

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

DISSERTATION

Expression der mRNA des Endothelin-konvertierenden Enzyms-1 und des
Präproendothelins-1 im murinen
Coxsackievirus B 3-Myokarditismodell

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité–Universitätsmedizin Berlin

von

Sandra Boche

aus Luckenwalde

Datum der Promotion: 8.12.2017

Diese Arbeit ist meiner Mutter Heidrun und meiner Schwester Mary gewidmet.

Inhalt

Abstract.....	6
Abstrakt.....	7
1 Einleitung	8
1.1 Myokarditis.....	8
1.1.1 Etiologie.....	8
1.1.2 Die Phasen der Myokarditis im Tiermodell	8
1.1.2.1 Die akute Phase (Tag 0 bis 3).....	8
1.1.2.2 Die subakute Phase (Tag 4 bis 14)	9
1.1.2.3 Die chronische Phase (ab Tag 15).....	10
1.1.3 Symptome	11
1.1.4 Diagnose	12
1.1.5 Therapie	12
1.2 Coxsackieviren	13
1.3 Das Endothelinsystem	14
1.3.1 Endothelin	14
1.3.1.1 Endothelin-Isoformen	14
1.3.1.2 Endothelinsynthese	14
1.3.1.3 Gewebeexpression und Wirkung	16
1.3.1.4 Regulierung.....	18
1.3.2 Endothelin (ET)-Rezeptoren.....	19
1.3.2.1 Struktur.....	19
1.3.2.2 Funktion	20
1.3.3 Endothelin-konvertierendes Enzym (ECE)	20
1.3.3.1 ET-1-Synthese	20
1.3.3.2 Gewebeexpression und Wirkung	21
1.3.3.3 ECE-1-Isoformen	22
1.3.3.4 Gewebeexpression	24
1.4 Endothelin und Myokardschädigung.....	25
1.5 Ziele der Arbeit	26
2 Materialien und Methoden.....	27
2.1 Materialien	27

2.1.1	Kits	27
2.1.2	Verbrauchsmaterial	27
2.1.3	Chemikalien.....	28
2.1.4	Primer.....	29
2.1.5	Bakterien	30
2.1.6	Versuchstiere	30
2.1.7	Histologische Charakterisierung.....	30
2.1.8	Geräte	33
2.2	Methoden.....	34
2.2.1	Infektion der Mäuse und Gewebeentnahme.....	34
2.2.2	Herstellung muriner cDNA.....	34
2.2.2.1	RNA-Isolierung aus murinen Herzen.....	34
2.2.2.2	Aufreinigung der RNA	35
2.2.2.3	Quantifizierung der RNA	36
2.2.2.4	Reverse Transkription der RNA in cDNA	36
2.2.3	Amplifizierung der cDNA mittels PCR.....	37
2.2.4	Gelelektrophorese	39
2.2.5	Quantifizierung der cDNA mittels Real-Time PCR.....	40
2.2.6	Sequenzierung der Isoformen-cDNA.....	42
2.2.6.1	Ligation.....	43
2.2.6.2	Transformation	44
2.2.6.3	Plasmid Mini-Präparation	46
2.2.6.4	Restriktionsverdau	47
2.2.6.5	Sequenzierungs PCR.....	48
2.2.6.6	Ethanol-fällung und Waschung der DNA.....	49
2.2.7	Statistische Auswertung	49
2.2.8	Abbildungen	49
3	Ergebnisse	50
3.1	Standardreihen zur Effizienztestung der Primer	50
3.2	Dissoziationskurven zur Primerspezifisierung der ECE-1 Isoformen, präproET-1 und 18S	53
3.3	Qualitative Expression der mRNA der kardialen ECE-1-Isoformen	55
3.4	mRNA-Expression der ECE-1-Isoformen im Verlauf der Myokarditis	57

3.5	Vergleich der basalen mRNA-Expression der ECE-1-Isoformen des akuten mit dem chronischen Myokarditismodell	60
3.6	Vergleich der mRNA Expression der ECE-1-Isoformen von A.BY/SnJ mit C57Bl/6 im Krankheitsverlauf.....	61
3.7	präproET-1-mRNA-Expression im Verlauf der Myokarditis.....	67
4	Diskussion.....	69
4.1	ECE-1 und ET-1 als unterstützender Faktor in der Pathophysiologie kardialer Erkrankungen	69
4.2	Histologische stammspezifische Unterschiede während des Myokarditisverlaufes	70
4.3	Differierende ECE-1-Isoformenkonzentrationen im Krankheitsverlauf als möglicher Baustein der Chronifizierung	71
4.4	Aufregulation des ET-1 Systems getragen durch ECE-1d und b?.....	74
4.5	Basale Expressionsdifferenzen als günstigere Abwehrstellung	75
4.6	Der Beitrag von präproET-1 im Rahmen der Entzündungskaskade	76
4.7	Alternative Endothelin-1-Synthese und ECE-1-Substrate im Entzündungsprozess	77
4.8	ET-1 und ECE-1-Isoformen als therapeutischer Ansatzpunkt im Myokarditismodell	79
5	Diskussion der angewandten Methoden	81
6	Zusammenfassung.....	82
7	Abbildungsverzeichnis	83
8	Abkürzungsverzeichnis	84
9	Literaturverzeichnis	88
Anhang		101
	dCt-Daten A.BY	101
	dCt-Daten C57Bl/6.....	102
	Dissoziationskurven ECE-1 b bis d.....	103
	Veröffentlichung als freier Vortrag.....	104
	Danksagung.....	105
	Lebenslauf	106
	Eidesstattliche Versicherung.....	108

Abstract**Introduction**

Endothelin-1 (ET-1) is involved in the pathophysiology of viral myocarditis and its expression is upregulated. ET-1 overexpression in cardiomyocytes leads to myocarditis. Different courses are known from the development of an acute disease with complete healing up to the chronification with heart failure. The role of endothelin-converting enzyme-1 isoforms (ECE-1 isoforms) and preproEndothelin-1 (prepro ET-1) in these courses is unknown.

Methods and results

Four-week-old mice were inoculated with coxsackievirus B3. C57BL/6 mice which develop an acute myocarditis after virus inoculation and A.BY/SnJ mice which develop a chronic myocarditis were used. They were killed on day 4, 8, 12 or 28 post infectionem (p.i.). Uninfected mice served as control on day 0. The RNA was isolated with trizol and transcribed in cDNA and the expression of ECE-1 isoforms and preproET-1 was analyzed by real time PCR and related to 18S RNA.

Results

mRNA of the ECE-1 isoforms was detectable in all samples. All infected animals developed a myocarditis. The basal expression (day 0) of all four isoforms in C57Bl/6 was in excess of A.BY. There were differences in the course of disease between the lines. C57Bl/6 showed almost barely alteration in contrast to A.BY mice which indicated constant ECE-1a level and increased quantity of ECE-1b and d and less of ECE-1c. This upregulation occurred in b and d at day four, in isoform c 28 days after virus infection. The expression of preproET-1 in C57Bl/6 was unvaried whereas A.BY showed an upregulation from day eight. Due to small sample sizes observed differences missed statistical significance.

Conclusion

This study indicates that some of the ECE-1 isoforms and preproET-1 could be correlated with the course of chronic myocarditis and provide new approaches in treatment of murine myocarditis.

Abstrakt

Einleitung Endothelin-1 (ET-1) ist in die Pathophysiologie von viralen Myokarditiden involviert. Eine Überexpression von ET-1 in Kardiomyozyten führt zu einer Myokarditis. Dabei existieren verschiedene Krankheitsverläufe: von der Ausbildung einer akuten Myokarditis mit vollständiger Ausheilung bis hin zu chronischen Verläufen mit Folgeschäden wie der Herzinsuffizienz. Die Rolle der ECE-1-Isoformen und des Präproendothelins-1 in diesen Verläufen ist unklar.

Methoden Vier Wochen alte Mäuse wurden mit dem Coxsackievirus B3 infiziert. Verwendet wurde zum einen C57BL/6, ein Mausmodell welches daraufhin eine akute Myokarditis entwickelt und A.BY/SnJ, die einen chronischen Verlauf der Erkrankung zeigen. Sie wurden 4, 8, 12 oder 28 Tagen nach Infektion getötet. Nicht infizierte Mäuse (Tag 0) dienten als Kontrolle. Die RNA wurde mit Trizol isoliert und in cDNA transkribiert. Die Expression der ECE-1-Isoformen und des Präproendothelins-1 wurde durch real-time PCR analysiert und auf 18S standardisiert.

Ergebnisse Die mRNA der ECE-1-Isoformen war zu allen Zeitpunkten nachweisbar. Alle infizierten Tiere entwickelten eine Myokarditis. Die basale Expression (Tag 0) aller vier Isoformen war in C57Bl/6 höher als in A.BY. Zudem zeigten sich Unterschiede im Krankheitsverlauf zwischen den Stämmen. Während in C57Bl/6 nahezu keine Änderung detektierbar war, wiesen A.BY Mäuse ein konstantes ECE-1a bei steigendem ECE-1b und d, geringer auch von Isoform c auf. Diese Hochregulation fand sich in b und d ab Tag vier, c zeigte diese zum Tag 28.

Die Expression von präproET-1 verlief in C57Bl/6 unverändert wohingegen A.BY einen Anstieg ab Tag acht aufwies.

Aufgrund der geringen Fallzahl waren diese Unterschiede nicht statistisch signifikant nachweisbar.

Schlußfolgerung Diese Studie zeigt, dass einzelne ECE-1-Isoformen und präproET-1 Einfluss auf den Verlauf der Myokarditis haben könnten und somit einen möglichen Ansatz für die Behandlung der Myokarditis im Mausmodell darstellen könnten.

1 Einleitung

1.1 Myokarditis

1.1.1 Etiologie

In den Industrieländern wird die virale Infektion unter den infektiösen, neben toxischen, autoimmunen und idiopathischen, als häufigste Ursache für eine Myokarditis genannt (Kearney et al., 2001). Dabei beeinflussen Geschlecht, Alter, Unter-/Mangelernährung, der Immunstatus und genetische Faktoren die Anfälligkeit eines Individuums für die Virusinfektion (Gatmaitan et al., 1970, Huber et al., 1982, 1984 und 1994). Sie kann in eine chronische Herzerkrankung münden und für einen plötzlichen Herztod verantwortlich sein. Neben der direkt virusvermittelten, zytotoxischen ist die immunsysteminduzierte Gewebeerstörung ein wichtiger Faktor in der Pathogenese der Erkrankung (Kawai et al., 1975, Lodge et al., 1987). Des Weiteren gibt es die Hypothese der virusinduzierten zelleigenen Apoptose (Gougeon et al., 1993; Rao et al., 1992). Die Virusmyokarditis ist eine Erkrankung, welche nach Kawai et al. (1999) einen phasenhaften Verlauf aufweist.

1.1.2 Die Phasen der Myokarditis im Tiermodell

1.1.2.1 Die akute Phase (Tag 0 bis 3)

In der akuten Phase erreicht das Virus infolge der Virämie sein Zielorgan, wirkt selbst direkt zytolytisch und induziert simultan eine körpereigene proinflammatorische Antwort. In einem murinen Myokarditismodell injizierten Wilson et al. 1969 Versuchstieren das kardiotope Encephalomyokarditisvirus (EMCV) intraperitoneal und fanden infolge der Virämie über Darm-und Respirationstrakt in dieser Phase histologisch nur nekrotischen Muskelfasern ohne eigene Abwehrzellen. Lim et al. bestätigten dies 2005. Badorff et al. konnten 1999 zeigen, dass eine virale Protease (2A) auf direktem Wege den Sarcoglycankomplex des Myozyten modifizieren kann.

McManus et al. (1993) wie auch Chow et al. (1992) unterstrichen die virusinduzierte Zytolyse als den dominanten Schädigungsmechanismus in der akuten Phase der Myokarditis. Die zellulär vermittelte Zytotoxizität sei hier in ihrer Bedeutung eher untergeordnet. Die mRNA Titer für proinflammatorische, kardial exprimierte Zytokine wie IL-1 β , TNF- α oder IFN- γ steigen langsam (Seko et al., 1997).

Das Maximum an kardialer Viruskonzentration fand man nach drei bis vier Tagen nach Infektion (p. i., Kawai, 1999).

1.1.2.2 Die subakute Phase (Tag 4 bis 14)

In der subakuten Phase kommt es zur zellulären Infiltration des Myokards, überwiegend durch Makrophagen, T-Lymphozyten und NK (natürliche Killer)-Zellen. Sie dienen als frühe Zytokinproduzenten um weitere Zellen zu aktivieren. Seko et al. untersuchten hierzu 1997 die Zytokinmuster in CVB3-infizierten (Coxsackievirus B3) C3H/He-Mäusen. Demnach finden sich insbesondere ab Tag fünf steigende Titer für IL-2, -3, -4, IL-10, TNF- α und TNF- β , IFN γ und GM-CSF. Diesen kommen diverse Aufgaben zu, welche überlappen, sich positiv verstärken oder negativ beeinflussen können. Neben der Zellaktivierung induzieren sie weitere Zytokinkaskaden und tragen damit maßgeblich zur Regulierung einer Immunantwort bei.

NK-ähnliche Zellen produzieren Perforine, die die Zelloberfläche der Kardiomyozyten zersetzen (Seko et al., 1991, Godeny & Gauntt, 1987). Sie selbst sind ohne die Mitwirkung von T- und B-Lymphozyten nicht in der Lage, eine CVB3-Infektion zu beherrschen (Chow et al., 1992).

IFN- β , produziert von Fibroblasten, hemmt im humanen in-vitro-Versuch die Replikation von CVB3 (Kandolf et al., 1985). Es aktiviert weitere Makrophagen und induziert deren Stickstoffmonoxid-Synthetase (iNOS) (Kamijo et al., 1993). Stickstoffmonoxid wirkt selbst antimikrobiell durch Hemmung der Virusreplikation, indem es die 2A-Protease des CVB3 inaktiviert, welche für die Zerstörung des kardialen Dystrophin verantwortlich ist (Lowenstein et al., 1996, Zaragoza et al., 1998).

Durch TNF α und IFN γ werden MHC-I-Antigen (Major Histocompatibility Complex) und ICAM-1 stark induziert (Seko et al., 1990, 1993).

ICAM-1 ist ein interzelluläres Adhäsionsmolekül, das die Bindung von Leukozyten an die Zelle verbessert und ihre Transmigration in das Gewebe ermöglicht. Es findet sich typischerweise auf Endothel- und Immunzellen (Hua, 2013). Das CVB3-Virus wird durch intrazelluläre Prozesse fragmentiert und anschließend auf der Zelloberfläche über den Haupthistokompatibilitätskomplex (von engl. MHC) präsentiert (Doherty und Zinkernagel, 1974). Zytotoxische T-Zellen erkennen diese Präsentation und lysieren die infizierte

Zelle. Bei Lim et al. (2005) fand sich das Maximum an myokardialer Entzündung um den siebten Tag nach Infektion.

Ab Tag acht waren zunehmend neutralisierende Antikörper nachweisbar mit einem Maximum um Tag 14. Dies ging mit einem kontinuierlichen Abfall des Virustiters einher. Kishimoto fand 1985 in mit EMCV infizierten DBA/2- und Balb/c-Mäusen als zweite Einwanderungswelle der Zellinfiltration rasch steigende Titer für T-Lymphozyten bis zum 14.Tag.

Die subakute Phase umfasst die Gewebeeinfiltration körpereigener spezifischer und unspezifischer Abwehrzellen, welche selbst zytotoxisch wirken und durch Zytokinkaskaden weitere zelleigene Abwehrmechanismen aktivieren, um das Virus zu eliminieren.

1.1.2.3 Die chronische Phase (ab Tag 15)

Neben den Patienten, deren Myokarditis folgenlos ausheilt gibt es Fälle, bei denen die Erkrankung einen chronischen Verlauf nimmt. Der Zeitraum über 14 Tage nach Krankheitsbeginn entspricht der chronischen Phase.

Ouyang et al. entwickelten 1995 ein sensitiveres System zum Nachweis enteroviraler RNA im Myokard CVB3-infizierter SWR-Mäuse. Dabei wurden die ersten 30 Tage nach Virusinfektion analysiert. Bis zum 9. Tag nach Infektion war ein Virusnachweis möglich, virale RNA hingegen war über die gesamte Zeit detektierbar.

Kawai et al. konnten mittels PCR bei DBA/2-Mäusen 90 Tage nach EMCV-Myokarditis ebenfalls virale RNA nachweisen. Histologisch zeigte sich zu diesem Zeitpunkt das Bild einer interstitiellen Fibrose, mit und ohne entzündliche Veränderungen, myokardialer Hypertrophie und Ventrikeldilatation. Die nekrotischen Fasern werden bindegewebig ersetzt oder kalzifizieren. Eine dilatative Kardiomyopathie kann resultieren (Grodums et al., 1959, Herskowitz et al., 1987).

Pauschinger et al. konnten 1999 in Patienten mit linksventrikulärer Dysfunktion und dem Verdacht der Myokarditis mittels in-situ-Hybridisierung aktive Replikationen enteroviraler RNA im Myokard nachweisen. Beobachtungen dieser Art führten zu der Vermutung, dass das persistierende Virus zu einer anhaltenden Myokardschädigung beitragen könnte ohne dabei direkt infektiös zu sein und somit einen wesentlichen Baustein in der

Chronifizierung darstellt (Kandolf et al., 1999, Klingel et al., 1992 und Wessely et al., 1998).

Des Weiteren vermutet man aufgrund autoreaktiver T-Zellen und kreuzreagierender Autoantikörper eine autoimmunvermittelte Myokardschädigung. Die Ursache letztgenannter ist in der Ähnlichkeit der Virusstruktur, des Proteines VP1 des Viruskapsids, zu myokardialen Anteilen zu suchen, (Cunnigham, 1992). Kardiales Myosin weist, verglichen mit CVB3-Protein, Sequenzhomologien bis zu 40% auf (Neu et al., 1987, Klump et al., 1990). Dabei werden körpereigene Proteine, insbesondere mitochondriale Proteine im Myokard sowie anti- α -Myosin als fremd erkannt und ebenfalls zerstört. Neu et al. injizierten 1987 in A.BY/SnJ Mäusen gereinigtes Myosin, woraufhin die Tiere eine voranschreitende Myokardschädigung zeigten.

Die chronische Phase ist geprägt durch eine anhaltende progrediente Schädigung des Myokards mit zunehmend irreversiblen Umbauprozessen bei sinkenden Virustitern.

1.1.3 Symptome

Die Myokarditis ist eine Entzündung des Herzmuskelgewebes, die meist stumm oder unspezifisch verläuft. Mögliche erste Symptome sind grippeähnlich mit Husten, Schnupfen, Fieber, Müdigkeit, Kurzatmigkeit und Kopfschmerzen bis hin zu Kreislaufzusammenbrüchen.

Bei einem Großteil der Patienten heilt die Erkrankung folgenlos aus (Schultz et al., 2009, Giesecke, 1987).

Die verbleibenden Fälle entwickeln eine chronische Form der Myokarditis, die nicht selten in einer dilatativen Kardiomyopathie (DCM) endet (D'Ambrosio et al., 2001), bei der das Herz auch nach Remodellierungsprozessen seine ursprüngliche Form und Funktion verloren hat. Rasche Erschöpfungszustände und Atemnot durch die unzureichende Versorgung des Körpers mit Blut und Sauerstoff sowie Rückstau von Blut in Lunge und Beinvenen sind die Folge. Herzklappenschäden können resultieren, welche weitere Erkrankungskaskaden begünstigen.

1.1.4 Diagnose

Es finden sich unterschiedlichste EKG-Veränderungen wie Sinustachykardien, ein verlängertes QT-Intervall (Gesamtdauer der Herzkammererregung), komplette Blockbilder sowie Tachyarrhythmien, oft kombiniert mit Brustschmerzen. Die Ventrikelfunktion in der Systole kann herabgesetzt sein und es können Wanddickenabnormitäten innerhalb des Ventrikels gefunden werden (Kearney et al., 2001, Noutsias, 2003, Liu und Mason, 2001). Symptomatisch wird die Erkrankung meist erst, wenn bereits ein Großteil des Herzens betroffen und nachhaltig geschädigt ist.

Durch den meist inapparenten oder unspezifischen Verlauf ist es schwierig, eine aktuelle Inzidenz der Myokarditisfälle anzugeben. Hinzu kommt, dass die Diagnosestellung selbst oftmals Schwierigkeiten bereitet, da sich die erforderlichen Dallas-Kriterien nur durch eine Biopsie des Endomyokards sichern lassen (Aretz et al., 1987).

1.1.5 Therapie

Die Therapie der Myokarditis ist symptomatisch und auf das vorliegende Stadium der Entzündung ausgerichtet. Es erfordert generell strenge körperliche Schonung und Sportkarenz. Je nach Schweregrad kommen Medikamente der Herzinsuffizienztherapie wie ACE-Hemmer, Betablocker und Diuretika zum Einsatz. Bei fulminanten Verläufen kann eine Intensivmedizin mit zeitweise extrakorporalem Kreislaufersatzverfahren notwendig werden. Nachhaltige Schädigungen und maligne Rhythmusstörungen können die Implantation eines Defibrillators erfordern. Die Ultima ratio stellt die Transplantation des Herzens dar.

Baba et al. konnten 2000 in EMCV infizierten Mäusen eine Reduktion des hypertrophen Myokards erzielen, indem sie den Tieren einen Angiotensin-II-Typ 1 Rezeptor-Antagonisten applizierten.

Kühl et al. erreichten 2003 durch die Behandlung von Patienten, die an einer Virusmyokarditis mit nachweislich persistierendem Virusgenom im Myokard erkrankt waren, mit Interferon β eine Eliminierung des Virus und eine Verbesserung der linksventrikulären Funktion.

1.2 Coxsackieviren

Es sind viele kardiotope Viren beschrieben worden. Zu ihnen zählen neben den hier interessierenden Enteroviren das Influenzavirus, das HIV (Human Immunodeficient Virus), das HCMV (Humanes Cytomegalievirus), das humane Adenovirus, das Hepatitis C-Virus (Kearney et al., 2001, Woodruff 1980).

Man geht davon aus, dass ein beträchtlicher Teil der akuten viralen sowie etwa ein Viertel der chronischen viralen Myokarditiden in den Industrieländern durch Enteroviren bedingt sind (Bowles et al., 2003).

Eine Untergruppe derer stellen die Coxsackieviren dar. Sie gehören zur Familie der Picornaviren. Man unterteilt sie in A und B, klassifiziert anhand ihrer Pathogenität in neugeborenen Mäusen (Hyypiä et al., 1993). Lerner et al. verdeutlichten, dass von CV-Typ B, mit insgesamt sechs Untergruppen, nur die Stämme eins bis fünf in Nord- und Westeuropa sowie den USA zirkulieren.

CVB3-Viren sind einzelsträngige, kapsidumhüllte, positive RNA-Viren von kubischer Form (Chatterjee & Nejman, 1985, Klump et al., 1990).

Der Mensch stellt den natürlichen Wirt dieses Virus dar. Es gelangt zumeist durch den Speiseweg über die lymphatischen Gewebe, später auch über die Darmwand, mit initialer Fächerung über fast alle Organe, zu seinen eigentlichen Zielorganen: Herz, Pankreas, Milz und Lymphknoten (am ehesten in den Sekundärfollikeln und den darin befindlichen B-Zellen) (Klingel et al., 1996). Es kann im Zusammenhang mit Immunzellen wirken, sie infizieren und in ihnen verbleiben (Kandolf et al., 1999, Carthy et al., 1997, Klingel et al., 1996).

Der Infektionszyklus mit der einzelnen Zelle umfasst die Adsorption, Penetration durch Endozytose, das Uncoating, die Replikation der RNA und Virusproteinsynthese mit anschließender Zellyse. Während der Virusreplikation ist die zelleigene Proteinsynthese gehemmt (Price et al., 1996).

Sie weisen eine hohe Mutationsrate auf.

Bereits 1978 wiesen Kawai et al. in Mäusen eine durch CVB3-Injektion induzierte Myokardschädigung nach, welche mit Kalzifizierung und Fibrose einherging.

Mäuse des C57BL/6 Stammes entwickeln nach Infektion von Coxsackie B3-Viren (Nancy strain) eine akute Myokarditis, von der sich die Tiere nahezu vollständig erholen (Leipner

et al., 2004). Sie reagieren mit einer starken IgG Antwort und eliminieren das Virus innerhalb von 14 Tagen (Kandolf et al., 1999, Wolfgram et al., 1986).

Dagegen entwickeln die Tiere des A.BY/SnJ Stammes nach Einimpfen des gleichen Erregers zunächst eine akute und im Verlauf, durch Persistenz des Virus, eine chronische Herzmuskelentzündung (Wolfgram et al., 1986). Sie haben höhere Titer proinflammatorischer Zytokine sowie mehr Mastzellen.

1.3 Das Endothelinsystem

1.3.1 Endothelin

1.3.1.1 Endothelin-Isoformen

Endothelin ist ein, erstmals 1988 von Yanagisawa aus aortalen Endothelzellkulturen vom Schwein gewonnenes, aus 21 Aminosäuren bestehendes, vasokonstriktives Peptid.

