKPK * *.**.*::: .*: :* *****::**.**: . * * *:*:*:.:	145 145 149 149
Homo sapiens Mus musculus Gallus gallus Danio rerio	CYVDGSEEIGSDFKIKCEPKEGSLPLQYEWQKLSD-SQKMPTSWLAEMTS CFVDGSEEIGNDFKLKCEPKEGSLPLQFEWQKLSD-SQTMPTPWLAEMTS CSIEGSQEIGKDIVLKCASQEGTPLLYYDWRRVVTGTQGLPATSVLNKNT CSAEGQTYVGKNMVLKCSSVEGTQPMEYIWERTSG-NKLLPPLAILDKVT * :*. :*.:: :** . **: :: : *.: .: :*. :: :	194 194 199 198
Homo sapiens Mus musculus Gallus gallus Danio rerio	SVISVKNASSEYSGTYSCTVRNRVGSDQCLLRLNVVPPSNKAGL <u>IAGAII</u> PVISVKNASSEYSGTYSCTVQNRVGSDQCMLRLDVVPPSNRAGT <u>IAGAVI</u> GELLLKNASKDYSGTYSCVASNRVGTDECSVELNVTPPINTAGV <u>IAGAIL</u> GTMTLKNATGDASGTYRCQAKNRVGTEECVVEVTITQPPNTAGIIAGVII : :***: : **** * . ****:::* :.: * * ** ***	244 244 249 248
Homo sapiens Mus musculus Gallus gallus Danio rerio	GTLLALALIGLIIFCCRKKRREEKYEKEVHHDIREDVPPPKSRTSTARSY GTLLALVLIGAILFCCHRKRREEKYEKEVHHDIREDVPPPKSRTSTARSY GTLLGLALLAFLVICCCKKHREKKYEKEVHHEIREDVLPPKSRSSTARSY CILLLILLALIFCCCRARHKKKYEKEIAYEIREDVPPPKSRVSTARSF ** * *:. :::** : :::*****	294 294 299 298
Homo sapiens Mus musculus Gallus gallus Danio rerio	IGSNHSSLGSMSPSNMEGYSKTQYNQVPSEDFERTP-QSPTLPPAKVA IGSNHSSLGSMSPSNMEGYSKTQYNQVPSEDFERAP-QSPTLAPAKVA IGSNRSSLGSMSPSNMEGYSKTPYSQVPSEDFERTSGQNQTIASSKVA TSVGSQRSSLGSMSPSNLHEYSKPQYDKIPSEEYDRPPSHAPIPPPSRMA :**::********:. ***. *.::***:::* :::*	341 341 347 348
Homo sapiens Mus musculus Gallus gallus Danio rerio	APNLSRMGAIPVMIPAQSKDGSIV 365 APNLSRMGAVPVMIPAQSKDGSIV 365 APNLSRMGAVPVMIPAQSKDGSIV 371 GPNLSRMGAIPVMIPAQNKDGSIV 372	