Bislang identifiziert sind drei Isoformen: Endothelin (ET) -1, Endothelin (ET) -2, Endothelin (ET) -3, welche enzymatisch jeweils aus einem Vorläuferpeptid gespalten werden. Jedes Peptid umfasst 21 Aminosäuren (Inoue et al., 1989). Die dafür kodierenden Gene sind seit 1989 bekannt. ET-2 und -3 unterscheiden sich in zwei bzw. sechs Aminosäuren von ET-1 (Inoue et al., 1989, Bloch et al., 1989). Alle drei Endotheline haben strukturelle Ähnlichkeit zu dem Schlangengift Sarafatoxin (Kloog et al., 1988).

Im murinen Genom liegt das Gen für *Et-1* auf Chromosom 13 (Mensch Chr. 6), für *Et-2* auf Chromosom 4 (Mensch Chr. 1) und *Et-3* auf Chromosom 2 (Mensch Chr. 20) (Bloch et al., 1989, Inoue et al., 1989, Arinami et al., 1991).

1.3.1.2 Endothelinsynthese

Präpro-Endothelin mRNA, dem Transkriptionsprodukt des Endothelingenes, wird in Präproendothelin-1 (präproET-1) translatiert, welches aus 212 Aminosäuren besteht (Inoue et al., 1989). Durch proteolytische Abspaltung des Signalpeptides im endoplasmatischen Retikulum entsteht Proendothelin-1 (Rubanyi & Polokoff, 1994). Dieses wird im folgenden Schritt durch eine Endopeptidase, genannt Furin, an spezifischen gepaarten basischen Aminosäuren getrennt (Denault et al., 1995) und weiter durch eine Carboxypeptidase am COOH-Ende durch Abspalten von Lysin und

Arginin zu bigET-1 gekürzt. Dessen finale hydrolytische Spaltung zwischen Tryptophan 21(Trp21) und Valin 22 (Val22), durch das substratspezifische Endothelin-konvertierende Enzym-1 (engl. Endothelin-converting enzyme-1, ECE-1) generiert das biologisch aktive Endothelin-1 (Xu et al., 1994).

Durch die vier Cysteinreste, an Position 1, 3, 11, und 15 in der Aminosäurefolge, bildet es zwei innerhalb der Kette befindliche Disulfidbrücken (zwischen As1 und As15 sowie As3 und As11) aus, so dass die Tertiärstruktur ein kommaähnliches Gefüge aufweist (identisch für ET-2 und ET-3). Ein Verlust dieser Brücken führt zu einer reduzierten Aktivität des Peptides (Inoue et al., 1989).

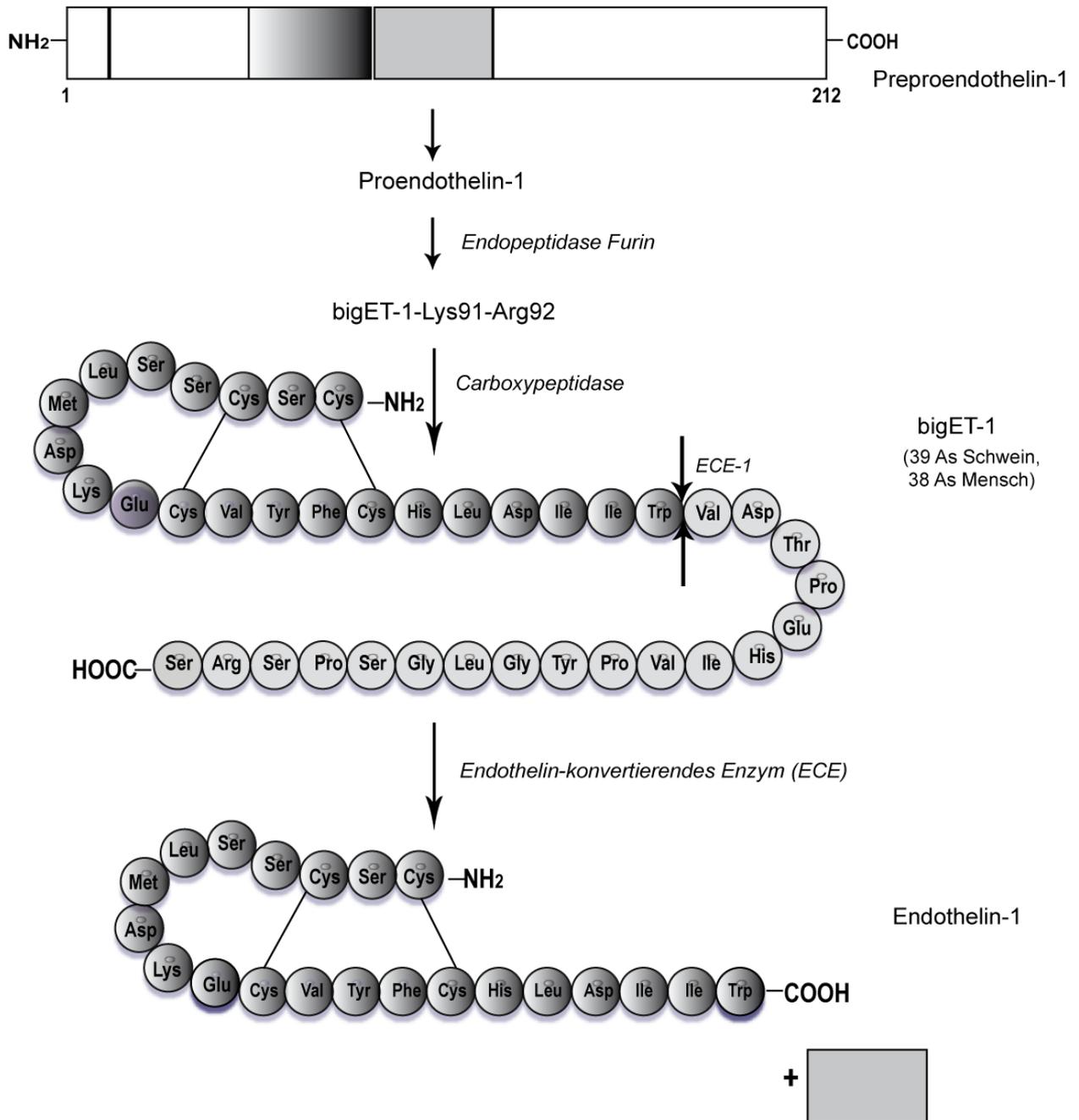


Abbildung 1: Endothelin-Spaltungskaskade

1.3.1.3 Gewebeerexpression und Wirkung

ET-1 findet sich überwiegend in Endothelzellen und den glatten Muskelzellen der Gefäße, aber auch in weiteren Organen (Ehrenreich et al., 1990, Sessa et al., 1991, Firth & Ratcliffe, 1992, Rubanyi & Polokoff, 1994).

ET-2 ist ebenfalls in Endothelzellen, im Herz, im Skelettmuskel und weiteren Lokalisationen nachweisbar (Davenport et al., 1991, Firth & Ratcliffe, 1992).

Die Expression von ET-3 erfolgt vorwiegend in der Lunge, im Gastrointestinaltrakt, in den Nieren und in neuronalen Zellen (Matsumoto et al., 1989, Rubanyi & Polokoff, 1994, Firth & Ratcliffe, 1992).

ET-1 gilt durch seine Induktion der Vasokonstriktion, durch Bindung an ET_A- und ET_B-Rezeptoren an glatten Gefäßmuskelzellen, als der wahrscheinlich potenteste Regulator des Gefäßmuskeltonus (Hirata et al., 1993).

Endothelin wirkt auto- und parakrin (Thomas et al., 1996, Yoshimoto et al., 1991, Ito et al., 1993).

Ishikawa et al. wiesen 1988 an Herzen von Meerschweinen ET-1-vermittelte inotropie- und outputsteigernde Effekt nach. Die Produktion des atrialen natriuretischen Peptides (ANP) wird gesteigert, der Fluss in den Koronarien gesenkt. ET-1 kann somit die Kontraktionsantwort der Kardiomyozyten steigern.

ET-1 stimuliert die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Kardiomyozyten und aortalen Endothelzellen in neonatalen Rattenzellkulturen (Hayasaki et al., 1996).

ET-1 induziert die Freisetzung von inflammatorischen Zytokinen (Yang et al., 2004, Finsnes et al., 2001) wie TNF, IL-6 (Stankova et al., 1996) und IL-8 (Zidovetzki et al., 1999). Es aktiviert pulmonale Mastzellen bei Meerschweinchen (Uchida et al., 1992) und wird selbst auch von Makrophagen und Monozyten (Ehrenreich et al., 1990) sowie Leukozyten (Sessa et al., 1991) freigesetzt.

Helset et al. beschrieben 1993 die Abhängigkeit der vaskulären Permeabilität von Endothelin-1. Zusätzlich regt es Hormonausschüttungen an und reguliert die Aktivität des zentralen Nervensystems (Jones et al., 1989). Fujisaki et al. beobachteten 1995 die endothelininduzierte Steigerung der Fibroblastenproduktion in Kardiozytenzellkulturen neonataler Ratten; Chen et al. 2003 die endothelinabhängige Modulation der Fibronectinexpression und somit der Synthese der Extrazellulärmatrix.

Das Fehlen von ET-1 oder dem ET_A-Rezeptor führt zu Missbildungen in der Entwicklung, insbesondere der kardialen, und der kraniofazialen. Beispielsweise starben bei Clouthier et al. 1998 und Kurihara et al. 1994 ET-1-, oder ET_A-knock-out-Mäuse nach der Geburt an einer Asphyxie aufgrund von Hypopharynx-Malformationen.

1.3.1.4 Regulierung

Die Regulierung von ET-1 erfolgt zum einen auf mRNA Ebene, durch die Kontrolle der promotor-Aktivität und Stabilität der mRNA (Lee et al., 1991, Sessa et al., 1991, Kurihara et al., 1989).

Der Promotor als Transkriptionsstartpunkt liegt unmittelbar 5` des ersten Exons des PPET-1-Genes. Es wurden mehrere Bindungsstellen für regulatorische Elemente in dieser 5`-Region im Promotorbereich des Präproendothelin-1 (PPET-1) gefunden. Sie weist typische GAAT- und TATA-Sequenzen auf, welche durch Transkriptionsfaktoren stimuliert werden. Ein GATA-Motiv wurde 1991 in bovinen arteriellen Endothelzellen (BAEC) entdeckt. Der Zinkfinger-Transkriptionsfaktor GATA-2 bindet dort. Für die volle Aktivität und die basale ET-1 Regulation scheint diese GATA Sequenz an Position 135-132 essentiell zu sein (Wilson et al., 1990 und 1992).

Die nachgewiesenen AP1-Konsensussequenzen (Activator protein 1) werden durch einen heterodimeren Proteinkomplex aus c-FOS und c-Jun (Protoonkogene) aktiviert. Sie sind Bestandteile des Transkriptionsfaktors AP1 und werden selbst wiederum durch MAP-Kinasen aktiviert.

Des Weiteren wurden mehrere Bindungsstellen für NFkB identifiziert, eine für IRF-1 (Interferon regulierender Faktor-1) und eine für STAT-1 (Manea et al., 2010). Eine weitere konnte für c-myc in der Regulation von ET-1 in Fibroblasten von Shichiri et al. 1997 nachgewiesen werden. Hexanukleotid-Sequenzen für Elemente der Akut-Phase-Regulierung beschrieben Inoue et al. bereits 1989.

Die Bindungssequenz für NF-1(nuclear factor) wurde 1990 von Wilson und Dorfman beschrieben.

Als weitere Regulierungsebene wird ET-1 in der Lunge durch die Neutrale Endopeptidase (NEP) (de Nucci et al., 1988; Abassi et al., 1992) und durch die Internalisierung nach Bindung an den ETb-Rezeptor aus der Zirkulation genommen (Fukuroda et al., 1994, Brunner 1996).

Ein Teil der Elimination erfolgt renal (Fukuroda et al., 1994). Dies hat zur Folge, dass chronische Nierenschäden einen Anstieg des ET-1 Spiegels bedingen, ohne dass dabei die Vorläufermoleküle mit erhöht sind.

Die Plasmakonzentration von ET-1 ist normalerweise gering mit einer zirkulierenden Blutkonzentration von 0,3-3 pg/ml (Battistini et al., 1993) variierend zwischen Mensch und Tier. Es wird kontinuierlich in sekretorischen Vesikeln transportiert (Haynes & Webb, 1994), in den Weibel-Palade-Körperchen der Endothelzellen gespeichert und nach Stimulation an der Zelloberfläche freigesetzt (Russell et. al., 1998).

Dabei wirken Zytokine, Chemokine, Norephedrine, Angiotensin II, Thrombin und Wachstumsfaktoren, kurzfristige Hypoxie sowie Scherstress und erhöhte Nachlast auf die ET-1 Produktion anregend, während beispielsweise Stickstoffmonoxid (NO), Prostacyclin und antinukleärer Faktor (ANF) diese vermindern (de Nucci et al., 1988, Fujisaki et al., 1995, Yushizumi et al., 1989, Kurihara et al., 1989).

Durch die feste Bindung am Rezeptor hat es eine lange Halbwertszeit.

1.3.2 Endothelin (ET)-Rezeptoren

1.3.2.1 Struktur

Endothelin entfaltet seine Wirkung über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, von denen bislang drei isoliert und charakterisiert sind: ET_a (Hosoda et al., 1992), ET_b (Arai et al., 1993) und ET_c (Karne et al., 1993). Sie bestehen aus sieben transmembranären Helices, mit drei extrazellulären und drei cytoplasmatischen Schleifen, einem intrazellulär gelegenen COOH-Ende und einem relativ langen NH₂-Ende im Extrazellulärraum (Arai et al., 1990).

Aus den differierenden NH₂-Enden der Endotheline und ihren demgegenüber sehr ähnlichen COOH-Enden lässt sich die Affinität der Rezeptoren zu den Peptiden erklären. Der ET_a-Rezeptor erkennt die NH₂-Endung und bindet ET-1>ET-2>ET-3 (Sakurai et al., 1992). ET_b hingegen erkennt das COOH-Ende und bindet alle drei Isoformen gleichwertig (Rubany & Polokoff, 1994). Der bislang wenig untersuchte ET_c bindet überwiegend ET-3 (Karne et al., 1993).

ET_a und ET_b werden in diversen Geweben exprimiert, insbesondere auf glatten Gefäßmuskelzellen als auch in den Bronchien, Hepatozyten und Neuronen (Kedzierski et al., 2001). Fareh wies 1996 auf Kardiomyozyten von Ratten eine Rezeptorverteilung von ET_a zu ET_b von 9:1 nach. Ähnliche Resultate waren innerhalb des humanen atrioventrikulären Leitungssystems und Myokards nachweisbar (Molenaar et al., 1993).

1.3.2.2 Funktion

Der ET_A-Rezeptor bewirkt auf glatten Gefäßmuskelzellen eine Vasokonstriktion über spannungsabhängige Calciumkanäle. Die resultierende Gq-Proteinstimulation führt zur Phospholipase C Aktivierung, welche durch Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) Inositol-1,4,5-triphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) generiert. IP₃ induziert die Freisetzung von intrazellulärem Kalzium²⁺ aus dem endoplasmatischen Retikulum. Zusätzlich strömt von extrazellulär, durch spannungsabhängige, dihydropyridinsensitive Kalziumkanäle vom L-Typ und andere Kationenkanäle, Kalzium ein. Durch diesen erhöhten Kalziumeinstrom kommt es zur Depolarisation der Zelle und somit zur Kontraktion (Simonson & Dunn, 1990). Die langanhaltende Wirkung dieses Effektes ist auf die langsame Dissoziation vom Rezeptor zurückzuführen.

Zusätzlich kann durch ET_A und die Proteinkinase C über Tyrosinphosphorylierung zellulärer Proteine eine mitogene Signalkaskade aktiviert werden (Simonson & Herman, 1993).

Ähnliche intrazelluläre Effekte erfolgen ET_B vermittelt. In bovinen Endothelzellen konnte gezeigt werden, dass über ET_B auch ein hemmendes G-Protein stimuliert wird, das die Kalzium/ Calmodulin-abhängige Synthese von Stickstoff (NO) angeregt (Hirata et al., 1993, Aramori & Nakanishi, 1992). Dies bedingt eine transiente Vasodilatation (Haynes & Webb, 1994). Daher kommt es nach der Gabe von ET-1 zunächst zu einer kurzen hypotensiven mit anschließender prolongierter hypertensiver Phase (de Nucci et al., 1988).

1.3.3 Endothelin-konvertierendes Enzym (ECE)

1.3.3.1 ET-1-Synthese

Durch die Spaltung von bigET zum biologisch aktiven ET stellt ECE das Schlüsselenzym in der Synthese von Endothelin dar. Bisher bekannt sind drei Endopeptidasen: ECE-1 (Xu et al., 1994; Schmidt et al., 1994, Turner & Murphy, 1996), ECE-2 (Emoto & Yanagisawa, 1995) und ECE-3 (Hasegawa et al., 1998). Alle drei Isoformen sind in der Lage ET-1 zu synthetisieren, wobei ECE-1 und -2 bevorzugt bigET-1 spalten. ECE-3 ist spezifisch für bigET-3 (Emoto & Yanagisawa, 1995, Hasegawa et al., 1998)

Sie gehören zur Neprilysin-Familie der membrangebundenen Zink-Metallopeptidasen der Typ-II-Membranproteine und sind durch Phosphoramidon hemmbar (Turner et al., 1997 und 2001).

Es ist ein glykosyliertes Peptid (Emoto & Yanagisawa, 1995), was bedeutend für die Enzymaktivität ist (Nelboeck et al., 1998). ECE bilden über eine extrazellulär gelegene Disulfidbrücke ein Dimer, welches u.a. die Lokalisation des ECE-1 Proteins beeinflusst (Shimada et al., 1996, Muller et al., 2003).

Das Gen für ECE-1 liegt im menschlichen Genom auf dem kurzen Arm des Chromosoms 1 (Valdenaire et al., 1995) und besteht aus 19 Exonen (Schweizer et al., 1997). Bei der Maus liegt es auf Chromosom 4.

Lindenau et al. beschrieben 2006 die grundlegend identische Exon-Intron-Struktur von Ece-1 der Maus mit der des Menschen.

ECE-2 liegt im humanen Genom auf Chromosom 3, im murinen auf Chromosom 16.

1.3.3.2 Gewebeexpression und Wirkung

ECE-1 mRNA und Protein sind entsprechend der o.g. Expression von Endothelin insbesondere im kardiovaskulären, im intestinalen und im endokrinen System nachweisbar (Korth et al., 1999). ECE-1 hydrolysiert neben Endothelin auch Neurotensin, Bradykinin, Substanz P und β -Amyloid (Hoang & Turner, 1997).

ECE-2 findet sich besonders in Endothelzellen, in nervalen Geweben und im reproduktiven System (Emoto & Yanagisawa, 1995, Ikeda et al., 2002)

Die einzelnen Enzyme arbeiten bei unterschiedlichen pH Bedingungen. Daraus lässt sich ein eher extra- oder intrazellulär gelegener Wirkungsort ableiten. So benötigt ECE-1 einen pH von 7,0 (Xu et al., 1994, Yanagisawa et al., 1988), während das pH-Optimum für ECE-2 bei 5,5 liegt (Emoto et al., 1995). ECE-3 arbeitet am effizientesten bei einem pH von 6,6.

ECE-1 spielt wie ET eine entscheidende Rolle in der Gewebedifferenzierung in der Ontogenese (Yanagisawa et al., 1998). Knockout Mäuse verstarben aufgrund ausgeprägter Missbildungen im Bereich der Neuralrohrderivate, der großen Gefäße sowie kardialen und kraniofazialen Strukturen entweder schon intrauterin oder unmittelbar postpartal. Zudem fehlten auch bei Ece-1 deficienten Mäusen epidermale

Melanozyten sowie Neurone des enterischen Nervensystems entsprechend dem M. Hirschsprung (Hofstra et al., 1999).

Mäuse, denen Ece-2 fehlte, zeigten keinerlei Defizite. Fehlten Ece-1 und Ece-2, kam es zu einem Anstieg kardialer Fehlbildungen (Yanagisawa et al., 2000).

1.3.3.3 ECE-1-Isoformen

Bislang bekannt sind vier Isoformen (ECE-1a-d) (Valdenaire et al., 1995, Meidan et al., 2005). ECE-1b wurde 1994 von Schmidt et al. entdeckt, gefolgt von ECE-1a, 1995 nachgewiesen von Shimada et al.. ECE-1c wurde erstmals 1997 durch Schweizer et al. beschrieben und ECE-1d 1999 durch Valdenaire et al..

Die kurzen, intrazellulär gelegenen Aminoenden der Isoformen differieren. Sie scheinen für die unterschiedlichen subzellulären Lokalisationen der Isoformen ausschlaggebend zu sein. Das extrazelluläre, große, enzymatisch aktive COOH-Ende ist bei allen identisch (Valdenaire et al., 1999, Muller et al., 2003).

Die Expression der Isoformen wird durch unterschiedliche Promotoren reguliert (Orzechowski et al., 1997; Schweizer et al., 1997, Valdenaire et al. 1999, Funke-Kaiser et al., 2000). In den ECE-1 Promotoren liegen keine typischen Startsequenzen wie TATA-Box oder INRs (Initiatorelemente) jedoch das Konsensuselement E2F, welches ein Initiator und wichtig für die basale ECE-1 Promotoraktivität zu sein scheint (Funke-Kaiser et al., 1999).

Die Sequenzanalyse weist Unterschiede in der Zusammensetzung der Konsensussequenz für die Transkriptionsfaktorbindung auf (Orzechowski et al., 1997). Transkriptionsfaktoren der GATA-Familie sowie u.a. NFkB können dort binden und die Expression der einzelnen Isoformen regulieren (Orzechowski et al., 1997, Zhang et al., 1995). Diese sind zell- und zeitspezifisch. ETs-Transkriptionsfaktoren scheinen spezifisch für den ECE-1a-Promotor zu sein (Orzechowski et al., 2001). Sie sind in die Angiogenese und Wundheilung involviert (Ito et al., 1998).

In den Promotoren für ECE-1b und d finden sich mehrere mögliche Bindungsstellen für Sp1 (Orzechowski et al., 1997, Funke-Kaiser et al., 2000). SP1 sind Zinkfingertranskriptionsfaktoren, die in der Zellentwicklung, -differenzierung und Apoptose als auch im Rahmen von Immunantworten eine wichtige Rolle spielen.

In dem für ECE-1c fanden sich strukturelle Hinweise entsprechend einem housekeeping-Promotor (Funke-Kaiser et al., 2000).

Für ECE-1c wurde durch Lindenau et al. 2006 ein zweites, isoformspezifisches Exon, welches im murinen, nicht aber im menschlichen Genom nachweisbar ist, entschlüsselt. Aus einem 473bp großen Fragment (genannt ECE-1c2) wird ein 389bp umfassendes ECE-1c1 durch Spleißen von ECE-1c2 generiert.

Abbildung 2 zeigt die Isoformenstruktur mit den differierenden 5`-Enden und dem identischen 3`-Ende. Die isoformspezifischen Promotoren lenken die primäre Transkription. Der Bereich von Exon 3 bis 19 ist bei allen Isoformen identisch, das Exon 3a, welches Isoform a enthält, wird bei den anderen herausgespleißt. (Orzechowski et al., 1997, Funke-Kaiser et al., 2000, Valdenaire et al., 1995 und 1999, Lindenau et al., 2006).

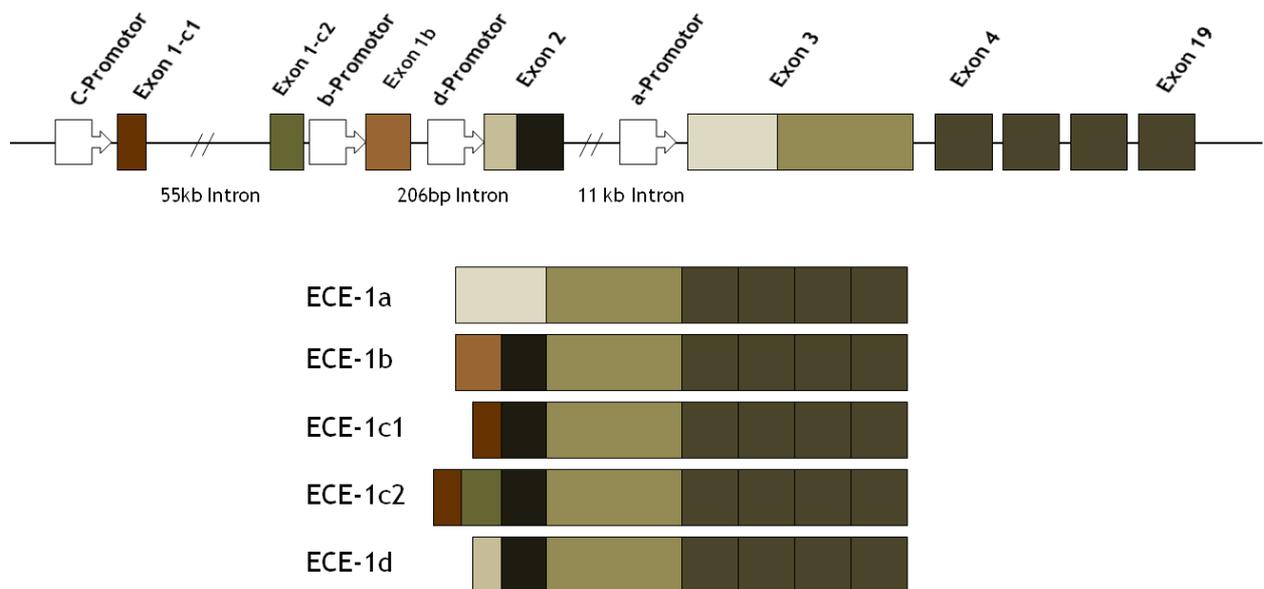


Abbildung 2: Genebene ECE-1 murin

Oben: Exon-Intronstruktur und Promotorlokalisationen des murinen ECE-1 auf Chromosom 4; unten: ECE-1 Isoformen mRNA-Ebene

2005 wiesen Meidan et al. in bovinen aortalen Endothelzellen, Ovarzellen des Hamsters und menschlichen embryonalen Nierenzellkulturen Splicevarianten von ECE-1b-d nach. Diese sind ebenfalls in der Lage ET-1 zu spalten.

Von ECE-2 sind seit 2002 vier Isoformen bekannt (Ikeda. et al., 2002, Emoto & Yanagisawa, 1995).

1.3.3.4 Gewebeexpression

Im menschlichen Organismus ist ECE-1a hauptsächlich in der Plasmamembran lokalisiert (Muller et al., 2003), während es beispielsweise im Rind lysosomenassoziiert und damit intrazellulär liegt (Ohnaka et al., 1990). In HUVEC Zellen fanden Hunter und Turner ECE-1a auch zellkernassoziiert. Im Herzen der Maus ist ECE-1a die am stärksten exprimierte Isoform (Lindenau et al., 2006).

Das murine ECE-1b ist dem des Menschen und der Ratte sehr ähnlich, wobei im menschlichen Genom innerhalb dieses Gens eine di-Leucin-Sequenz (Leu12-Leu13) existiert, die weder bei Maus noch Ratte nachweisbar ist (Lindenau et al., 2006). Es variiert lediglich in den Positionen 3, 6, 8 und 20 zur Ratte und im Vergleich zum ECE-1b des Menschen in acht Positionen (3, 6, 8, 9, 10, 13, 14 und 40) (Lindenau et al. 2006). Es findet sich intrazellulär und Golgi-Apparat assoziiert (Muller et al., 2003, Hunter & Turner, 2006).

Die relative Expression von ECE-1b war im murinen Ovar und Herzen von Balb/c-Mäusen bei Lindenau et al. am höchsten.

Nach Lindenau et al. (2006) ist ECE-1c im murinen Modell die in allen Geweben am häufigsten vertretene Isoform. Hierzu passen die im ECE-1c Promotor gesehenen Hinweise auf eine housekeeping Funktion und legen die Vermutung einer konstitutiven Expression nahe. Die höchsten Konzentrationen waren im Herzen und der Aorta nachweisbar. Ausgenommen der 1c-2 Region ist es auf genetischer Ebene identisch mit Mensch und Ratte. Es ist auf der Zelloberfläche lokalisiert worden aber auch intrazellulär (Hunter & Turner, 2006).

ECE-1d der Maus ist dem des Menschen ebenfalls sehr ähnlich, nur in Position drei der Proteinsequenz unterscheiden sie sich (Lindenau et al., 2006). ECE-1d wurde bei Lindenau et al. in allen untersuchten Mausgeweben prozentual am wenigsten gefunden. Es ist wie Isoform c auf der Zelloberfläche lokalisiert, in neuroendokrinen Zellen jedoch auch intrazellulär zu finden (Muller et al., 2003).

Die 2005 von Meidan detektierten Splicevarianten des ECE-1 liegen im Zytosol, da ihnen das Exon 3' fehlt, welches für die transmembranäre Domäne codiert.

1.4 Endothelin und Myokardschädigung

Neben seinen regulierenden, protektiven Aufgaben (Zhao et al., 2006) ist Endothelin-1 bei anhaltend erhöhten Spiegel an diversen pathophysiologischen kardialen Vorgängen beteiligt. Aufgrund der inotropie- und outputsteigernden Effekte, wie 1988 durch Ishikawa et al. an Herzen von Meerschweinen nachgewiesen, führt eine Langzeitstimulierung dieser zu einem erhöhten Energieverbrauch, welcher in einen Leistungsabfall mündet. Folglich verschlechtert sich die Auswurfleistung des Herzens und damit die gesamte Organperfusion des Körpers.

Nach Ito et al. (1991) induziert ET-1 eine Hypertrophie des Herzens in Kardiozytenzellkulturen neonataler Ratten, was durch die 1995 durch Fujisaki et al. beobachtete endothelininduzierte Steigerung der Fibroblastenproduktion in vergleichbaren Zellkulturen und die endothelinabhängige Modulation der Fibronectinexpression, 2003 durch Chen et al. beschrieben, bestätigt wird.

Es steht im Zusammenhang mit den viralen und parasitären Myokarditiden (Ono et al., 1999; Petkova et al., 2000) und der daraus möglichen resultierenden, dilatativen Kardiomyopathie (Pieske et al., 1999; Sernerl et al., 2000, Stewart et al., 1992). Ono et al. (1999) fanden dabei eine Hochregulierung von ECE-1 mRNA bei DBA/2 Mäusen, welche nach Infektion mit einem Encephalomyokarditisvirus eine dilatative Kardiomyopathie entwickelten. In Myozyten des linken Ventrikels wurde durch Ergul et al. 2000 bei der humanen ischämischen Kardiomyopathie ebenfalls eine vermehrte Expression von ECE-1 mRNA beschrieben.

Stewart et al. fanden 1991 erhöhte Titer bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt. Durch die Infusion eines ET-1 Antikörpers konnte nach Watanabe 1991 das nekrotische Areal bei Myokardinfarkten am Rattenherz verkleinert werden. Omland et al. zeigten 1994 die Korrelation der Langzeitüberlebensrate von Patienten mit akutem Myokardinfarkt in Relation zum Plasmalevel für Endothelin-1 auf.

1.5 Ziele der Arbeit

Die Myokarditis ist eine zumeist virusinduzierte Erkrankung des Herzens, welche mit ausheilendem aber auch chronifizierendem Verlauf bekannt ist.

Es existieren Hinweise darauf, dass das Endothelinsystem in Vertebraten bei inflammatorischen Mechanismen eine Rolle spielen könnte. Eine kardiale Überexpression von ET-1 kann durch Aktivierung von inflammatorischen Zytokinen eine progrediente entzündliche murine Kardiomyopathie auslösen (Yang et al., 2004, Kawai 1999). Ono et al. wiesen in einem virusinduzierten murinen Myokarditismodell steigende Titer für ECE-1, präproET-1 und ET-1 p.i. nach.

Bislang nicht untersucht wurde hierbei die Expression der Isoformen von ECE-1, die durch alternative Promotoren gesteuert wird. Orzechowski et al., konnten 1997 durch deren Sequenzanalyse mögliche Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren lokalisieren, die im Rahmen der Inflammationskaskade und –antwort relevant sein könnten.

Um den Verlauf und mögliche Therapieoptionen von Myokarditis besser verstehen zu können, sollen in der vorliegenden Arbeit die Expression der ECE-1-Isoformen eines akuten ausheilenden mit einem chronischen Mausmodell verglichen werden. Es soll erstens festgestellt werden, ob Unterschiede in der Expression der ECE-1-Isoformen während des Krankheitsverlaufs existieren. Desweiteren soll festgestellt werden, ob es Unterschiede in der relativen Expression zwischen beiden Krankheitsmodellen gibt.

Die Antworten auf diese Fragen könnten helfen, mögliche Ursachen für die Entstehung chronifizierender Verläufe besser zu verstehen und denkbare pharmakologische Therapieansätze wie die Entwicklung von ECE-1-Inhibitoren und den bestmöglichen Zeitpunkt der Behandlung abzuleiten.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Kits

Rneasy Mini Kit 250 74106	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNase free Dnase Set (50)	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNase free Dnase Set 79254	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNA 6000 Nano Assay	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
MiniPrep Kit 250 27106	Qiagen, Hilden, Deutschland
Random Hexamer Primer RT Kit Cat.no.18064-014	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Maxi Plasmid Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
pGEM-T easy vector system I	Promega, Madison, USA
Hot Star Taq DNA Polymerase Kit -1000 Units aus <i>Thermus aquaticus</i> strain YT1 Cat.no. 203205	Qiagen, Hilden, Deutschland
Quantitect SybrGreen PCR Kit SII RNase H-RT (200U/μl) Cat.no. 18064-014	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Big Dye R: BigDyeR-terminator v.1.1 cycle sequencing kit	Applied Biosystems, Foster City, USA

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Aerosol Resistant Tips	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Transferpipetten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Petrischalen	Greiner, Nürtingen, Deutschland
Spitzen Biozym 692150	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf, Deutschland
MbP	Molecular Bio Products, San Diego, California, USA
Falcon Pipetten	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA
50ml Röhrchen 62.547.254	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
15ml Röhrchen 366079	Nunc TM, Rochester, NY USA
Micro Amp Optical 96 well reaction plate with barcode	Applied Biosystems, Singapore, Singapore
Qiagen tip 500 (25) 10063	Qiagen, Hilden, Deutschland
Säulen	Qiagen, Hilden, Deutschland

2.1.3 Chemikalien

RNA 6000 Markerr (20µl (150ng/µl))	Ambion, Austin Texas, USA
dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (10mM)	Rapidozym, Berlin, Deutschland
Rnase Zap 9780	Ambion, Austin Texas, USA
Rnasin R Ribonuklease Inhibitor	Promega, Madison, USA
TSR/ Formamid Template Suppression Reagent	Applied Biosystems, Foster City, USA
Trizol 15596-026 (monophasisches Gemisch aus Phenol und Guanidine isothiocyanate)	Gibco/ Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe Deutschland
Chloroform	Merck, Darmstadt, Deutschland
Isopropylalkohol (2-Propanol Rotipuran 99,7) p.a. ACS ISO	Carl Roth & Co KG Karlsruhe, Deutschland
75% Ethanol aus 99, 8% p.a.	Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe; Deutschland
99, 6% Ethanol p.a.	Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe; Deutschland
70% Ethanol p.a.	Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe; Deutschland
Na Acetat pH 4,8 3M	
Ethidiumbromid 1%	Carl Roth GmbH & Co. Karlsruhe, Deutschland
Agarose: SeaKem LE Agarose	Cambrex Bio Science Rockland Inc; Rockland, ME, USA
random hexamer primer	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
Random Hexamer nukleotide	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
DL-Dithiotreitol (DTT)	Sigma, Steinheim, Deutschland
x-Gal (40mg/ml)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe; Deutschland
LB Agar (4g/100ml aqua dest)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
LB Medium (12,5g/500ml aqua dest)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ampicillin (50µg/µl)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
100bp und 1 kbDNA Marker	Gibco /Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
DTT	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Rnase free water 20ml	Qiagen, Hilden, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma, Steinheim, Deutschland
Bacto-Trypton Becton	Becton Dickinson, Sparks, MD USA
Bacto Yeast Extract	Becton Dickinson, Sparks, MD, USA
NaCl	Roth; Karlsruhe, Deutschland
Bacto Agar	Becton Dickinson, Sparks, MD, USA
Eco R1	Eurogentec, Köln, Deutschland
10xH-Puffer	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
Formamid	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
TBE-10x-Puffer	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
1.0 M tris; 0.9 Boric acid; 0.01 M EDTA 15581-028	

Ficoll Puffer: Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden
 15% Ficoll (Typ 400)
 15g in 100ml 1* TBE Puffer
 +1ml gesättigte Bromphenolblau-Lsg.
 MOPS VWR Dresden, Deutschland
 (3-(N-morpholino)-propansulfonsäure, pKa 7,2)

2.1.4 Primer

T7 pGEM-T 5'-ata cga ctc act ata ggg cg - 3`
 SP 6 pGEM-T 5'-att tag gtg aca cta tag aat- 3`

forward primer:

ECE-1a 5'-ccc tgg tct cat ggt ctc gct- 3`
 ECE-1b 5'-ggg gca gca tgc gga ccg tgt- 3`
 ECE-1c 5'-gag cct tag cgg gag gtg cat- 3`
 ECE-1d 5'-gca atg gag acg ctg agg gag t- 3`

(Primer entsprechend der Publikation von Lindenau et al. 2006)

präproET-1 5'-gca ttg agt tcc att tgc aac cga- 3`

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

backward primer:

ECE-1 5'-cgt agc tga aga agt cct ggc a- 3`

präproET-1 5'-caa gga aga aca gga aca gcg ct-3`

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

Die Primer wurden nach folgenden Regeln konzipiert: etwa gleichviel GC (Guanin, Cytosin) bzw. AT (Adenin, Thymin) im Verhältnis 1:2. Die Berechnung der Schmelztemperatur erfolgte mittels der Wallace-Regel $T_m = 2x(A+T) + 4x(G+C)$. Eine optimale Annealingtemperatur liegt zwischen 65 und 70°C.

Die optimale Länge der Primer beträgt etwa 20bp (Basenpaare). Als letzte Base eines Primers sollte ein G oder C stehen. Zueinander komplementäre Enden am 3`-Ende sind zu vermeiden.

Passende Sequenzen wurden mithilfe der Gendatenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>) und mit dem Suchalgorithmus BLAST

(<http://www.ncbi.nih.gov/BLAST>) geprüft. Alle Primer wurden von TIB MOLBIOL, Berlin, Deutschland synthetisiert.

2.1.5 Bakterien

Subcloning Efficiency
DH5 alpha, chemically competent
Kat.nr: 18265-017
E. coli Kit
Invitrogen, Berlin, Deutschland

2.1.6 Versuchstiere

Wir verwendeten Mäuse des A.BY/SnJ und des C57/Bl6 Stammes.

Das CVB3-Virus (Nancy strain) wurde verwendet, da es im murinen Myokarditismodell das am besten erforschteste darstellt. Es wurde in Verozellen generiert (Kandolf und Hofschneider 1985).

2.1.7 Histologische Charakterisierung

Die nachfolgende Graphik veranschaulicht die uns zur Verfügung gestellten, in Tübingen erhobenen, Daten der Inflammationsgrade am entsprechenden Tag nach Infektion mit dem CVB3-Virus. Dazu wurde aus jedem Mauserz ein Schnitt im Rahmen einer Kooperation der Teilprojekte A4 und B5 des SFB Transregio „Inflammatorische Kardiomyopathie“ (Förderperiode 2004 bis 2008) im Labor von Frau Prof. Klingel (Institut für Molekulare Pathologie des Universitätsklinikums Tübingen) hergestellt und hinsichtlich der kardialen Schädigung ausgewertet (siehe auch Weinzierl et al. 2008). Die Einteilung der jeweiligen Inflammationsgrade erfolgte individuell durch das dortige Labor.

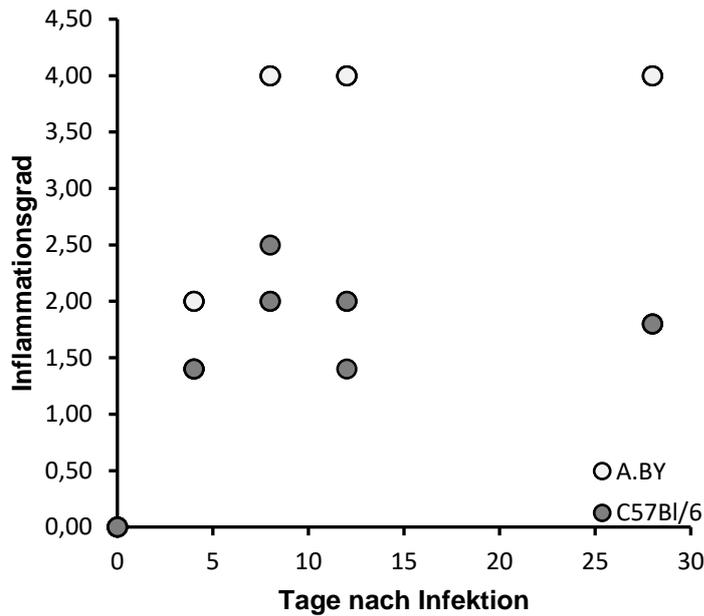


Abbildung 3: Myokardschädigung im Krankheitsverlauf in A.BY und C57BL/6

y-Achse: Myokardschädigung in Grad 0-4, x-Achse: Myokarditisverlauf (Tag 0= Kontrolle bis Tag 28= vier Wochen nach Infektion); A.BY (weiße Kreise), C57BL/6 (graue Kreise)

Einteilung der Myokardschädigung Grad 0-4:

0-keine Myokardschädigung, keine Entzündungszellen; 1a-einzelne Myozytolysen und einzelne mononukleäre Entzündungszellen (hier 1,4 gesetzt); 1b-kleine Herde an Fibrose und eventuell einzelne mononukleäre Entzündungszellen (hier 1,8 gesetzt); 2-kleine Herde an Myozytolysen und einige wenige kleine Herde an Entzündungszellen; 3-viele diffuse Myozytolysen und große Herde an Entzündungszellen; 4-großflächige Nekrosen und ausgeprägte Entzündungszellinfiltration über beide Ventrikel

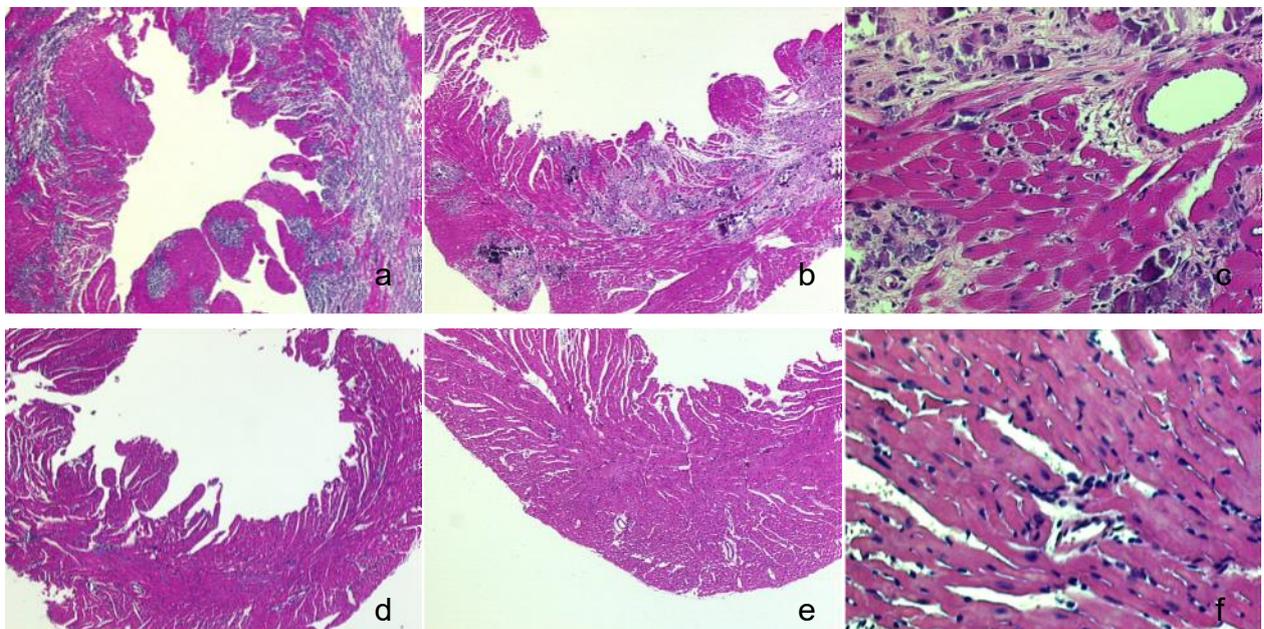


Abbildung 4: Ausprägung der Inflammation in A.BY (a-c) und C57BL/6 (d-f)

a und d: Tag 8 post infectionem (p.i.), b und c sowie e und f: Tag 28 p.i. (HE-Schnitte der Mausherzen, angefertigt in der AG Prof. K. Klingel im Institut für molekulare Pathologie der Universitätsklinik in Tübingen, im Rahmen der Kooperation des SFB-TR A4 und B5 (2004-2008)); (siehe auch Weinzierl et al. 2008)

Alle infizierten Mäuse entwickelten eine Myokarditis. In beiden Modellen zeigte sich eine Zunahme des Entzündungszellinfiltrates im Krankheitsverlauf. Im chronischen Modell war eine kontinuierliche Infiltratzunahme bis zum Tag 28 p. i. sichtbar, im Sinne einer nicht sinkenden massiven Entzündungsreaktion im Myokard mit ausgedehnten Nekrosezonen. Das akute Modell C57BL/6 wies, verglichen mit A.BY, insgesamt geringere Entzündungszellinfiltrate und nur kleinflächige Myozytolysen auf. Bis zum Tag 28 ist dort eine rückläufige Tendenz ohne vollständige Regeneration erkennbar (Weinzierl et al., 2008).

2.1.8 Geräte

- UV–Vis–Spectrophotometer UV–1202 Shimadzu WE 144616 Europa GmbH, Duisburg, Deutschland
- Potter, B. Braun, Biotech International, Göttingen, Deutschland
- Power supply Gelkammer, Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
- Varioklav Dampfsterilisator WE 14 4258, H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim, Deutschland
- Vortex Mixer neo Lab 7-2020, Seriennr. 409235, Heidelberg, Deutschland
- Spectrafuge Mini Labnet Internat. Inc. Woodbridge NJ, USA
- Beckman Zentrifuge, Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
- PTC-100 Peltier Thermal Cycler INV No 340493 MJ, Research Biozym Diagnostik GmbH, Oldendorf, Deutschland
- PTC-100 Programmable Thermal Controller MJ, Research Inc. WE 144217, WE144219, Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
- PTC-100, MJ Research, inc, Watertown MA, USA
- Eppendorf Zentrifuge 5402 WE 144122, 5417 WE 325813, 5417R 340660, Hamburg, Deutschland
- Waage E1500D WE 144153, OHAUS Europa GmbH, Nänikon, Schweiz
- Bioanalyser D 2100 G 2938 Ser.nr. DE34903070, Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
- Vortexer, IKA Werke GmbH&Co.KG, Staufen, Deutschland
- vortex genie G560 E, Scientific Industries, Inc., Bohemia, New York, USA
- Function Line Labofuge 400 Heraeus, DJB Labcare Ltd, Newport Pagnell Buckinghamshire, England
- Gelaire Flow Laboratories Italy 8 Clean Bench HT; Infors AG, Bottmingen, Schweiz
- AB Applied Biosystems ABI Prism 7000 Sequenz Detection System, Darmstadt, Deutschland
- Heizblock, Liebisch GmbH & Co. KG, Bielefeld, Deutschland
- ABI Prism 3100 Avant Genetic Analyzer Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland

Software

- 7000 System SDS Software Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
- 2100 Expert Agilent Nano Assay, Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
- SPSS 12.0, 12.5, IBM Deutschland GmbH, Ehningen, Deutschland,
- ABI Prism Sequence Analysis v5.1.1 , Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
- MS Exel und Adobe Illustrator CS2
- G* Power

2.2 Methoden

2.2.1 Infektion der Mäuse und Gewebeentnahme

Nach Genehmigung durch die zuständige Tierschutzbehörde (Tierversuchsgenehmigungsnummer PA 1/04, Regierungspräsidium Tübingen) wurden die Mäuse beider Stämme im Rahmen des Transregioprojektes 19 von Kooperationspartnern im Institut für molekulare Pathologie der Universität Tübingen gehalten und im Alter von vier Wochen intraperitoneal (i.p.) mit dem Nancy Stamm des CVB3- in PBS verdünnten Virus in einer Konzentration von 5×10^4 pfu infiziert. Sie lebten in einem zwölf Stunden Tag/ Nacht-Rhythmus und erhielten standardisiertes Futter. Nach 4, 8, 12 bzw. 28 Tagen post infectionem (p. i.) wurden sie durch einen Genickbruch nach Isofluran/ Enflurannarkose getötet und ihre Organe entnommen. Aus jedem Herz wurde ein Gewebequerschnitt entnommen und in Paraffin zur histologischen Begutachtung gebettet. Die Organe wurden anschließend in flüssigem Stickstoff bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung schockgefroren. Die nicht infizierte Maus am Tag 0 diente als Kontrolle.

2.2.2 Herstellung muriner cDNA

2.2.2.1 RNA-Isolierung aus murinen Herzen

Zu 100mg Mauserz wurden 1000 μl Trizol gegeben und im Eiswasserbad mit dem Potter homogenisiert. Trizol zerstört die Zellen und löst ihre Bestandteile, ohne dabei die RNA mit zu zerstören.

Daran schloß sich eine Inkubationsphase von 5min bei Raumtemperatur (RT) an. In dieser Zeit erfolgt eine komplette Dissoziation von Nukleoproteinkomplexen. Anschließend wurden pro Milliliter Trizol 200 μl Chloroform hinzugefügt. Diese Lösung wurde etwa 15 s gemischt und weitere 2-3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann folgten 15min in einer Tischzentrifuge bei 12.000g, die zuvor auf 4°C gekühlt wurde. In diesem Schritt entstehen eine untere, rote, organische Phenol–Chloroform–Phase, die DNA und Proteine enthält, sowie eine obere, farblose, wässrige Phase, in der sich die gelöste RNA befindet. Letztere wurde, nach Überführung in ein neues Röhrchen, mit 500 μl Isopropylalkohol vermischt und erneut für 10min bei Raumtemperatur inkubiert. Hierbei präzipitiert die RNA. Anschließend wurde durch 10min Zentrifugation bei 4°C und

12.000g die RNA als gelähnliches Pellet am Gefäßboden sichtbar. Der Überstand wurde verworfen und 1500µl 75% Ethanol zum Waschen der RNA hinzugegeben. Nach Mischen schloß sich ein weiterer fünfminütiger Zentrifugationsschritt bei 7.500g und 4°C an. Der entstehende Überstand wurde erneut vorsichtig abgegossen und die verbleibende Restflüssigkeit am Rand abgetupft. Folgend wurde das RNA-Pellet für 5–10 min an der Luft getrocknet, jedoch nicht vollständig, um ein Unlöslichwerden der RNA zu verhindern. Anschließend wurde die RNA in 100µl RNase-freiem Wasser gelöst (und bei –80°C gelagert.)

Pro Zeitpunkt verwendeten wir jeweils drei Maus Herzen aus beiden Stämmen.

2.2.2.2 Aufreinigung der RNA

Bei der Aufreinigung handelt es sich um ein spezielles Puffersystem mit hohen Salzkonzentrationen, wodurch die, in RNase freiem Wasser gelöste, RNA von verbleibenden DNA-Resten mittels Rneasy Mini Kit und RNase free Dnase Set gereinigt wird.

Dabei können bis zu 100µg RNA von Längen größer als 200bp an eine Silikagelmembran gebunden und abschließend gespült werden.

350µl RLT-Puffer, der zuvor im Verhältnis von 10µl pro 1ml mit β-Mercaptoethanol versetzt wurde, wurden hinzugegeben. Dieser GITC-(Guanidin- Isothiocyanat) haltige Puffer inaktiviert RNasen und dient zusätzlich der Lyse und Homogenisierung des Materials. Nach Mischen wurden 250µl 100% igen Ethanol zugesetzt. Nach erneuter Durchmischung mit der Pipette wurde das Ganze auf eine Rneasy-Säule auf ein 2ml Röhrchen gegeben und für 15 s bei 10.000rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Ethanol sorgt für eine verbesserte Adsorption an die Säule. Nach Umsetzen dieser auf ein neues Röhrchen wurden 350µl RW1-Puffer hinzugefügt und weitere 15 s bei 10.000rpm und RT zentrifugiert. Anschließend wurden 80µl DNase I-RDD-Puffer-Gemisch, die zuvor im Verhältnis von 10µl Dnase I und 70µl RDD-Puffer hergestellt wurden, auf die Säule gegeben und die Reaktion für 15 Minuten bei RT inkubiert. Daran knüpfte ein weiterer Waschschrift mit 350µl RW1-Puffer an, der erneute 15 s bei 10.000rpm Zentrifugation beinhaltete. Dann folgten zwei identische Schritte hintereinander, ausgenommen die Zentrifugationszeit: der mit Ethanol versetzte RPE-Puffer wurde in einer Menge von 500µl zugesetzt und 15 s bei 10.000rpm zentrifugiert.

Im letzteren umfasste sie 2 min. Dann wurde, durch setzen der Säule auf ein neues Röhrchen und nach Hinzufügen von 30µl RNase freiem Wasser und nochmaliger Zentrifugation für eine Minute bei 10.000rpm, die RNA als Durchfluß eluiert.

2.2.2.3 Quantifizierung der RNA

Nach Aufreinigung der RNA wurde diese auf mögliche Verunreinigungen mit Phenol- und Proteinresten spektralphotometrisch untersucht. Dabei wurde das Verhältnis der Nukleinsäureabsorption von der von Proteinen ermittelt. Das Absorptionsmaximum von Proteinen liegt bei einer Optischen Dichte (OD) von 280nm, das von Nukleinsäuren bei 260nm.

Einer OD bei 260 mit dem Wert 1 entsprechen 40µg/ml RNA bei einem pH von 7,0.

Die Konzentration der RNA wurde in einer Quarzküvette bei einer Wellenlänge von 260nm und einem pH von 7,0 bestimmt. Der Quotient aus OD₂₆₀ zu OD₂₈₀ sollte bei reiner RNA idealerweise 1,8 betragen. Werte darüber deuten auf Verunreinigungen mit DNA, Werte darunter auf jene mit Proteinen hin.

Die RNA wurde im sich anschließenden Schritt erneut auf ihre Reinheit, Integrität und Quantität mit dem Bioanalyser untersucht. Hier erfolgte auf einem entsprechend vorbereiteten Chip im Rahmen einer Gelelektrophorese die Auftrennung der RNA entsprechend ihrer Fragmentgröße. Siehe dazu auch Gelelektrophorese (Methoden). Gemessen wurden hier die ribosomalen 28S RNA und 18S RNA. Deren Verhältnis liefert eine Aussage zum Degradierungsgrad der RNA. Die 28S RNA degradiert zuerst. Beträgt der Wert weniger als 1 ist die RNA zu stark degradiert.

2.2.2.4 Reverse Transkription der RNA in cDNA

10µl zuvor verdünnte RNA (in einer Konzentration von 40ng/µl) wurden mit 1µl dNTPs (10mM) und 1µl random hexamer Primern (100µM) bei 65° C für fünf Minuten im Heizblock hitzedenaturiert. Dabei werden bestehende Sekundärstrukturen der mRNA aufgelöst.

Für das Anlagern der Primer wurde der Ansatz anschließend nach Hinzufügen von 4µl first strand Puffer, 2µl DTT und 1µl RNase-Inhibitoren für zwei Minuten bei 25° C

inkubiert. Die Elongation wurde durch Zugabe von 1µl SuperScript II-reverse Transkriptase erreicht. Identische Ansätze ohne diese dienten dabei als Negativkontrolle sowie ein Ansatz, der Wasser anstelle von RNA enthielt.

Nach vorsichtigem Mischen erfolgte die eigentliche Reaktion des Umschreibens von mRNA in cDNA durch die RNA abhängige reverse Transkriptase in einem Thermocycler PTC 100. Sie beinhaltete einen 50minütigen Inkubationsschritt bei 42° C und eine 10minütige Terminationsphase bei 70° C. Daran schloß sich ein fünf Minuten umfassender Schritt bei 4° C zum Herunterkühlen, bevor die Reaktion bei -20° C bis zur weiteren Verwendung gelagert wurde.

20µl RT-Ansatz:

1µl dNTPs(10mM)

1µl random hexamer-Primer(100µM)

10µl RNA (40ng/µl)

4µl First Strand Buffer (5x)

2µl DTT (0,1M)

1µl RNasin (40units/µl)

1µl SuperScript II-reverse Transkriptase (200U/µl)

DTT-Dithiothreitol

Abfolge:

RNA, dNTPs, Primer 5min bei 65°C inkubieren

First strand buffer, DTT, Rnasin hinzufügen und 2min bei 25°C inkubieren

SS II- reverse Transkriptase zufügen und

50 min bei 42°C

10min bei 70°C

5 min 4°C

2.2.3 Amplifizierung der cDNA mittels PCR

Die Polymerasekettenreaktion (Polymerase chain reaction, PCR) ist die exponentielle Vervielfachung eines vorhandenen DNA-Fragmentes. Dabei wird mit jeder Amplifikation in jedem Zyklus die vorhandene DNA-Menge verdoppelt. Demnach liegen nach dem ersten Zyklus zwei DNA-Fragmente vor, nach dem zweiten durchlaufenen Zyklus bereits vier. Dies ermöglicht die Herstellung einer Vielzahl an Kopien vom Ausgangsprodukt. Dafür wurden nach sorgfältigem Vortexen und Zentrifugieren (mit Ausnahme der Polymerase) im Vorfeld 1µl fwd (forward) Primer, 1µl bwd (backward) Primer, 0,5µl

dNTPs (Desoxyribonukleosidtriphosphate), 2,5µl 10x PCR-Puffer, 5µl 5x Q-Solution, 13,75µl H₂O, 0,25µl Hot Star Taq Polymerase sowie 1µl cDNA (aus RT) in ein 0,2ml Eppendorfgefäß pipettiert und erneut gut gemischt und zentrifugiert. Die Q-Solution hat dabei die Aufgabe, den Schmelzpunkt zu erhöhen mit dem Ziel eine spezifischere Anlagerung der Primer zu erreichen.

Die Reaktion gliedert sich in drei Phasen:

Ein einmalig vorausgehender Heizschritt bei 95°C für 15 Minuten diente der Aktivierung der Taq-Polymerase, einem thermostabilen Enzym aus *Thermus aquaticus*, einem hitzestabilen Bakterium aus den heißen Geysiren.

Daran knüpfte der eigentliche erste Schritt der PCR, die initiale Denaturierung. Hierbei wurden durch Hitzeeinwirkung von 94°C für eine Minute zum einen die Tertiärstruktur der DNA aufgelöst und zum anderen ihre Doppel- in Einzelstränge aufgetrennt. Innerhalb der sich anschließenden 68°C für eine Minute erfolgte das Anlagern der Primer. Diese binden jeweils an das komplementäre 5'-Ende des DNA-Fragmentes auf dem Leitstrang. Ihre Anordnung ist dabei so gewählt, dass die folgende Synthese zwischen ihnen verläuft und somit eine effektive Amplifikation ermöglicht. Die Taq-Polymerase verknüpfte, mit einer Rate von 2-4kb/min, im sich anschließenden Schritt von zwei Minuten bei 72°C in 5'-3'-Richtung die dNTPs mit dem jeweiligen freien 3'-OH Ende des Primers unter Zuhilfenahme des anderen Stranges als Matrize. Die entstandenen Stränge hybridisieren nach Abschluss der Elongationsphase, da sie zueinander komplementär sind.

Darauf folgte eine Schleife von Schritt 2 bis Schritt 4, deren Größe je nach zugrundeliegendem Gen und dessen Primern variierte.

Weitere zehn Minuten bei 72°C stellten die abschließende Elongation dar. Anschließend wurde das PCR Produkt für fünf Minuten auf 4°C gekühlt.

25µl PCR-Ansatz:

1µl cDNA
1µl fwd Primer(10µM)
1µl bwd Primer(10µM)
5µl 5 x Q-Solution
2,5µl 10x PCR Buffer
0,5µl dNTPs (10µM)
0,25µl Hot Start-Taq-Polymerase (1,25 Units)

13,75µl H₂O

PCR–Programm:

Schritt 1, 95 °C	15min
Schritt 2, 94 °C	1min
Schritt 3, 68 °C	1min
Schritt 4, 72 °C	2min
Schleife Genabhängig 28 – 38 x Schritt 2 bis 4	
Schritt 6, 72 °C	10min
Schritt 7, 4 °C	5min

forward primer:

ECE-1a	5´-ccc tgg tct cat ggt ctc gct-3´
ECE-1b	5´-ggt gca gca tgc gga ccg tgt-3´
ECE-1c	5´-gag cct tag cgg gag gtg cat-3´
ECE-1d	5´-gca atg gag acg ctg agg gag t-3´

präproET-1 5´-g cat tga gtt cca ttt gca acc ga -3´

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

backward primer:

ECE-1	5´-cgt agc tga aga agt cct ggc a-3´
präproET-1	5´-caa gga aga aca gga aca gcg ct-3´
18S	5´-cac caa cta aga acg gcc atg ca-3´

2.2.4 Gelelektrophorese

Die PCR-Produkte wurden durch Einbringen in ein Agarosegel (1% in TBE) und Anlegen einer elektrischen Spannung von etwa 90 Volt ihrer Größe entsprechend aufgetrennt. Dazu wurde das Gel in eine Elektrophoresekammer gestellt und mit TBE–Puffer bedeckt. 5µl der Proben mit 5µl des Ladepuffers, Ficoll und Bromphenolblau, wurden anschließend in sogenannte Taschen des Gels pipettiert. Die negativ geladenen DNA–Fragmente wandern mit einer Geschwindigkeit umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Größe im entstehenden elektrischen Feld von der Kathode zur Anode. Bromphenol diente der Veranschaulichung der Laufweite der Proben. Da das Gel zuvor mit 6µl Ethidiumbromid, einem in die DNA interkalierenden Farbstoff, der unter UV–Licht sichtbar wird, angereichert wurde, konnten die aufgetrennten Banden anschließend bei entsprechenden Lichtverhältnissen ausgewertet werden. Dazu wurden beidseits der

Proben jeweils 5µl des 100bp Markers, welcher DNA-Fragmente bekannter Größe enthält, die logarithmisch aufgetrennt werden, aufgetragen. Durch den Vergleich lassen sich die Fragmentgrößen bestimmen. Diese Methode bietet sowohl die Möglichkeit der qualitativen als auch einer groben quantitativen Analyse.

1% Agarosegel:

1g	Agarose
100ml	1x TBE Puffer
6µl	Ethidiumbromid

2.2.5 Quantifizierung der cDNA mittels Real-Time PCR

Die relative Quantifizierung umfasst eine real-time PCR, zur Vervielfältigung der DNA, welche die Möglichkeit bietet während der Amplifikation die Quantität des Produktes zu bestimmen. Diese wird mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes Sybr Green I am Ende jedes PCR-Zyklus ermittelt, der in die DNA interkaliert. Das Fluoreszenzsignal nimmt proportional mit der Menge des PCR-Produktes zu.

Jede Probe wurde bei dieser Methode in drei aufeinanderfolgende Vertiefungen einer Platte mit 96 Muldungen pipettiert, und somit dreimal gemessen.

Wie bei der herkömmlichen PCR im Cyclyer wurde als Negativkontrolle eine Wasserkontrolle für jedes Gen mit amplifiziert.

Der Ct-Wert ist der Schwellenwertzyklus, bei der das Fluoreszenzsignal signifikant über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt. Zum Vergleich aller Gene eines Laufes ist dieser jedoch im linear exponentiellen Bereich verschiebbar. Für die relative Quantifizierung wurde zusätzlich, als interne Kontrolle, zu den interessierenden Genen das Haushaltsgen 18S mit analysiert. Es wird konstitutiv exprimiert ohne internen oder externen Einflüssen zu unterliegen. Die ermittelten Ct-Werte der jeweiligen ECE-1 Isoform und von präproET-1 wurden anschließend auf 18S bezogen. Das ermöglicht eine Beurteilung der zeitlichen Änderung eines Genes.

Die Ct-Werte wurden, nachdem sie gegen 18S angeglichen wurden, voneinander abgezogen. Das Ergebnis (ddCt) stellt die n-fache Expression von einem Gen zu einem anderen dar, setzt man es in die Gleichung $2^{-\text{delta-deltaCt}}$ ein.

Beispiel: Der Mittelwert aus den Ct- Werten von ECE-1a des ersten Mauserzens bei A.BY am Tag 0 ergab auf zwei Kommastellen gerundet 23,62. Der Wert für 18S ergab 10,14. dCta für ECE-1a (Cta - 18S) ergab in diesem Fall 13,47.

Für ECE-1a von A.BY am Tag 4 resultiert ein Ct- Wert von 23,11; angeglichen an 18S, hier gemessen mit 10,37, ergab ein dCta von 12,75.

ddCt ist die n-fache Expression von ECE-1a an Tag vier verglichen mit ECE-1a an Tag null und ergab 2^{-0,73}.

Zur Spezifizierung des Amplifikates bietet dieses Verfahren gleichzeitig die Möglichkeit der Erstellung einer Dissoziationskurve im Anschluß. Durch langsames Erhitzen wird die DNA des Amplifikates bei ihrer spezifischen Schmelztemperatur wieder in ihre Einzelstränge aufgetrennt. Dabei kann das in die DNA eingelagerte Sybr Green I entweichen, was sich in einem kontinuierlich abnehmenden Fluoreszenzsignal zeigt, das gemessen wird. Der Schmelzpunkt der DNA eines spezifischen PCR- Produktes liegt höher als der unspezifischer Amplifikate. Somit ist eine Unterscheidung möglich.

Für die Effizienztestung der Ergebnisse wurden quantitative PCRs von Verdünnungsreihen (1:10) jeder ECE-1-Isoform, von 18S (Lindenau et al., 2006) und präproET-1 durchgeführt.

25µl Real-Time-PCR-Ansatz:

1µl	cDNA
12,5µl	2x Mastermix (QuantitecQiagen)
1,25µl	10µM fwd-Primer
1,25µl	10µM bwd-Pimer
9µl	ddH ₂ O (QuantitecQiagen)

forward primer:

ECE-1a	5'-ccc tgg tct cat ggt ctc gct-3'
ECE-1b	5'-ggt gca gca tgc gga ccg tgt-3'
ECE-1c	5'-gag cct tag cgg gag gtg cat-3'
ECE-1d	5'-gca atg gag acg ctg agg gag t-3'

präproET-1	5'-g cat tga gtt cca ttt gca acc ga -3'
18S	5'-cct gcg gct taa ttt gac tca aca-3'

backward primer:

ECE-1	5'-cgt agc tga aga agt cct ggc a-3'
präproET-1	5'- caa gga aga aca gga aca gcg ct - 3'
18S	5'-cac caa cta aga acg gcc atg ca-3'

PCR-Programm:

Schritt 1, 95 °C 1s

Schritt 2, 95 °C 15min

Schritt 3, 94 °C 15s

Schritt 4, 65 °C 30s

Schritt 5, 72 °C 30s

Schleife Schritt 3 bis 5 45 x

Hierzu wurde zunächst ein Mastermix für jede Probe angesetzt und anschließend mit der entsprechenden cDNA Menge versetzt (3µl). Dabei ergab sich für jede Probe ein Submastermix von 75µl pro 0,5ml Röhrchen, von dem dreimal 22µl (Tripletts) auf die Mikrotiterplatte aufgetragen wurden und der nach Versiegelung der Platte und kurzem Herunterzentrifugieren entsprechend o.g. Protokoll in einem ABI Prism 7000 quantifiziert wurde. Die Daten wurden anschließend mit 7000 System SDS Software ausgewertet.

2.2.6 Sequenzierung der Isoformen-cDNA

Für die Kontrolle der Spezifität der, nach den bereits beschriebenen Regeln der Primersynthese mit BLAST zusammengestellten, Primer (siehe 2.1.4 Primer) wurden die amplifizierten cDNA-Fragmente von nicht infizierten Kontrolltieren nach Isolierung aus dem Agarosegel zur Analyse zunächst kloniert, die entstandenen Plasmide präpariert und dem Restriktionsverdau zugeführt um sie anschließend zu sequenzieren.

Die Klonierung des PCR-Produktes umfaßt die Herstellung multipler identischer DNA-Produkte und beinhaltet die Ligation und Transformation.

Dabei wurde in geschnittene Vektorenplasmide ein Insert, die interessierende cDNA, ligiert. Diese Vektoren wurden anschließend in Bakterienkulturen (DH5a E. coli) transformiert. Die Transformation ist die Aufnahme der Plasmid-DNA in die Bakterienzelle. Nach der Methode von Birnboim and Doly wurde die rekombinante PlasmidDNA aus den Bakterienzellen isoliert, welche aus drei wesentlichen Abschnitten besteht: der Präparation und Klärung des Bakterienlysates (pelletieren, resuspendieren, lysieren, neutralisieren), der Adsorption der DNA an die QIAprep Silikatmembran und dem Waschen und Eluieren der Plasmid DNA.

Anschließend erfolgte der vektorspezifische Restriktionsverdau, um den Einbau des richtigen Fragmentes in die Plasmide zu überprüfen. Verwendet wurde das Restriktionsenzym EcoR1 (Endonuklease; von E. coli RY13 abstammend). Eine sich

anschließende Gelelektrophorese bei 90V ermöglichte die Veranschaulichung dieses Schneidens, da die entstehenden Fragmente bei erfolgreichem Einsatz zwei Banden erwarten lassen: einen Vektorrest in Höhe von etwa 3 kb sowie eine dem eingesetzten PCR-Produkt entsprechend große Bande (Agarosegel 1% in TBE).

Klone, die die entsprechende Größe des cDNA-Fragmentes im Restriktionsverdau und anschließender Gelelektrophorese zeigten, wurden für die Bestimmung der Nukleotidsequenz ihrer DNA-Fragmente verwendet.

Hierbei kam die Kettenabbruchmethode nach Sanger und Coulson zur Anwendung.

Bei der Sequenzierungsreaktion handelt es sich um eine PCR, bei der neben dNTPs auch fluoreszenzmarkierte ddNTPs (Didesoxyribonukleosidtriphosphate) innerhalb der Strangsynthese verarbeitet werden.

Es entstehen verschieden lange DNA-Fragmente mit differierenden Enden, die sich nur in einem Nukleotid unterscheiden.

Durch die Wahl des T7 und des SP6 Primers ist man in der Lage, sein in den Vektor eingebautes Insert von zwei Seiten in 5'-3'-Richtung zu sequenzieren, da Plasmide doppelsträngige ringförmige DNA darstellen. Dies lässt sich durch jeweils einzelne primerspezifische Ansätze erreichen.

Zwischen Sequenzierungs-PCR und der eigentlichen Nukleotidanalyse lagen die Ethanolfällung und das Waschen der DNA zur Aufreinigung.

Die DNA-Analyse erfolgte entsprechend einer Gelelektrophorese in einem ABI Prism 3100 Avant Genetic Analyzer; die Datenauswertung mit ABI Prism Sequence Analysis v5.1.1 Software.

Hierdurch konnten die erwarteten Sequenzen und somit die Spezifität der Primer nachgewiesen werden.

2.2.6.1 Ligation

10µl-Ansatz:

3:1 bis 10:1 Überschuss von Insert zu Vektor (2µl und 5µl verwendet)

1-3µl cDNA aus PCR

1µl Vektor pGEM-T easy vector (50ng/µl) (3015 bp groß)

5µl 2x Rapid Ligations Puffer (ATP enthalten; thermolabil dadurch)

1µl T4-DNA-Ligase (3 units)

0-2 µl H₂O

10µl Positivkontrolle

2µl Kontroll-DNA (4ng/µl) statt cDNA bei sonst identischem 10µl Ansatz

Nach sorgfältigem Mischen lagert man den Ligationsansatz über Nacht bei 4 °C, um die höchste Effektivität zu erzielen.

Ein zusätzliches Tube enthält eine Kontroll-Insert-DNA aus dem zugehörigen Ligationskit zur internen Kontrolle.

2.2.6.2 Transformation

Die Transformation ist die Erzeugung transgener Organismen zur Vervielfältigung von DNA-Fragmenten.

DH5alpha Zellen (E. coli), die zuvor mit CaCl₂ chemisch kompetent gemacht wurden, sind in der Lage Vektoren in Form von Plasmiden, ringförmiger DNA, durch ihre brüchige Zellmembran aufzunehmen.

Dazu wurden Aliquots von 50µl Zellen (die vorher bei -80° lagerten) pro Tube langsam auf Eis aufgetaut. Nach 10 min wurden durch vorsichtiges Rühren mit der Pipettenspitze 2µl bis 5µl Ligationsansatz, der zuvor gemischt und gevortext wurde, in die Zellen eingebracht. In der sich anschließenden Inkubationsphase von 30 min auf Eis erfolgte die Anlagerung der Plasmide an die Zellmembranen. Der darauffolgende Hitzeschock der Zellen im Wasserbad bei 37°C für 20 s sorgte für die Aufnahme der Plasmide in das Zellinnere. Danach folgte eine sofortige 2minütige erneute Inkubation auf Eis. Hierbei schlossen sich die Poren der Membranen. Anschließend gab man 950µl vorgewärmtes LB-Medium zu den noch empfindlichen Zellen und ließ sie eine Stunde bei 37°C und 225rpm schütteln. Diese Phase diente der Erholung der Bakterienzellen. Zudem wurde dabei die auf dem Plasmid befindliche Ampicillinresistenz in das Bakteriengenom übernommen, welche eine Voraussetzung für das spätere Wachstum auf der Agarplatte darstellt.

Herstellung des LB-Flüssigmediums

1000ml LB- Flüssigmedium(pH 7,025):

10g Bacto- Trypton Becton Dickinson
5g Bacto Yeast Extract (BD)
10g NaCl
950ml H₂O

Herstellung der Agarplatten

100ml LB-Agar:

100ml LB-Medium
1,5g Bacto Agar
100µl Ampicillin
150-250µl x-Gal (40mg/ml)

Die Bestandteile wurden jeweils vermischt und geschüttelt bis zur vollständigen Lösung. Anschließend wurde der pH mit Natronlauge 5N auf ca. 7,05 eingestellt und das Ganze für 30min autoklaviert. Danach wurden Ampicillin in einer Konzentration von 1:1000 (50µg/µl) und xGal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranosid) zugesetzt und der LB-Agar mit je ca. 10ml auf Petrischalen verteilt.

50µl der Bakterien-Medium-Mischung wurden auf eine Platte ausgebracht. Anschließend wurde der im Röhrchen verbleibende Rest für zwei min bei 5000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und in dem Verbleibenden wurden die abzentrifugierten Zellen resuspendiert. Diese wurden dann auf einer zweiten Platte verteilt. Der Zentrifugierungsschritt dient der Aufkonzentrierung im Vergleich zu den ersten 50 entnommenen µl.

Die Petrischalen wurden bei 37°C im Brutschrank mit der Deckseite nach unten über Nacht inkubiert.

Am nächsten Tag wurden sie nach ausreichendem Koloniewachstum für ca. eine Stunde in den Kühlschrank gestellt. Dies dient einer besseren Blau-Weiß-Selektion der Kolonien. Das x-Gal in dem Agar ist ein artifizielles chromogenes Substrat, welches von den Bakterien nur verwertet werden kann, wenn sie das transformierte Plasmid erfolgreich aufgenommen haben, dieses aber keine suffiziente Ligation durchlaufen hat. Das Gen für dessen Verwertung (lacZ-Gen) liegt in dem Bereich der multiple cloning site (MCS) des Vektors und codiert für das Enzym β-Galaktosidase. Das gewünschte Fragment wird dort eingebaut. Bleibt dies aus, kann das Plasmid religieren und die Sequenz für die β-Galaktosidase ist in einem Stück ablesbar. Diese ist in der Lage x-Gal zu hydrolysieren zu Galaktose und 5-Brom-4-chlor-indoxyl. Letzteres wird durch den Sauerstoff in der Luft zum tiefblauen Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo oxidiert. Somit entsteht die bereits genannte Blaufärbung. Bei erfolgreicher Ligation verhindert das eingebaute Fragment dieses und die Kolonie bleibt weiß.

Mindestens 60% der entstehenden Kolonien sollten weiß sein, 40% blau. Dann spricht man von einer effizienten Ligation. Auch die Ligation mit der Kontroll-DNA wurde auf zwei Platten ausgebracht. Sie ermöglicht ebenfalls eine spätere Aussage über die Effizienz der Ligation sowie der Transformation.

Man pickte eine der weißen Kolonien und beimpfte ein mit 5ml LB-Medium und 5µl Ampicillin vorbereitetes 15ml Falconröhrchen.

Ein unbeimpftes Röhrchen mit LB-Medium diente als Kontrolle. Diese angelegten Kulturen wurden über Nacht bei 37°C und 225rpm geschüttelt, um ein Heranwachsen des Bakterienklones zu ermöglichen und somit eine Vermehrung der Plasmide zu erreichen.

2.2.6.3 Plasmid Mini-Präparation

Hierbei wurde ein Teil der Übernachtsflüssigkultur durch alkalische Lyse nach der Methode von Birnboim and Doly verwendet, um die rekombinante PlasmidDNA aus den Bakterienzellen zu isolieren.

4ml der Übernachtskultur wurden in ein 2ml Röhrchen pipettiert und eine min bei 10.000rpm zentrifugiert. Dadurch wurden die Zellen pelletiert. Nach Abgießen des Überstandes wurden sie in 250µl Puffer P1, der mit Rnase A versetzt wurde, resuspendiert. Nach Durchmischung folgten zwei Waschschriffe zum einen mit 250µl Puffer P2 und zum anderen mit 350µl Puffer N3, welche die Salze aus dem Ansatz entfernen. Nach Zugabe von Puffer P2 entstand nach dem Mischen ein klares Lysat, nach Zugabe von Puffer N3 und vorsichtigem Mischen ein flockiges Präzipitat, was die Ausfällung der Zellreste darstellt.

Daran schloß sich eine weitere Phase der Zentrifugation bei 13.000 rpm und RT für 10min. Anschließend wurde die Säule auf ein neues 2ml Tube gesetzt. Der klare Überstand enthält die DNA, welcher im Folgenden auf eine Säule gegeben und erneut für eine min bei 13.000rpm zentrifugiert wurde. In diesem Schritt bindet die DNA an die Membran der Säule während RNA, Zellproteine, Metabolite nicht adsorbieren. Diese wurden nach Durchfluss verworfen.

Im nächsten Schritt wurde die Membran mit 750µl Puffer PE gewaschen, einem Puffer, der mit 99% Ethanol versetzt ist. Anschließend folgte nochmaliges Zentrifugieren bei

13.000 rpm für eine min, Durchfluss verwerfen und erneutes Zentrifugieren für eine Minute bei 13.000rpm. Dies führte zum Trocknen der Säule, um ein späteres Miteluieren des Ethanol zu verhindern, da dieser in der Lage ist, sich anschließende enzymatische Prozesse zu stören.

Nach Überführung auf ein neues Röhrchen wurde die PlasmidDNA durch Zugabe von 50µl Bdest und einer Inkubationsphase von einer Minute und nochmaliger einminütiger Zentrifugation bei 13.000 rpm und RT eluiert, wobei das beste Resultat bei einem pH von 7,0 bis 8,5 erreicht wird.

2.2.6.4 Restriktionsverdau

Der Restriktionsverdau dient der Überprüfung des Einbaues des richtigen Fragmentes in die Plasmide.

Hierbei wurde das isolierte, Plasmid linearisiert und das Restriktionsenzym EcoR1 (Endonuklease; von E. coli RY13 abstammend) schnitt an der palindromischen Sequenz 5'-G/AATTC-3' das Insert aus dem verwendeten Vektor pGEM-Teasy heraus. Die Schnittstellen liegen in der angrenzenden Region des eingebauten Inserts.

5µl Plasmid-Miniprep-DNA wurden zusammen mit 1µl EcoR1, 1µl 10x Puffer H und 3µl H₂O angesetzt. Der 1µl 10x Puffer H sorgt dabei für optimale Umgebungsbedingungen für das Enzym.

Aufgrund der Thermolabilität des Enzyms war das Ansetzen der Reaktion auf Eis erforderlich, dem folgte eine einstündige Inkubation im 37°C Brutschrank.

Die sich anschließende Gelelektrophorese bei 90V ermöglichte eine Veranschaulichung dieses Schneidens, Hierbei verwendete man den 1kb Marker zum Vergleich der Fragmentgrößen.

EcoR1 hat den Vorteil, dass es sogenannte sticky ends (überhängende Enden) schneidet.

Zu beachten ist hierbei, dass man die Inkubationszeit nicht stark übersteigt, da das Enzym eine Staraktivität aufweist, d.h. es schneidet dann auch unspezifisch an anderen Stellen, möglicherweise im Insert selbst, was sich im Gel in Form von mehreren Banden zeigt.

10µl Ansatz:

5µl Plasmid-Miniprep-DNA	1µl 10x H-Puffer (Amersham)
1µl EcoR1 (Eurogentec)	3µl H ₂ O

2.2.6.5 Sequenzierungs PCR

Anhand der vorliegenden DNA, welche als Matrize dient, wird ein neues Stück DNA synthetisiert (siehe PCR). Der Ansatz beinhaltet einen Mix aus 2µl Big Dye (enthält dNTPs, ddNTPs, Polymerase, Puffer und MgCl₂ – letzteres stabilisiert die alpha Phosphatgruppe am Nukleotid beim Einbau), 1µl Primern (hier T7 oder SP6), 6µl Wasser und 1µl der zu sequenzierenden DNA aus dem Restriktionsansatz. Durch den Einbau von diesen markierten 2´3´-Dideoxyribonukleosidtriphosphaten wird ein Kettenabbruch innerhalb der DNA-Synthese erzeugt, weshalb man sie auch als Terminatoren bezeichnet. Er beruht auf ihrer Beschaffenheit: ihnen fehlt die OH-Gruppe am 3´-Ende, was ein Anfügen des nächsten Nukleotides verhindert, da die DNA-Polymerase eine 3´-OH Gruppe für die Synthese des Stranges benötigt.

Die verwendeten Nukleotidanaloga lagen hierbei im Verhältnis von 200:1 für dNTPs vor, was einen seltenen Einbau von ddNTPs garantiert und somit für das Entstehen von langen Syntheseprodukten vor Abbrechen der Kette spricht.

10µl Ansatz:

2µl Big Dye (ddNTPs, dNTPs, Polymerase, MgCl ₂ , Puffer)
1µl Primer T7 / SP6 (10pmol/µl)
6µl H ₂ O
1µl DNA

Programm:

Schritt 1	95 °C	2min
Schritt 2	96 °C	15s
Schritt 3	45 °C	4min
Schleife Schritt 2 bis 3		24x
Schritt 5	15 °C	15min
Schritt 6	4 °C	Pause

Vorgeheizter Deckel auf 105°C

2.2.6.6 Ethanolfällung und Waschung der DNA

Bei der ersten wurden 350µl aus einem Ansatz aus 3,3ml Wasser, 400µl 3M NaAcetat mit einem pH von 4,8 (Präzipitation der DNA) und 10ml 99,6% EtOH entnommen und zur SequenzPCR gegeben, gemischt, gevortext und 20 min bei 14.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde sie mit 350µl 70% EtOH, nach mischen und anschließender erneuter Zentrifugation bei 4 °C und 14.000 rpm für 10 min, gewaschen. Hierbei lagerte sich die DNA als nicht sichtbares Pellet am Tubeboden ab. Der Überstand wurde ebenfalls dekantiert und die DNA für einige Minuten luftgetrocknet, um ein vollständiges Verdunsten des Ethanols zu ermöglichen.

Nach Hinzufügen von 20µl Formamid und Durchmischung wurde die Probe bei 95°C für fünf min denaturiert bevor sie sequenziert wurde. Formamid dient der finalen Denaturierung um Faltungen und Bildung von Konglomeraten zu verhindern.

2.2.7 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurde die Software SPSS verwendet. Es handelte sich hierbei um unverbundene Proben die eine ungleiche Varianz aufwiesen. Eine Normalverteilung wurde nicht angenommen und konnte aufgrund des geringen Stichprobenumfanges nicht geprüft werden. Daher wurde der Kruskal Wallis Test verwendet, um die Analyse mehrerer Gruppen hinsichtlich signifikanter Unterschiede einer Variablen (die einzelne ECE-1 Isoform bzw. präproET-1 in A.BY bzw. C57Bl/6 im Infektionsverlauf von Tag 0 bis Tag 28) durchzuführen. Der anschließend durchgeführte Mann Whitney U Test wurde verwendet, um die Ergebnisse des Kruskal Wallis Tests zu bestätigen. Er untersucht zwei Gruppen auf signifikante Unterschiede einer Variablen (jede ECE-1 Isoform bzw. präproET-1 in A.BY bzw. C57Bl/6 zwischen zwei Zeitpunkten). Dieser wurde angewendet, da bei dem geringen Stichprobenumfang keine Normalverteilung vorlag. Ein signifikanter Unterschied wurde definiert für ein Signifikanzniveau mit $p < 0,05$.

2.2.8 Abbildungen

Die Grafiken wurden mit Adobe Illustrator CS2, MS Power Point und der Graphikfunktion in MS Excel angefertigt. Die Formel der Effektstärke d wurde von <http://www.statistik-und-beratung.de> übernommen.

3 Ergebnisse

3.1 Standardreihen zur Effizienztestung der Primer

Um die designierten Primer hinsichtlich ihrer Effizienz zu testen wurden diese nach Sequenzanalyse in u.g. Verdünnungsreihen einer qPCR zugeführt.

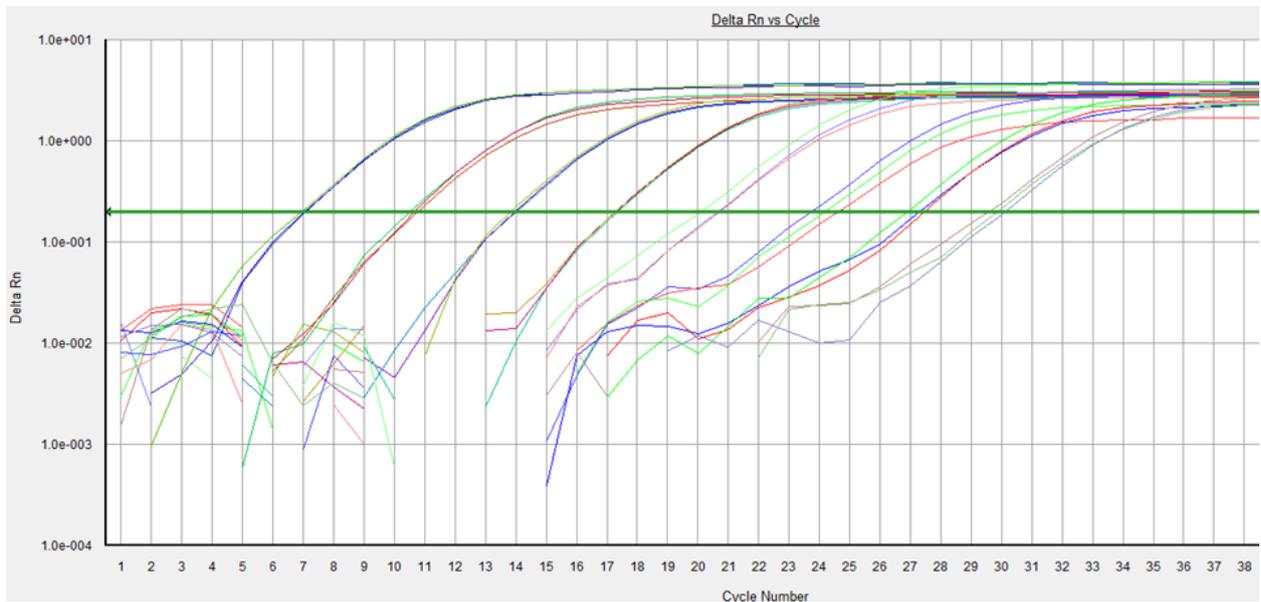


Abbildung 5: RT-qPCR der präproET-1-Standardreihe

Verdünnungsreihe 1pg, 0,1pg, 0,01pg, 1ng, 0,01ng, 1fg ET-1 cDNA. X-Achse entspricht der Zyklenzahl, y-Achse entspricht der Amplifikatqualität. Der grüne Pfeil markiert den Ct-Wert.

Die Abbildung zeigt das Amplifikationsresultat der quantitativen real-time-PCR der präproET-1-Standardreihe.

Die Verdünnungsreihe von präproET-1 cDNA bestand aus 1pg, 0,1pg, 0,01pg, 1ng, 0,1ng, 0,01ng und 1fg. Der grüne Balken stellt die verwendete Zyklenzahl (Ct- Wert) dar. Eine größere Menge von ET-1 entspricht einer geringeren Zyklenzahl; das Fluoreszenzsignal ist dementsprechend früher messbar.

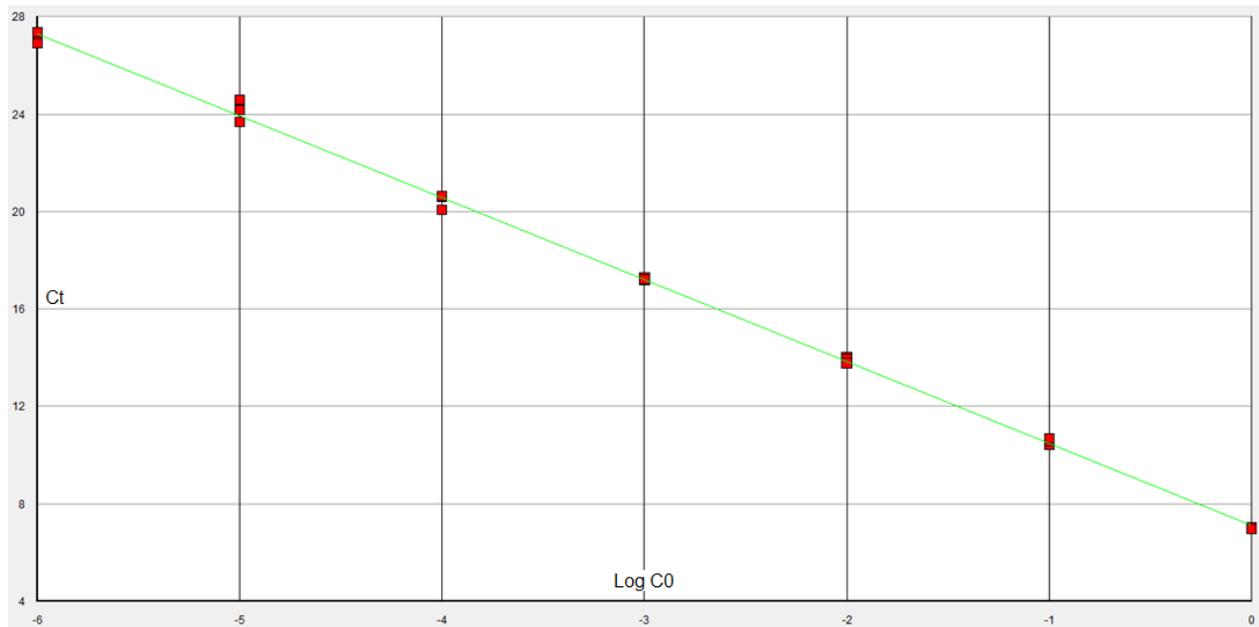


Abbildung 6: präproET-1 Standardreihe

Die x-Achse stellt den Logarithmus der Gesamtkopienzahl der Verdünnungsreihen dar, die y-Achse den Ct-Wert. Die Einzelproben der Verdünnungsreihen der präproET-1 Primer sind rot dargestellt. Die grüne Linie entspricht dem Anstieg m der Standardreihe.

Der ermittelte Ct-Wert wurde anschließend für die Erstellung der Standardkurve gegen den Logarithmus der Gesamtkopienzahl aufgetragen. Die lineare Regressionsgerade (grün) besitzt die Steigung $-m$, trägt man die DNA-Konzentrationen ansteigend auf.

$$\text{Effizienz } E = 10^{-1/m} - 1$$

m von $-3,32$ bedeutet eine Effizienz von $1=100\%$, dementsprechend einer Verdoppelung der Probe pro Zyklus. m von $-3,58$ entspricht einer Effizienz von $\approx 90\%$.

Die Steigung für präproET-1 ergab $3,33$, dementsprechend einer Effizienz von nahezu 100% (Abb. 6).

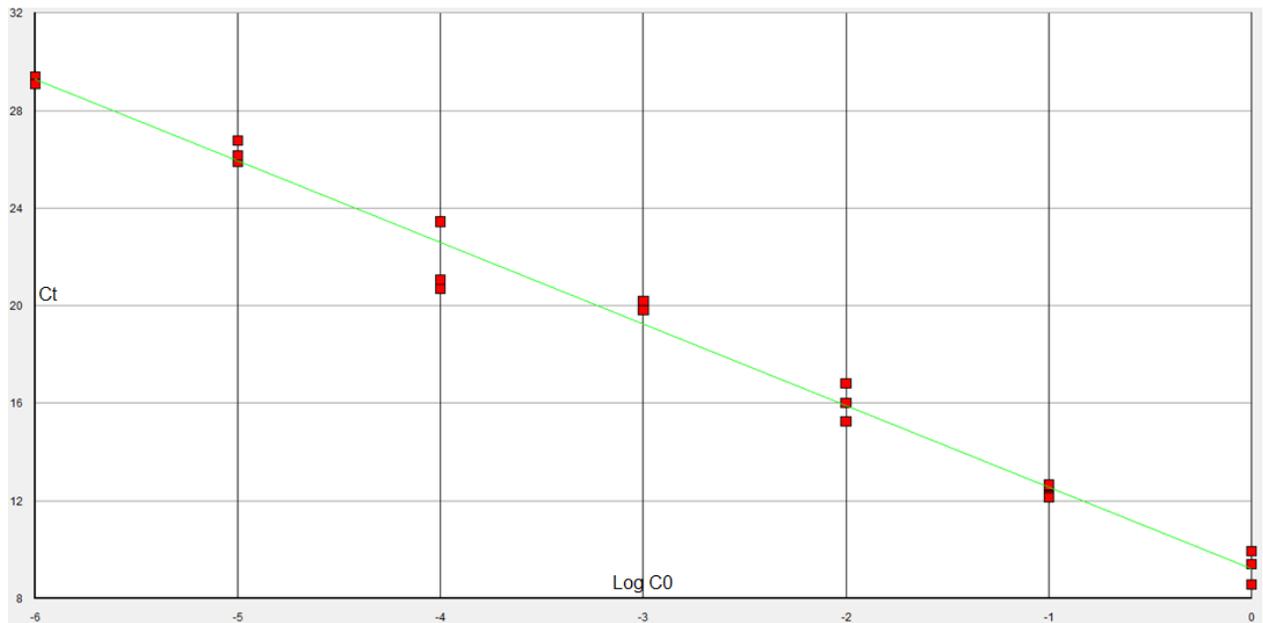


Abbildung 7: 18S-Standardreihe

Die x-Achse stellt den Logarithmus der Gesamtkopienzahl der Verdünnungsreihen dar, die y-Achse den Ct-Wert. Die Einzelproben der Verdünnungsreihen der 18S Primer sind rot dargestellt. Die grüne Linie entspricht dem Anstieg m der Standardreihe.

$m_{18S} = 3,36$, dementsprechend einer Effizienz von nahezu 100%.

Für die Standardreihen und Effizienzen der Isoformen von ECE-1 siehe Lindenau et al. 2006.

3.2 Dissoziationskurven zur Primerspezifizierung der ECE-1 Isoformen, präproET-1 und 18S

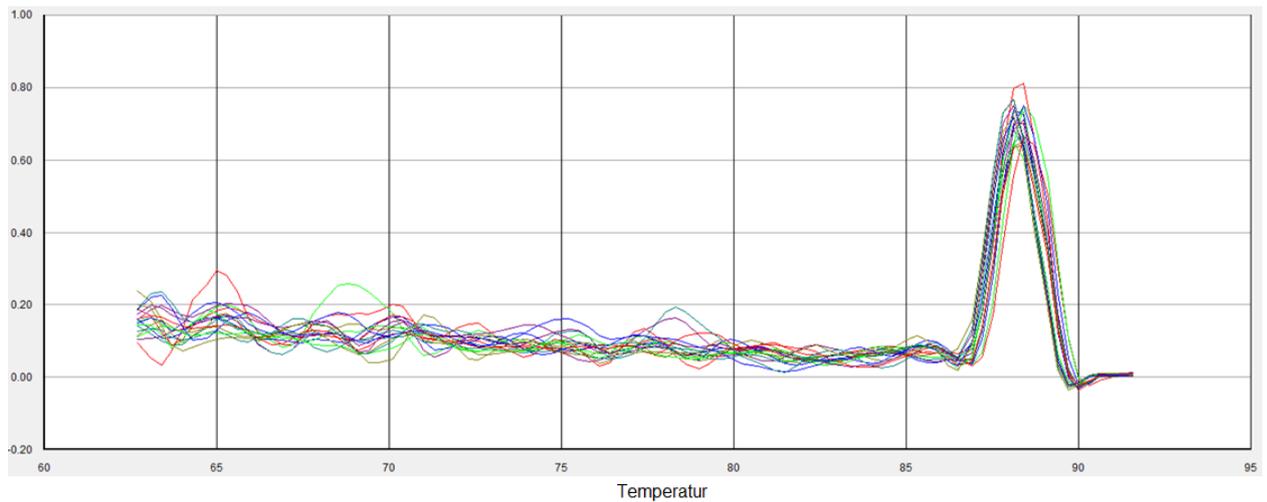


Abbildung 8: Dissoziationskurve ECE-1a

x-Achse = Temperatur, y-Achse = Menge des Derivates. Abgebildet sind die Dissoziationskurven von ECE-1a.

Die Dissoziationskurven geben die Spezifität der Primer an. Abb. 7 zeigt die spezifische Schmelztemperatur für ECE-1a, sie liegt zwischen 88 und 89°C. (Abb. für ECE-1 b-d siehe Anhang). Die spezifischen Schmelztemperaturen für ECE-1b ECE-1c und ECE-1d liegen ebenfalls zwischen 88 und 89°C. Sie unterschieden sich nicht zwischen den Mausstämmen.

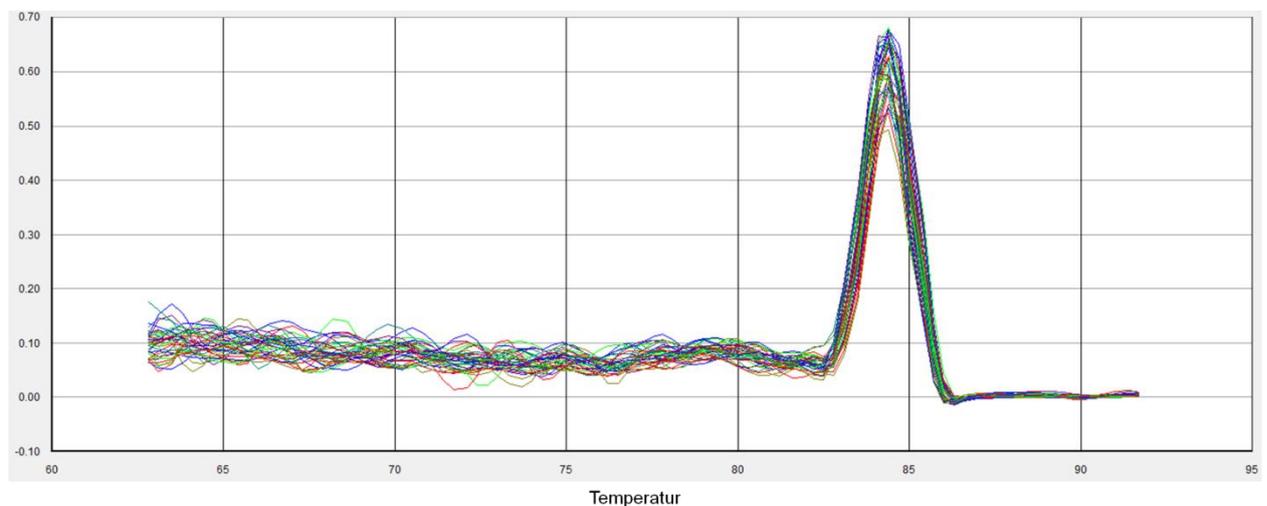


Abbildung 9: Dissoziationskurve präproET-1

x-Achse= Temperatur, y-Achse = Menge des Derivates. Abgebildet sind die Dissoziationskurven von präproET-1.

Die spezifische Schmelztemperatur von präproET-1 liegt bei 84°C.

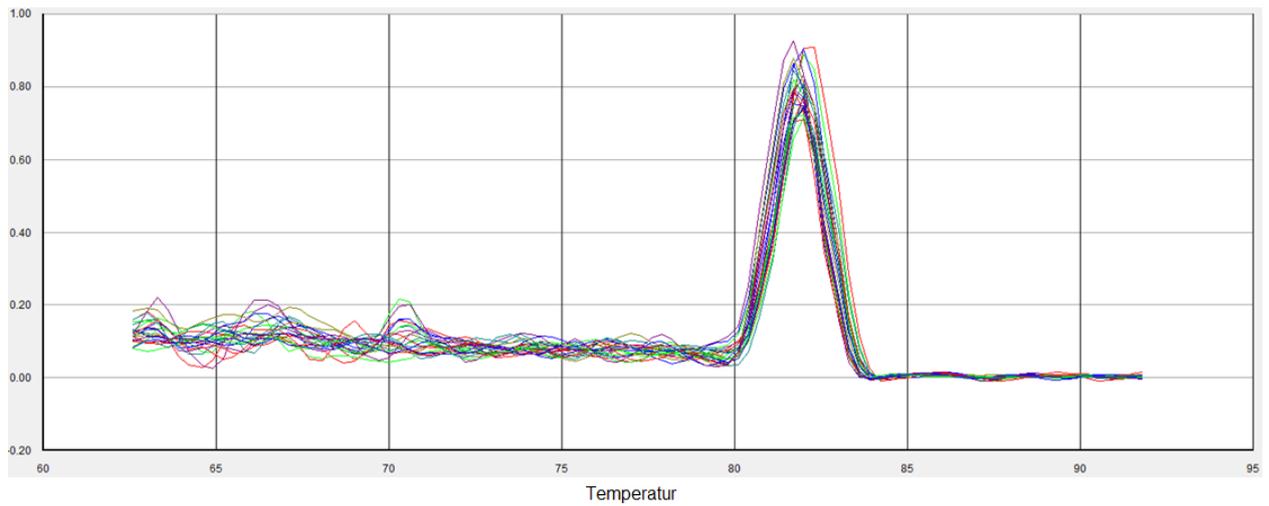


Abbildung 10: Dissoziationskurve 18S

x-Achse= Temperatur, y-Achse = Menge des Derivates. Abgebildet sind die Schmelzkurven von 18S.

Die spezifische Schmelztemperatur für 18S liegt bei 82°C.

3.3 Qualitative Expression der mRNA der kardialen ECE-1-Isoformen

Vor der Klärung der Expressionsunterschiede in den Mausmodellen stand zunächst die qualitative Analyse der ECE-1 Isoformen im Myokard.

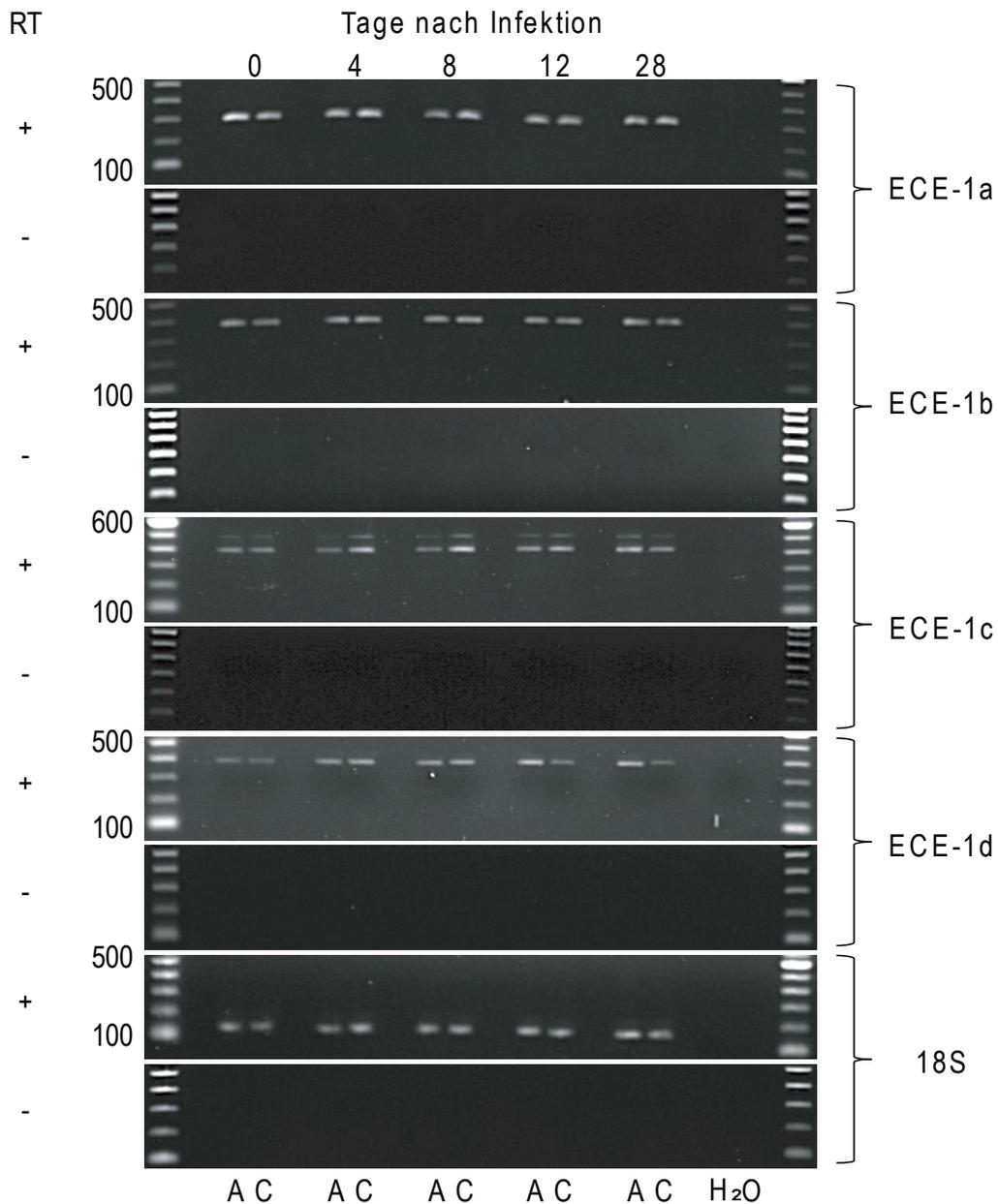


Abbildung 11: Gelelektrophorese der ECE-1 Isoformenexpression und 18S cDNA im Verlauf der murinen Myokarditis

Dargestellt ist die jeweils isoformspezifische PCR transkribierter cDNA (RT+). Die PCRs mit H₂O anstelle von cDNA und ohne reverse Transkriptase (RT-) entsprechen den Negativkontrollen. 18S cDNA entspricht der internen Kontrolle der cDNA. A: Stamm A.BY. C: Stamm C57BL/6. Flankiert werden die Fragmente zu beiden Seiten von dem 100bp DNA Marker, dessen Bandengrößen linksbündig für die Fragmentgrößenzuordnung der Isoformen und 18S beschriftet sind. Am Oberrand findet sich die Einteilung Tage nach Infektion von 0-28 entsprechen dem Zeitpunkt von nicht infiziert (Tag 0) bis 28 Tage nach Infektion mit CVB3.

Ein Nachweis aller Isoformen war hier zu jedem Zeitpunkt möglich.

Im Verlauf des chronischen Modelles (hier A abgekürzt) war die Bandenstärke für ECE-1a an Tag vier und acht scheinbar abnehmend, verglichen mit der nicht infizierter Tiere, und zu Tag 12 und 28 etwas ansteigend. Isoform a hatte eine Fragmentgröße von 293bp.

ECE-1b ließ allenfalls eine geringe Steigerung der Signalintensität über den gesamten Infektionsverlauf bis zum Tag 28 erkennen. Isoform c und d wiesen diese kontinuierliche Steigerung bis Tag 28 deutlicher auf. Isoform b wies eine Fragmentgröße von 390 bp und Isoform d von 379bp auf.

In C57Bl/6 war der Verlauf der Intensität der Banden an Isoform c am deutlichsten zu erkennen: von Tag null über vier zu acht steigend, ab Tag 12 wieder schwächer. In milderer Form war dies ebenfalls für ECE-1a, b und d zutreffend.

Bei Isoform ECE-1c fand sich die durch Lindenau et al. 2006 erstmals nachgewiesene 2. Bande. Ein 473bp großes Fragment, welches zunächst als eine Spleißvariante von ECE-1c (ECE-1c2) identifiziert wurde, neben dem 389bp umfassenden ECE-1c1. Durch Analyse mit variierenden Primern und dem Nachweis kontinuierlicher Konzentrationsverhältnisse von ECE-1c-1 zu ECE-1c2 wird vermutet, dass ECE-1c1 durch Spleißen von ECE-1c2 generiert wird. Ein zweites, isoformspezifisches Exon, welches im murinen, nicht aber im menschlichen Genom nachweisbar ist, konnte entschlüsselt werden.

Das Housekeeping Gen 18S, welches seine Expression während des Krankheitsverlaufes nicht ändert, wies eine Bandengröße von 120bp auf.

An den RT minus-Kontrollen und dem mit amplifizierte H₂O war ersichtlich, dass keine Verunreinigungen vorlagen.

3.4 mRNA-Expression der ECE-1-Isoformen im Verlauf der Myokarditis

Zur weiteren quantitativen Analyse wurde mit der ddCt-Methode die relative Konzentration der entsprechenden Isoform berechnet (siehe dazu Methoden 2.2.5 Quantifizierung der cDNA mittels real time PCR).

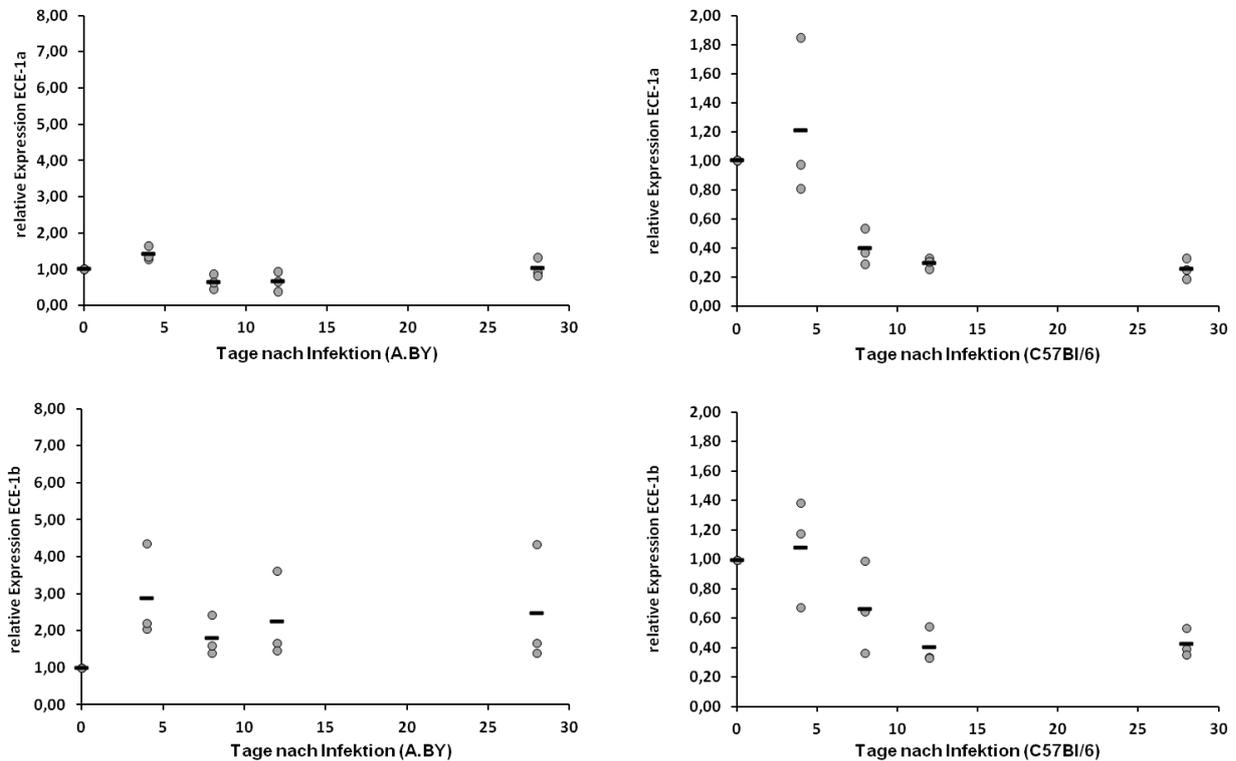


Abbildung 12: Relative mRNA-Expression der ECE-1-Isoformen a und b

Nach real-time PCR und Standardisierung auf 18S (dCt Rohdaten siehe Anhang) folgte mittels ddCt Methode die Relation der mRNA-Expression der Isoform durch Bezug zum jeweiligen Kontrollzeitpunkt Tag 0. y-Achse: relative Expression der mRNA der ECE-1-Isoform $2^{-dd Ct}$; x-Achse: Myokarditisverlauf (Tag0 bis Tag28). Die grauen Punkte stellen die Einzelwerte der Tiere pro Zeitpunkt dar, die schwarzen Balken bilden die Mittelwerte ab. Graphen linksbündig: A.BY; Graphen rechtsbündig: C57Bl/6.

Im chronischen Modell (A.BY) zeigte ECE-1a keine wesentliche Änderung des Gewebespiegels im Krankheitsverlauf von Tag null bis 28.

Unter den C57Bl/6 Mäuse wies ein einzelnes Tier am Tag vier annähernd eine Verdoppelung des Expressionsniveaus auf. Die anderen zwei Tiere zeigten jedoch nahezu konstant bleibende Werte zum Tag null. Betrachtet man den weiteren Verlauf ist ein zum Ausgangswert gleichbleibendes Expressionsniveau sichtbar. An Tag 28 nach Infektion mit dem CVB3-Virus lag dies weiter nahe dem Ausgangsniveau. Signifikant war keine der Änderungen.

Isoform b zeigte in A.BY am Tag vier einen Anstieg auf das Dreifache mit anschließendem leichten Abfall zum Tag acht und nachfolgend zunächst konstanten und wieder steigenden Werten bis Tag 28. Diese lagen vier Wochen nach Infektion über dem Gewebespiegel der nicht infizierten Tiere. In der Analyse von ECE-1b bei A.BY fand sich zu allen vier gemessenen Zeitpunkten nach Infektion mit CVB3 ein Verhältnis von 2:1 der Messwerte bezüglich der Verteilung um den Mittelwert.

In den C57Bl/6 Tieren zeigte der Gewebespiegel von ECE-1b im Krankheitsverlauf ein ähnliches Verhalten wie Isoform a.

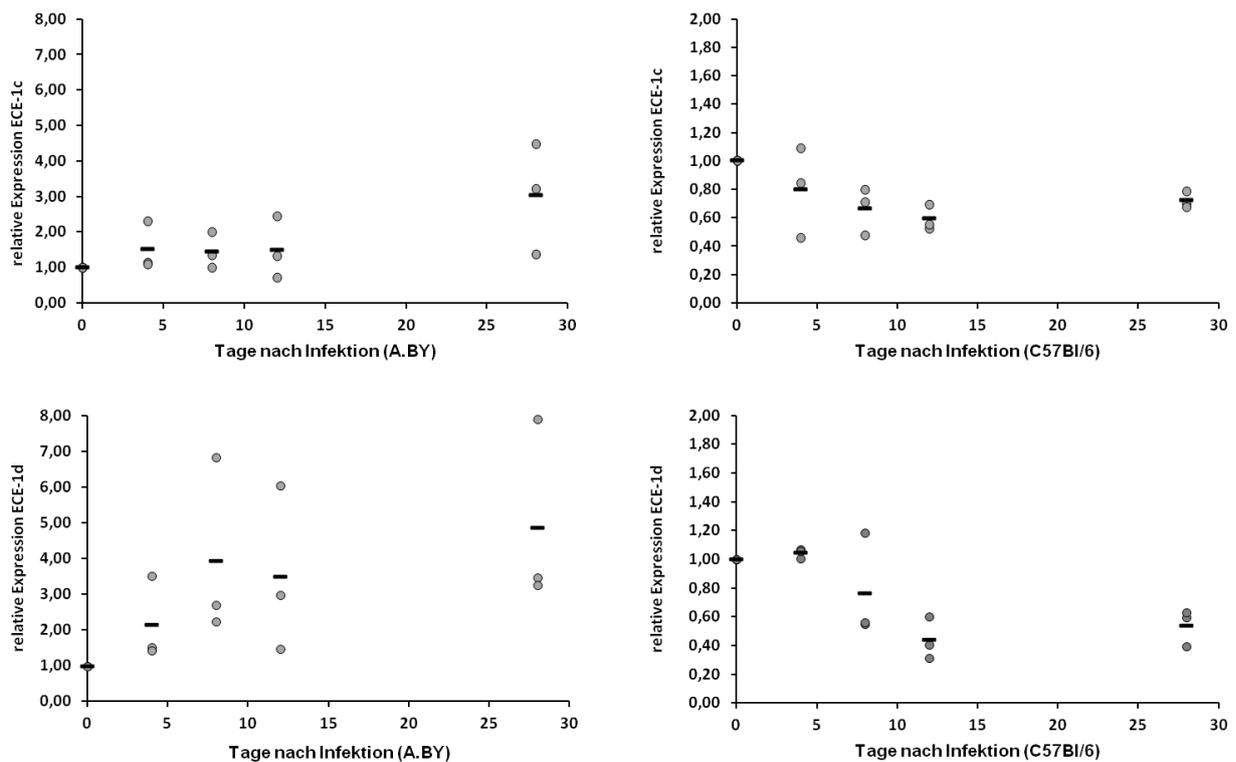


Abbildung 13: Relative mRNA-Expression der ECE-1-Isoformen c und d

Nach real-time PCR und Standardisierung auf 18S folgte mittels ddCt Methode die Relation der mRNA-Expression der Isoform durch Bezug zum jeweiligen Kontrollzeitpunkt Tag 0. y-Achse: relative Expression der mRNA der ECE-1-Isoform 2-dd Ct; x-Achse: Myokarditisverlauf (Tag0 bis Tag28). Die grauen Punkte stellen die Einzelwerte der Tiere pro Zeitpunkt dar, die schwarzen Balken bilden die Mittelwerte ab. Graphen linksbündig: A.BY; Graphen rechtsbündig: C57Bl/6.

Isoform c blieb in A.BY Mäusen bis zum Tag 12 zunächst annähernd konstant zum Ausgangswert in jeweils zwei von drei Tieren pro Zeitpunkt. Jeweils eines zeigte eine Verdoppelung zu Tag vier mit anschließend stabilem Niveau bis Tag 12. Im Zeitabschnitt 12 bis 28 Tage nach Infektion kam es zu einem Anstieg des Gewebespiegels auf das 2-

3 fache des Ausgangsniveaus. Insbesondere hier fand sich auch die größte Varianz mit einem gleichbleibenden und zwei steigenden Werten.

Im akuten Modell war für Isoform c keine wesentliche Änderung des Expressionsniveaus nachweisbar. Die größte Varianz der Werte pro Messzeitpunkt fand sich hierbei am Tag vier.

Isoform d wies, verglichen mit den drei anderen Isoformen im chronischen Modell, die größtmögliche Varianz, über den untersuchten Krankheitsverlauf hinweg und in der jeweiligen Analyse pro Zeitpunkt nach Infektion auf. Sie stieg zum Tag vier auf das Doppelte an und weiter auf das Vierfache des basalen Gewebespiegels am Tag acht. Bis zum Tag 12 kam es zu einem leichten Abfall. Am Tag 28 war ein erneuter Anstieg bis auf das Fünffache der basalen ECE-1d Menge sichtbar. Hierbei lagen jeweils zwei Tiere pro Messzeitpunkt unterhalb des Mittelwertes, eines deutlich oberhalb, mit bis zu 6fach höherem Spiegel, verglichen mit dem Ausgangsniveau. Der Verlauf der durchgehenden Steigung bis Tag 28 war stetig für alle untersuchten Tiere, mit einer Ausnahme am Tag 12.

Isoform d ließ in C57Bl/6 Tieren ein ähnliches Verhalten zu Isoform a, b und c erkennen.

Die Gewebespiegel lagen bei A.BY vier Wochen nach Infektion bei drei von vier Isoformen über den Ausgangswerten von Tag 0 wohingegen in C57Bl/6 Tieren alle untersuchten ECE-1 Isoformen im Krankheitsverlauf nahezu keine Änderung zeigten. Das akute Modell wies somit insgesamt keine Auf- oder Abregulierung auf, das Chronische hingegen eine Hochregulation von ECE-1b und d bereits ab Tag vier und von ECE-1c vier Wochen nach Infektion mit dem CVB3 Virus. Signifikant nachweisbar waren diese Unterschiede nicht.

3.5 Vergleich der basalen mRNA-Expression der ECE-1-Isoformen des akuten mit dem chronischen Myokarditismodell

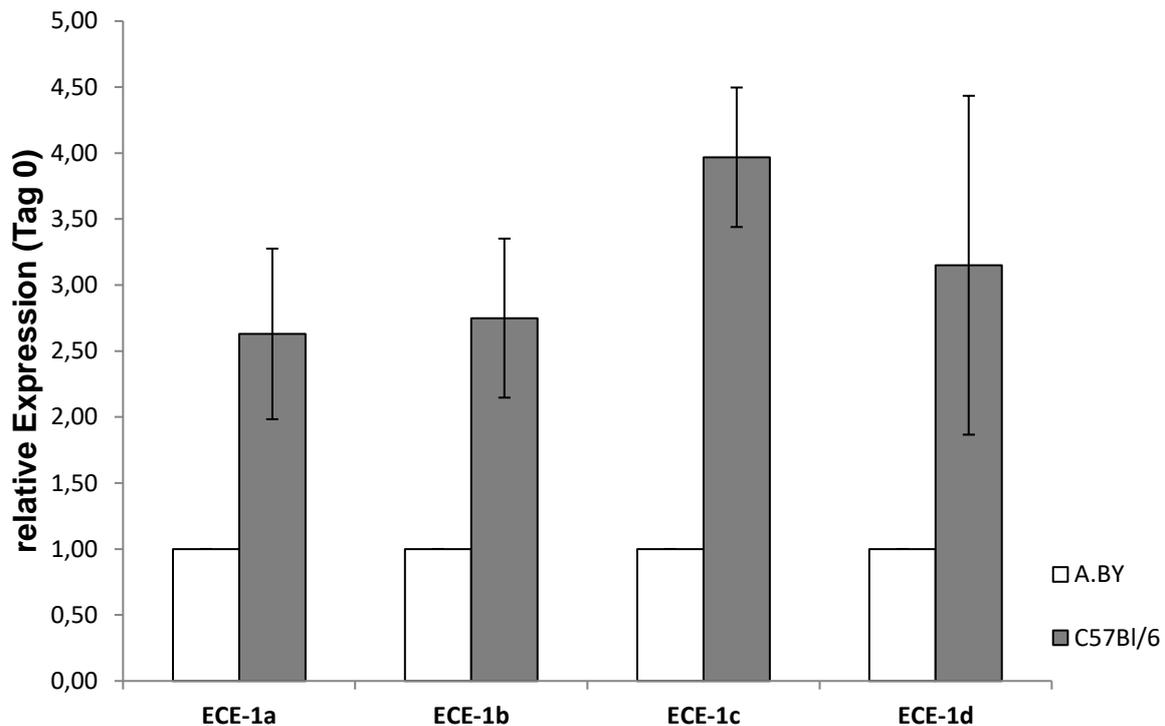


Abbildung 14: Vergleich der basalen ECE-1-Isoformenkonzentrationen

y-Achse: relative mRNA-Expression der Isoform (2^{-ddCt}) am Tag 0, ermittelt mit der ddCt Methode; x-Achse: Mittelwerte der ECE-1-Isoformen nicht infizierter Tiere (Tag 0); A.BY (weiße Säule)=1 definiert, C57Bl/6 (graue Säule) bezogen auf die jeweilige ECE-1-Isoform von A.BY mit Fehlerbalken, die die Standardabweichung darstellen

Hierzu wurde, entsprechend o.g. ddCt Methode, getrennt für jede Isoform in A.BY Tag 0=1 gesetzt und die Werte von C57BL/6 am Tag 0 darauf bezogen. Die nicht infizierten Mäuse des akuten Modelles wiesen eine 2,5fach höhere Expression von ECE-1a und b auf als die Tiere, die nach Virusinfektion einen chronischen Myokarditisverlauf zeigten. Isoform d lag in C57Bl/6 dreifach und ECE-1c sogar vierfach höher als in A.BY. Statistische Signifikanzen fanden sich in diesem Vergleich nicht.

3.6 Vergleich der mRNA Expression der ECE-1-Isoformen von A.BY/SnJ mit C57Bl/6 im Krankheitsverlauf

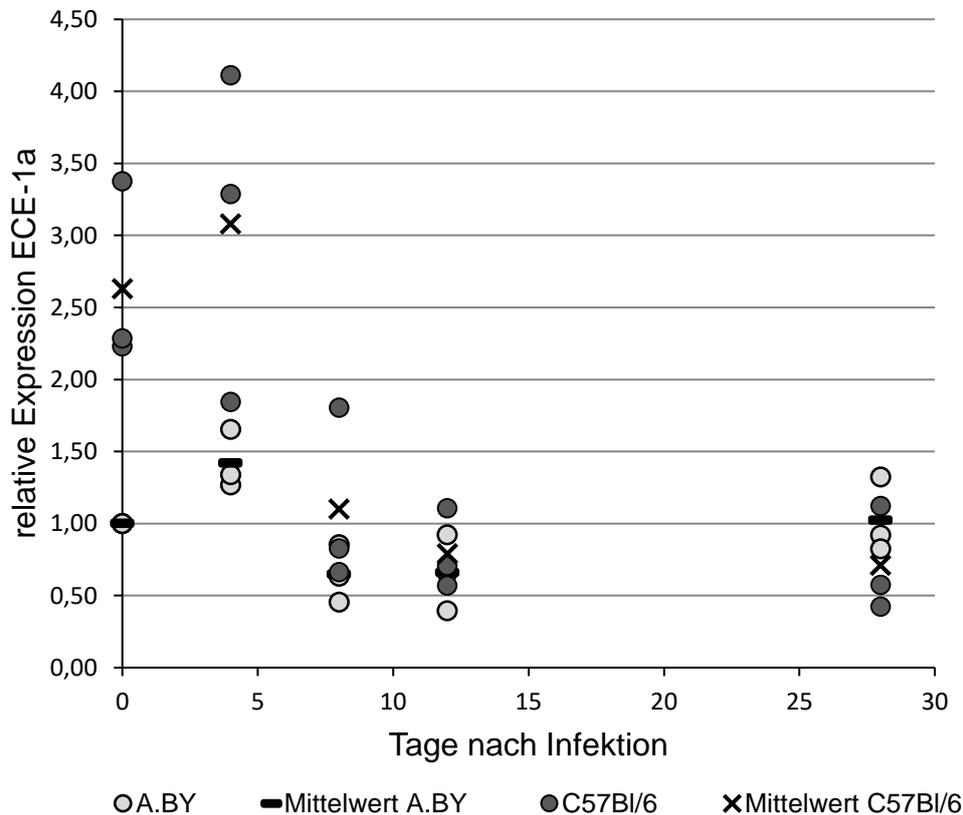


Abbildung 15: Relative mRNA-Expression ECE-1a akut gegen chronisch

x-Achse: Myokarditisverlauf (Tag0 bis Tag28 nach Infektion); y-Achse: relative RNA-Expression (2^{-ddCt}) ECE-1a ermittelt mit der ddCt Methode; hellgraue Kreise: A.BY Tiere; schwarzer Balken: Mittelwert A.BY; dunkelgraue Kreise: C57Bl/6 Tiere; x: Mittelwert C57Bl/6; A.BY Tag 0 = 1 gesetzt

Im akuten Modell war die Expression von ECE-1a zweieinhalbfach erhöht in nichtinfizierten Kontrolltieren im Vergleich zum chronischen Modell. Nach Infektion mit dem CVB3 Virus waren sowohl bei A.BY als auch bei C57Bl/6 zum Tag vier keine wesentlichen Änderungen detektierbar. Zu diesem Zeitpunkt lag die Expression in C57Bl/6 ebenfalls etwa 2,5-fach höher als in A.BY. Von Tag vier zu Tag acht post infectionem zeigten die Tiere des akuten Modelles einen Abfall der Expression an Isoform a auf ein Drittel der Expression von Tag vier. Die zur Chronifizierung neigenden Tiere wiesen keine wesentliche Änderung der Werte auf. Durch diesen deutlichen Abfall der C57Bl/6 Tiere näherten sich die Expressionsmengen der Stämme acht Tage nach Infektion deutlich an. Von Tag acht bis zum Tag 28 blieb die Menge an ECE-1a in A.BY

tendentiell konstant. Vier Wochen nach Infektion entsprach diese etwa der Ausgangsexpression. In den C57Bl/6 Tieren war nach dem deutlichen Absinken zum Tag acht ein tendentiell stabiles Niveau bis zum Tag 28 erkennbar. Vier Wochen nach CVB Infektion lag in diesem Modell etwa die Hälfte der Expressionsmenge von Tag acht und etwa ein Drittel jener von nicht infizierten Tieren vor. Im Verlauf von Tag acht bis 28 unterschieden sich die Mengen zwischen den beiden Modellen nahezu nicht.

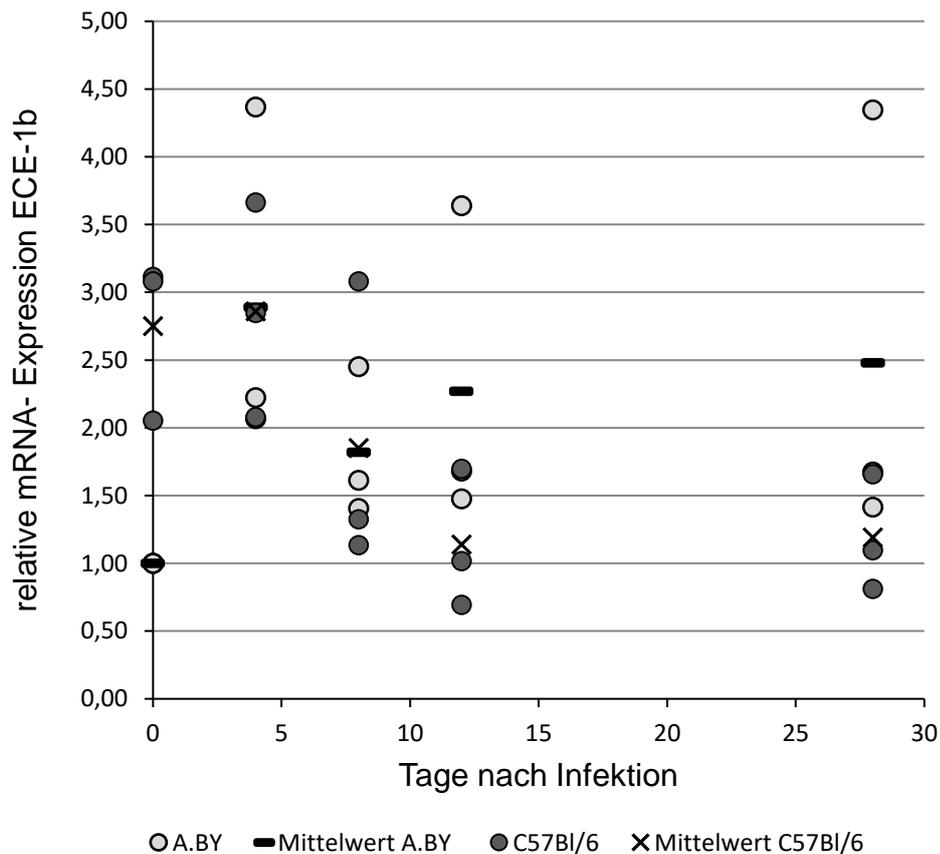


Abbildung 16: Relative mRNA-Expression ECE-1b akut gegen chronisch

x-Achse: Myokarditisverlauf (Tag0 bis Tag28 nach Infektion); y-Achse: relative RNA-Expression (2-ddCt) ECE-1b ermittelt mit der ddCt Methode; hellgraue Kreise: A.BY Tiere; schwarzer Balken: Mittelwert A.BY; dunkelgraue Kreise: C57Bl/6 Tiere; x: Mittelwert C57Bl/6; A.BY Tag 0 = 1 gesetzt

Auch Isoform b lag am Tag null im akuten Modell in etwa zweieinhalbfach höherer Expression als in A.BY Mäusen vor. Zum Tag vier fand sich im chronischen Modell eine Verdreifachung des Ausgangswertes, mit einer Varianz von Verdoppelung bis Vervierfachung. Das akute Modell hingegen wies keine Änderung der Expression auf. Die Schwankungsbreite der ermittelten Werte reichte hier von einer Steigerung um ein

Drittel der Ausgangsmenge bis hin zu einem Absinken um etwa ein Drittel. Durch diesen Anstieg in A.BY lag das Expressionsniveau in beiden Stämmen vier Tage nach Infektion gleich auf. Von Tag vier auf Tag acht zeigte diese Isoform in beiden Modellen ein tendentielles Absinken des Expressionsniveaus; dabei fielen beide etwa um ein Drittel ab. ECE-1b blieb in den A.BY Tieren dabei jedoch deutlich über seinem Ausgangsniveau und stieg im weiteren Verlauf bis Tag 28 wieder an bis auf das Zweieinhalbfache der basalen Expression. Dabei ließen sich Schwankungsbreiten von tendentiell gleichbleibend zum Tag acht nach Infektion bis zu Expressionssteigerungen auf das Dreieinhalb- bis Vierfache der basalen Expression an Tag 12 und 28 neben Abfällen mit Annäherungen an das Ausgangsniveau detektieren. C57Bl/6 Tiere zeigten hingegen wie in ECE-1a ein weiteres Absinken auf etwa die Hälfte der Konzentration an Tag acht und lagen vier Wochen nach Infektion unter dem Expressionsniveau der Kontrolltiere. Der erneute Anstieg in A.BY ab Tag 12 zusammen mit dem kontinuierlichen weiteren Absinken von ECE-1b in C57Bl/6 bis Tag 28 p.i. wiesen für diese Isoform eine Umkehr des ursprünglichen Expressionsverhaltens in den Stämmen auf. Initial fand sich eine deutliche Differenz zugunsten des akuten Modelles, die sich im Krankheitsverlauf zum chronischen Modell kehrt mit dem Wendepunkt zwischen Tag acht und 12 nach Infektion. Am Tag 12 entsprach die gemittelte Menge von ECE-1b in A.BY Mäusen dem Zweifachen von C57Bl/6 und lag nach 28 Tagen in etwa 1,5facher Höhe von C57Bl/6 vor.

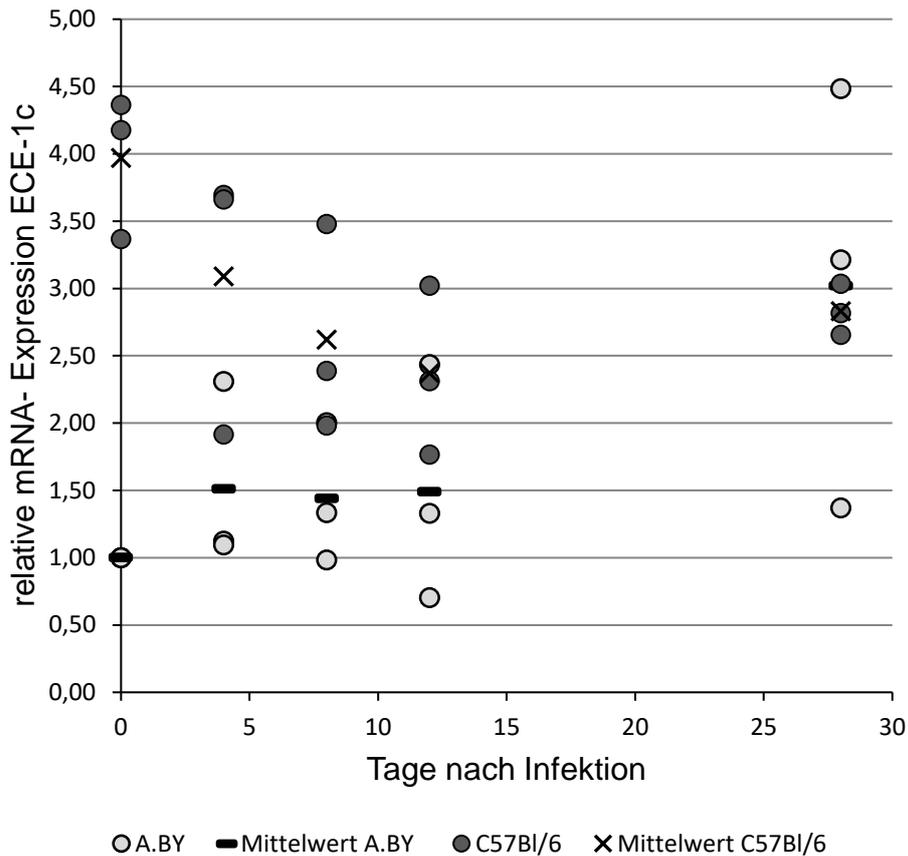


Abbildung 17: Relative mRNA-Expression ECE-1c akut gegen chronisch

x-Achse: Myokarditisverlauf (Tag0 bis Tag28 nach Infektion); y-Achse: relative RNA-Expression (2^{-ddCt}) ECE-1c ermittelt mit der ddCt Methode; hellgraue Kreise: A.BY Tiere; schwarzer Balken: Mittelwert A.BY; dunkelgraue Kreise: C57Bl/6 Tiere; x: Mittelwert C57Bl/6; A.BY Tag 0 = 1 gesetzt

Bei der Relation von ECE-1c des akuten gegen das chronisch verlaufende Modell war am Tag null ein Expressionsunterschied von vier nachweisbar. Während C57Bl/6 einen Abfall der Expressionsmenge bis zum Tag 12 auf 2,5 von vier durchlief, mit Schwankungsbreiten von tendentiell stabil bleibend an Tag vier bis zum Abfall auf 2,5 bereits vier Tage nach Infektion mit CVB3. A.BY zeigte zunächst keine Änderung der Expression bis Tag 12. Die Varianz reichte von gleichbleibend zum basalen Expressionsniveau bis zu Steigerungen auf das Doppelte der Ausgangskonzentration bereits in einem Tier an Tag vier und in einer Maus an Tag 12 nach Infektion. In diesem Zeitverlauf lag ECE-1c in C57Bl/6 Tieren stets deutlicher höher als in A.BY Tieren, von initial vierfach über doppelte Mengen vier und acht Tage p.i. bis etwa 1,5fach am Tag 12. Von Tag 12 zu Tag 28 zeigte A.BY einen Anstieg auf das Doppelte der Expression von Tag 12 und das Dreifache der basalen Menge. C57Bl/6 hingegen blieb nahezu

unverändert und lag am Tag 28 unterhalb des basalen Expressionsniveaus mit einem Viertel geringerer Ausprägung als an Tag null. Die Schwankungsbreite war in diesem Modell minimal. A.BY wies dagegen eine breite Varianz von abfallend, mit Annäherung an das Ausgangsniveau, über gleichbleibend zum Tag 12 bis mehr als vierfach verglichen mit Tag null auf. Durch den Anstieg der Isoform im chronischen Modell zum Ende der subakuten und in der chronischen Phase befand sich die Expression beider Stämme vier Wochen nach Infektion auf gleichem Niveau. In nichtinfizierten Tieren, sowie in der akuten und einem Teil der subakuten Phase der Myokarditis wiesen die Mäuse, deren Erkrankung folgenlos ausheilt, eine deutlich höhere Expression von Isoform c auf.

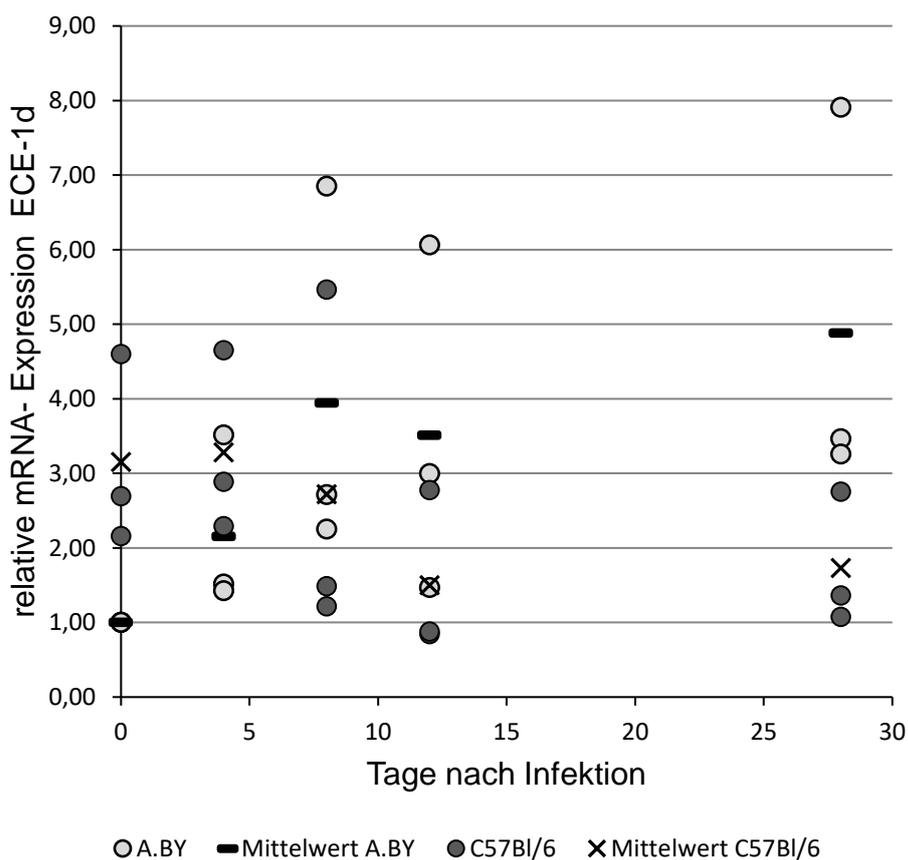


Abbildung 18: Relative mRNA-Expression ECE-1d akut gegen chronisch

x-Achse: Myokarditisverlauf (Tag0 bis Tag28 nach Infektion); y-Achse: relative RNA-Expression (2^{-ddCt}) ECE-1d ermittelt mit der ddCt Methode; hellgraue Kreise: A.BY Tiere; schwarzer Balken: Mittelwert A.BY; dunkelgraue Kreise: C57Bl/6 Tiere; x: Mittelwert C57Bl/6; A.BY Tag 0 = 1 gesetzt

C57Bl/6 Mäuse hatten eine dreifach höhere basale Expression, mit einer Varianz von doppelter bis vierfacher Menge von ECE-1d in A.BY.

Isoform d wies im chronischen Modell die größte Expressionssteigerung von Tag null bis Tag 28 auf und beinhaltete dabei die größte Streuungsbreite.

Von Tag null bis Tag vier nach Infektion zeigte A.BY eine Verdoppelung, mit Schwankungen von gleichbleibend bis zu einer Verdreifachung der basalen Expression, während C57Bl/6 in diesem Infektionsabschnitt nahezu konstant blieben. ECE-1d lag in C57Bl/6 noch deutlich über der Menge in A.BY. In der Phase von Tag vier bis Tag acht kam es zu einer weiteren Expressionssteigerung von Isoform d in A.BY auf das Doppelte von Tag vier und somit das Vierfache der basalen Expression mit einer Streuungsbreite von konstanten Werten zu Tag vier bis zu einer Verdreifachung und einer Steigerung um den Faktor sechs zum basalen Expressionsniveau. Im akuten Mausmodell zeigte sich im Mittel ein leichter Abfall, jedoch auch hier mit deutlichen Schwankungsbreiten von einem Absinken auf ein Drittel der basalen Expression bis zu einer leichten Steigerung um ein Drittel der Ausgangskonzentration. Durch die Steigerung im chronischen und den beginnenden Abfall im akuten Modell kehrte sich bereits hier das Mengenverhältnis dieser Isoform in den Mausstämmen um. Im weiteren Verlauf von Tag acht bis Tag 12 wiesen A.BY Mäuse konstante Werte auf mit einer Varianz von abfallend nahe dem Ausgangsniveau bis zu einer Steigerung auf das Fünffache desselben. C57Bl/6 Tiere reagierten hingegen mit einem weiteren Absinken auf die Hälfte von Tag 12 bis auf ein Drittel der basalen Expression. Durch dieses Absinken in C57Bl/6 bei konstanten Werten in A.BY lag ECE-1d in A.BY in 2,5facher Konzentration der Isoform von C57Bl/6 12 Tage nach Infektion vor. Verglichen mit Tag 12 blieb ECE-1d zum Tag 28 im akuten Modell konstant. A.BY Mäuse wiesen in dieser Phase der Myokarditis einen erneuten Anstieg mit einer Expressionssteigerung um den Faktor 1,5 auf das etwa Fünffache des Ausgangsniveaus, mit Streuung von Verdreifachung bis zu einer Steigerung um den Faktor sieben, verglichen mit der basalen Menge auf. Dadurch zeigte sich in dieser Isoform ebenfalls eine Umkehr der Expression von einem initial dreifachen Unterschied zugunsten C57Bl/6, mit dem Wendepunkt bereits in der frühen subakuten Phase hin zugunsten A.BY. Vier Wochen nach Infektion bestand die Differenz der Expressionen der Mausmodelle von drei, wobei A.BY hier in dreifacher Höhe von C57Bl/6 lag.

3.7 präproET-1-mRNA-Expression im Verlauf der Myokarditis

In der sich anschließenden Analyse interessierte die kardiale Expression der präproET-1 mRNA im Krankheitsverlauf und das Verhältnis der basalen Expression dieser in den unterschiedlichen Mausmodellen, da big ET-1 das Substrat für ECE-1 ist.

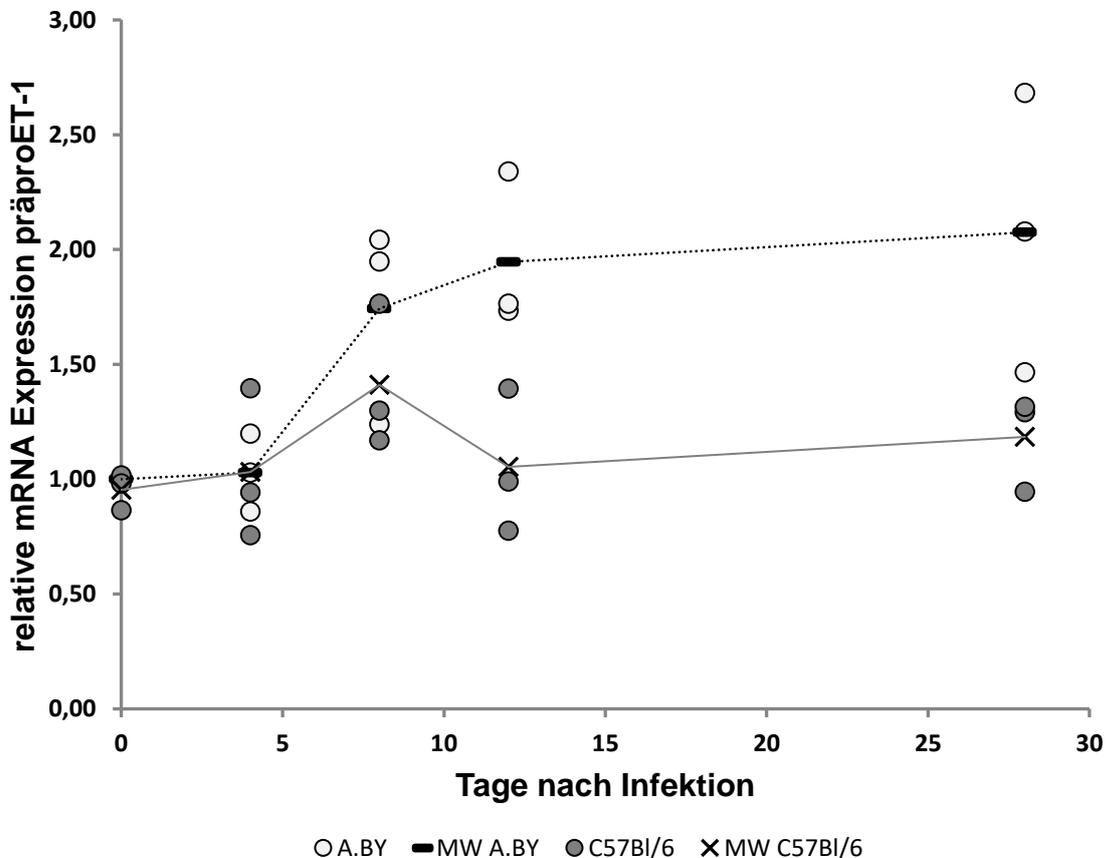


Abbildung 19: Relative Expression der präproET-1 mRNA im Myokarditisverlauf in A.BY und C57BL/6

y-Achse: relative Expression (2^{-ddCt}) von präproET-1 ermittelt mit der ddCt Methode; x-Achse: Myokarditisverlauf (Tag0 bis Tag28 nach Infektion); A.BY (helle Kreise), Balken: Mittelwert A.BY; C57BL/6 (dunkelgraue Kreise), Kreuz: Mittelwert C57BL/6; A.BY Tag 0 = 1 gesetzt; Die Punkte stellen die Werte der einzelnen Tiere dar, die Linien zeigen Tendenzen durch Interpolation der Werte

Die nicht infizierten Tiere des chronischen Modells (A.BY Tag 0) wurden =1 gesetzt und Tag vier bis Tag 28 von A.BY sowie Tag 0 bis Tag 28 von C57BL/6 darauf bezogen. Zur Veranschaulichung der Werte erfolgte hier eine Interpolation dieser.

Die nach CVB3-Infektion zur Chronifizierung neigenden A.BY Mäuse wiesen bis Tag vier zunächst keine Expressionsänderung von präproET-1 auf. Sie zeigten im weiteren

Verlauf insbesondere zum Tag acht nach Virusinfektion in zwei von drei Tieren einen Anstieg bis auf das zweifache von Tag null, ein Tier zeigte einen konstanten Wert zum Tag vier. Von Tag acht bis Tag 12 nach Infektion lagen zwei Mäuse minimal unterhalb des Mittelwertes, eine deutlich oberhalb. Die initiale Verdoppelung der Expression blieb in dieser Phase stabil. Vier Wochen nach Infektion mit dem Virus differierten die Werte sehr stark. Eine Maus wies einen Abfall der präproET-1 Konzentration auf, unter die Hälfte von Tag 12. Eine Maus zeigte einen konstanten Wert zum Tag 12 und in einer Maus fand sich, verglichen mit Tag 12, eine leichte Steigerung der Konzentration für präproET-1 auf das 2,75fache der Ausgangskonzentration, wobei keine der Konzentrationsänderungen statistisch signifikant war. A.BY Tiere zeigten somit im Mittel eine Hochregulation von präproET-1 ab Tag acht nach CVB3 Infektion, welche bis vier Wochen nach Infektion nachweisbar war.

Im akuten Mausmodell war keine wesentliche Expressionsänderung detektierbar. Vier Wochen nach Infektion waren die Mengen konstant niedrig entsprechend der basalen Expression.

Im direkten Vergleich differierte die basale präproET-1-Konzentration in den Kontrolltieren nicht. Die relative Konzentration von präproEndothelin-1 in den C57Bl/6 Mäusen lag ab Tag acht nach CVB3 Infektion unter den Werten der A.BY Tiere. Aus der initial nahezu identischen Expressionsmenge von präproET-1 in beiden Stämme zeigte sich eine differierende Entwicklung mit Beginn in der subakuten Phase. 12 Tage bis vier Wochen nach Infektion entwickelten die A.BY Mäuse neben der Verdoppelung ihrer Expression zum Tag null diese ebenfalls im Vergleich zu C57Bl/6 Tieren. Das heißt: zum Ende der subakuten und im Verlauf der chronischen Phase der Myokarditis lag die präproET-1 Expression in den A.BY Tieren in doppelter Menge von C57Bl/6 Mäusen vor. Statistisch signifikante Expressionsunterschiede fanden sich in dieser Analyse nicht.

4 Diskussion

4.1 ECE-1 und ET-1 als unterstützender Faktor in der Pathophysiologie kardialer Erkrankungen

Die Analyse des Verhaltens der Isoformen des für die Endothelinsynthese notwendigen Schlüsselenzyms ECE-1 im murinen Myokarditismodell war der Ansatz dieser Studie. Untersuchungen haben in der Vergangenheit einen Zusammenhang von Endothelin-1 und seinen Vorläuferproteinen mit der Pathophysiologie kardialer Erkrankungen beschrieben. Durch seine inotropie- und chronotropiesteigernden Effekte kommt es infolge einer langfristigen ET-1 Erhöhung zu einer Hypertrophie des Herzens (Ito et al., 1991 und 1993). Erhöhte ET-1 Titer waren auch in Patienten mit akutem Myokardinfarkt nachweisbar (Stewart et al., 1991). Omland et al. postulierten 1994 die Abhängigkeit der Langzeitüberlebensrate nach einem solchen Infarkt von der Plasmaspiegelhöhe von ET-1. Pieske et al. (1999) und Serneri et al. (2000) sahen die Steigerung des Peptides in Fällen der humanen dilatativen Kardiomyopathie. Ono et al. und Petkova et al. fanden eine ET-1 Überexpression in viralen und parasitären Myokarditiden bei Mäusen. Auch für ECE-1 waren erhöhte Titer in diesen Erkrankungen eruiert. Wie etwa bei Ergul et al., die 2000 in Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie eine vermehrte Expression von ECE-1 nachweisen konnten. Ono et al. detektierten in DBA/2 Mäusen, die infolge viraler Infektion eine Myokarditis entwickeln die in eine dilatative Kardiomyopathie übergeht, ebenfalls gesteigerte ECE-1 mRNA Konzentrationen im Myokard.

Zum Beginn dieser Arbeit lag keine Studie vor, in der in einem vergleichbaren nicht chronifizierenden Mausmodell das Verhalten der ECE-1 Isoformen untersucht worden war. Als Gegenüberstellung verwendeten wir den C57BL/6 Stamm als akutes Myokarditismodell, das folgenlos ausheilt.

mRNA von ECE-1a-d war hier in nicht infizierten A.BY und C57BL/6 Mäusen und im Verlauf des Krankheitsprozesses zu jedem Zeitpunkt nachweisbar. Eine Voraussetzung für mögliche therapeutische Ansätze.

4.2 Histologische stammspezifische Unterschiede während des Myokarditisverlaufes

Die infizierten Mäuse entwickelten alle eine Inflammation. Die A.BY Tiere wiesen zu Beginn der subakuten Phase der Erkrankung am Tag vier p. i. kleine Myozytolysen und wenige kleine Herde an Entzündungszellen auf, welche sich im weiteren Krankheitsverlauf zu großflächigen Nekrosen und massiven Entzündungszellinfiltraten ausweiteten. Ein ähnliches Bild zeigten EMCV infizierte DBA/2 Mäuse bei Ono et al., 1999.

Ein wichtiger möglicher Aspekt des progredienten Entzündungsprozesses in diesen Tieren ist das anhaltende Infiltrat als Erregerreservoir selbst. Szalay et al. detektierten 2006 in CVB3 infizierten A.BY Mäusen vier Wochen nach Infektion noch virale RNA. Die gefundene virale RNA muss nicht selbst infektiös sein, sondern trägt durch Präsentation von RNA-Fragmenten über den MHC-Komplex zur Aufrechterhaltung der Entzündung bei. Klingel et al. detektierten in mit CVB3 infizierten SWR/J H2-q Mäusen in der subakuten und chronischen Phase des Krankheitsprozesses u.a. zirkulierende Lymphozyten als Quelle eines viralen RNA-Vorrates.

Virale RNA-Analysen von CVB3 infizierten C57Bl/6 Tieren zeigten bei Szalay et al. keinen RNA-Nachweis über 16 Tage nach Infektion.

In den C57BL/6 Mäusen dieser Arbeit waren vier Tage nach CVB3-Infektion ebenfalls einzelne Myozytolysen sichtbar, jedoch in geringerem Ausmaß verglichen mit A.BY. Zudem stieg diese Inflammation nur bis zum achten Tag p.i. an. Hier erreichte diese nur maximal Grad 2, der in A.BY an Tag vier zu sehen war. Anschließend waren nur noch kleine Fibroseherde und vereinzelte Entzündungszellinfiltrate nachweisbar, die einer noch erhöhten Zahl von Abwehrzellen als Schutzfunktion entsprechen könnte.

Die Graduierung erfolgte im Tübinger Labor, so dass hier eine Interobservervariabilität nicht auszuschließen ist.

4.3 Differierende ECE-1-Isoformenkonzentrationen im Krankheitsverlauf als möglicher Baustein der Chronifizierung

Nach histologischer Auswertung der Herzen mit deren unterschiedlichen Verläufen und Entzündungsausmaßen sowie dem Nachweis der ECE-1-Isoformen in beiden Stämmen, folgte die quantitative Analyse der ECE-1-Isoformenkonzentrationen mittels qPCR und ddCt-Berechnung. Die Gelelektrophorese ließ bereits Tendenzen erkennen, detektierte jedoch noch keine eindeutigen Expressionsunterschiede.

A.BY Mäuse wiesen keine wesentliche Konzentrationsänderung der Isoform a im Krankheitsverlauf auf. Isoform b zeigte einen Anstieg in der frühen Phase zum Tag vier und etwas langsamer weiter in der subakuten bis chronischen Phase. Isoform c stieg nach zunächst konstanten Werten bis Tag 12 zum Tag 28 deutlich an und die Analyse von ECE-1d ergab einen kontinuierlichen Anstieg durch den gesamten Krankheitsverlauf bis vier Wochen nach Infektion.

In drei von vier Isoformen war zu nahezu allen Zeitpunkten eine Varianz der Werte im Verhältnis von zwei zu eins sichtbar, bei einer Fallzahl von $n=3$.

DBA/2 Tiere neigen ähnlich A.BY zur Chronifizierung der Myokarditis nach Virusinfektion. Ono et al. untersuchten 1999 im murinen Myokarditismodell in EMCV infizierten DBA/2 Mäusen gesamt ECE-1 mRNA im Verlauf und fanden ab Tag vier einen Anstieg von ECE-1 mRNA, mit einem Maximum am Tag 7 p. i. im Myokard, der bis Tag 14 p. i. nachweisbar war. Da die Mäuse häufig vorher starben war eine Analyse darüber hinaus nicht möglich. Im Falle der Bestätigung der Verläufe in dieser Arbeit in A.BY mit erhöht bleibenden Werten wäre das Verhalten verglichen mit DBA/2 Tieren ähnlich obgleich in geringerer Expression.

Der Verlauf der in unserem Modell bis vier Wochen nach Infektion erhöht bleibenden Werte von EC-1b, c und d lässt sich als möglicher Baustein des Chronifizierungsprozesses werten. Isoform b und d scheinen bereits in der frühen Entzündungsphase aktiviert zu werden, während Isoform c erst in der späten subakuten und in der chronischen Phase am Inflammationsprozess mitwirkt.

Die genauen Lokalisationen der Transkriptioninduktion durch diese ECE-1 Isoformen ist noch ungeklärt. Denkbare Positionen sind die infiltrierenden oder kardialen Zellen selbst.

Die hier gesehene konstante Menge von Isoform a im Krankheitsverlauf bis 28 Tage nach Infektion ist vergleichbar mit den Daten von Zolk et al., die 1999 in Patienten mit dilatativer

Kardiomyopathie ebenfalls keine Konzentrationsänderung von Isoform a, jedoch auch nicht von b/c nachweisen konnten. Sie verglichen dabei Herzen von NYHA-IV Patienten mit Gesunden. ECE-1b/c wurden zusätzlich untersucht und als unverändert erfasst. Eine Beurteilung des Verlaufes der Isoformen während des gesamten Krankheitsprozesses erfolgte dort nicht. ECE-1d wurde nicht untersucht.

Der Verlauf in C57BL/6 Mäusen wick verglichen mit A.BY ab. Hier fanden sich konstante, im Krankheitsprozess tendentiell sinkende Konzentrationen, die vier Wochen nach Virusinfektion nahezu auf dem Niveau der Ausgangswerte lagen. Die Begründung für dieses Verhalten liegt in der höheren basalen Expression (siehe hierzu 4.4.), so dass die Tiere zwar eine Myokarditis nach CVB 3 Infektion entwickeln, welche jedoch wesentlich milder verläuft als in A.BY und folgenlos ausheilt.

Die Analyse der relativen Expression der Stämme zueinander zeigte eindeutig unterschiedliche Verläufe. Während Isoform b und d initial deutlich höhere Werte in C57Bl/6 als in A.BY aufwiesen kehrte sich diese Korrelation im Krankheitsverlauf vollständig um, wobei ECE-1d diesen Wandel bereits am Tag acht beschrieb, ECE-1b dagegen erst am Tag 12. Das Expressionsniveau von Isoform a hingegen blieb in C57Bl/6 nach den überlegenen Werten nicht infizierter Tiere bis vier Tage nach Virusinfektion deutlich über denen von A.BY. Ab Tag acht näherten sich die Mengen an und blieben auf nahezu identischem Niveau. Isoform c wiederum war über den gesamten frühen Myokarditisverlauf bis in die späte subakute Phase hinein in C57Bl/6 klar dominierend gegenüber A.BY. Erst vier Wochen nach Infektion zeichnete sich bei dieser Isoform eine sichtbare Annäherung der Werte ab.

Geht man davon aus, dass das Isoformenexpressionsniveau des akuten Modelles das Maß impliziert, welches an der Initiierung einer effektiven Immunantwort mitwirkt und betrachtet deren nahezu konstanten Verlauf während des Krankheitsprozesses, dann zeigt sich, dass A.BY erst verzögert dieses Niveau erreicht. Isoform b lag am Tag vier in etwa gleicher Expression zu C57Bl/6 vor, ECE-1d erst zwischen Tag vier und acht und ECE-1c sogar erst in der chronischen Phase der Infektion. Aus Sicht der ECE-1 Isoformen benötigt das chronische Modell somit zum einen länger, um eine effektive Immunantwort zu initiieren; zum anderen könnte der deutliche Anstieg über dieses maßgebende Expressionsniveau, insbesondere von Isoform b und d, über die subakute

Phase hinaus bis weit in die chronische Phase, eine prolongierte Inflammation begünstigen und dadurch zur Chronifizierung der Myokarditis beitragen.

Eine eindeutige Aussage hinsichtlich des Verhaltens der Isoformen im Krankheitsverlauf läßt sich an dieser Stelle nicht treffen, da die Ergebnisse aufgrund der geringen Fallzahl nicht signifikant waren. Um die vorliegenden Verläufe zu unterstreichen oder den Fokus auf die hier als Ausreißer definierten Daten zu richten sollte die Fallzahl in nachfolgenden Studien deutlich umfangreicher gewählt werden.

Für eine Fallzahlplanung muss im Vorfeld eine Annahme über die Größe des Unterschiedes getroffen werden (Daniela Keller, 2014). Diese Größe kann in der Effektstärke, z.B. Cohens d gemessen werden. Sie berechnet sich aus den Mittelwerten zweier Gruppen und deren Standardabweichungen.

$$d = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{(s_1^2 + s_2^2)/2}}$$

Abbildung 20: Effektstärke Cohens d

(Daniela Keller: Fallzahlberechnung für den Vergleich von zwei Gruppen (14.7.2014),URL:<http://www.statistik-und-beratung.de/2014/07/fallzahlberechnung-fuer-den-vergleich-von-zwei-gruppen>,(Stand: 21.01.2017)

d= 0,2 entspricht einem kleinen Effekt, d= 0,5 einem mittleren und d= 0,8 einem großen Effekt

Beispiel: Beträgt der Mittelwert (MW) der ersten Gruppe eins, der MW der zweiten Gruppe drei, die Standardabweichung der ersten nimmt den Wert eins an und die der zweiten Gruppe den Wert drei, dann ergibt sich daraus eine Effektstärke d von 0,89, was einem großen Effekt entspricht.

Des Weiteren werden vorab das Signifikanzniveau α und die Teststärke Power (1- β) festgelegt. α umfaßt die maximal zulässige Irrtumswahrscheinlichkeit eine Nullhypothese abzulehnen, obwohl sie richtig ist (Fehler 1. Art). Es wird im Normalfall ein α von 0,05 bestimmt. Bei einem α von 0,05 darf dieser Fehler nicht mehr als 5% betragen.

Die Teststärke Power ist die Wahrscheinlichkeit, mit der ein Signifikanztest für eine Alternativhypothese, die richtig ist, entscheidet. Sie wird definiert als $1-\beta$. β ist dabei die Wahrscheinlichkeit, einen Fehler 2. Art zu begehen, das heißt die Nullhypothese wird bestätigt obgleich die Alternativhypothese korrekt ist. $1-\beta$ entspricht der Wahrscheinlichkeit, einen Fehler 2. Art zu vermeiden.

Unter der Verwendung des Programmes G-Power mit den Voreinstellungen der Testfamilie t-Test, zweiseitig messend, der Vorgabe eines Signifikanzniveaus α zwischen zwei unabhängigen Gruppen von $\alpha=0,05$ und einer Power von 0,8 sowie der Effektstärke d von 0,89, ergibt sich eine Fallzahl von 21. Das bedeutet, 21 Tiere pro Gruppe müssen getestet werden, um eine Expressionssteigerung von eins auf drei signifikant nachweisen zu können.

4.4 Aufregulation des ET-1 Systems getragen durch ECE-1d und b?

Betrachtet man die statistische Analyse der Isoformen und die Schwankungsbreiten der einzelnen Messwerte bei $n=3$ wäre jedoch auch zu diskutieren, welches ermittelte Expressionsniveau als ausschlaggebend zu erachten ist. Eine restriktivere Wertung dessen unter Einbeziehung des methodischen Rauschens bei großer Streuung legt die Möglichkeit nahe, dass erst $\Delta\Delta Ct$ Werte mit einer Differenz von 3-4 als relevante Änderungen so erachten sein könnten. Aus diesem Blickwinkel wäre zu schlußfolgern, dass die in A.BY nachweisbare Aufregulation des ET-1 Systems in der subakuten und chronischen Phase der Inflammation nur durch Isoform d und b getragen werden könnte. Wie bei Yang et al (2004), die zeigen konnten, dass eine alleinige kardiale Überexpression von ET-1 durch Aktivierung inflammatorischer Zytokine in der Lage ist, eine progrediente entzündliche murine Kardiomyopathie auszulösen.

Wobei b ab Tag vier und d ab Tag acht Einfluß nehmen.

Die Isoformspezifischen Exone von b und d und deren 5`gelegene regulatorische Abschnitte liegen räumlich nah beieinander (siehe Einleitung ECE-1 Isoformen). In den ECE-1b und d Promotoren sind bislang SP1 und GATA sowie E2F und NF κ B als regulierende Transkriptionssequenzen nachgewiesen worden. Eine Analyse der zugehörigen Transkriptionsfaktoren in diesem Myokarditismodell wäre demnach interessant, um diese These untermauern zu können. Findet sich eine vermehrte

Aktivierung o.g. Transkriptionssequenzen, würde sich daraus, durch eine beispielsweise selektive Blockierung oder Modulierung der Transkriptionsfaktoren oder deren Promotorsequenzen, eine weitere mögliche Therapieoption ableiten.

4.5 Basale Expressionsdifferenzen als günstigere Abwehrstellung

In dieser Studie lag die basale Expression bei allen vier Isoformen in C57BL/6 über den Werten von A.BY. In der statistischen Analyse waren diese Differenzen jedoch aufgrund der Fallzahl n=3 nicht signifikant.

In der Analyse der relativen Expression der Stämme zueinander über den Myokarditisverlauf betrachtet war dieses deutlich höhere Expressionsniveau in den C57Bl/6 Tieren bis Tag vier nach Infektion in drei von vier Isoformen, in ECE-1c sogar bis Tag 12, nachweisbar. Dies könnte eine unmittelbare, effektive Immunantwort bereits zu Beginn der Erkrankung begünstigen oder gar beinhalten und somit eine prolongierte Inflammation, mit pathologischer Entwicklung für den betroffenen Organismus, zielgerichtet unterbinden. Zudem scheint sie nicht schädigend zu sein.

4.6 Der Beitrag von präproET-1 im Rahmen der Entzündungskaskade

Die Untersuchung von präproET-1mRNA zeigte in A.BY Änderungen im Verlauf der Myokarditis. In diesen Mäusen fand sich ein Anstieg zum Tag acht p. i.. Die Expression blieb im weiteren Verlauf bis Tag 28 dann nahezu konstant.

Ono et al. untersuchten in EMCV infizierten DBA/2 Mäusen die Expressionsänderung von präproET-1 mRNA im Myokard und fanden ebenso eine Erhöhung in der subakuten Phase der Infektion. Das Maximum war dort am Tag sieben nach Infektion sichtbar. Bei Ono et al. erfolgte vier Wochen nach Infektion keine Analyse, da die Tiere häufig vorher starben.

Zusätzlich zum kardialen analysierten Ono et al. auch das im Plasma vorhandene ET-1 und schlossen aus deren Korrelation, dass das Herz der wesentliche ET-1 Produzent im Krankheitsverlauf sei. Die dort gesehenen früh, bereits fünf Tage nach Infektion, erhöhten ET-1 Titer, als Ausdruck der kardialen ET-1 Produktion, fanden sich in A.BY Mäusen vier Tage nach CVB3 Infektion nicht.

Endothelin-1 wird neben Endothelzellen und Kardiomyozyten durch Entzündungszellen selbst transportiert und sezerniert (Ehrenreich et al., 1990, Sessa et al., 1991).

In der Betrachtung des Infiltrates in der frühen Phase um Tag vier korrelierte dieses nicht mit der zu diesem Zeitpunkt ermittelten präproET-1 Expression. Der weitere präproET-1 Verlauf in A.BY ähnelte dem Verlauf der histologisch sichtbaren Entzündungszellinfiltrationen. Die Tiere hatten am Tag 28 p. i. mehr präproET-1 verglichen mit nicht infizierten Mäusen und jenen ab Tag acht nach Virusinfektion.

Es sind diverse Faktoren bekannt, die auf die ET-1 Produktion anregend wirken, wie beispielsweise Zytokine, Chemokine, kurzfristige Hypoxie und Scherstress. Szalay et al. detektierten in Herzen CVB3 infizierter A.BY Mäuse im Myokarditisverlauf steigende Titer für iNOS neben fallenden Titern für IL-10 und nur verzögert steigende IFN- γ Mengen als Ausdruck einer voranschreitenden Myokardschädigung, die wiederum die ET-1 Sekretion stimuliert und somit anteilig an den steigenden ET-1 Titern ist.

Nach Yang et al. ist bereits die alleinige provozierte Überexpression von ET-1 in transgenen Mäusen fähig, einen Anstieg der inflammatorischen Zytokine im Herzen zu induzieren, der eine entzündliche Kardiomyopathie auslöst, welche unbehandelt zum Tode führt. ET-1 induziert die Fibroblastensynthese (Fujisaki et al., 1995), wirkt zellproliferativ (Hsu & Pfahl, 1998) und moduliert die Extrazellulärmatrix (Chen et al., 2003). Zusätzlich aktiviert es Mastzellen (Uchida et al., 1992) und beeinflusst die

vaskuläre Permeabilität (Helset et al., 1993). Es stimuliert die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Kardiomyozyten (Hayasaki et al., 1996). Finsnes et al. wiesen die Induktion von TNF durch ET-1 in Ratten nach, Stankova die Induktion von IL-6 und Zidovetzki beispielsweise die von IL-8. Seine Freisetzung wird somit durch vielfältige Faktoren im Rahmen eines Inflammationsprozesses begünstigt und gleichzeitig unterhält es selbst weitere wesentliche Schritte im Entzündungsgeschehen.

In C57Bl/6 war in der Analyse von präproET-1mRNA nahezu keine Änderung nachweisbar. Entsprechend war bei Szalay et al. eine starke IL-10 Antwort in der akuten Phase der Myokarditis und keine iNOS über 12 Tage nach Virusinfektion nachweisbar. Vier Wochen nach CVB3-Infektion lag die Menge an präproET-1mRNA nicht unter ihrer Ausgangskonzentration, jedoch annähernd auf basalem Niveau.

Eine differierende basale Expression fand sich zwischen den beiden Stämmen nicht. Die divergente Entwicklung des präproEndothelin-1 von A.BY und C57Bl/6 mit Beginn der subakuten Phase unterstützt die These, dass Mäuse des chronischen Modelles erst verzögert eine effektive Antwort im Inflammationsprozess entfalten. Das Persistieren dieser gesteigerten Expression bis weit in die chronische Phase mit, im Vergleich zu C57Bl/6 Tieren, doppelter Menge an präproET-1 untermauert die Behauptung, dass anhaltend erhöhte Endothelin-1 Titer pathologisch wirksam sind und somit zur Chronifizierung der Erkrankung beitragen könnten.

4.7 Alternative Endothelin-1-Synthese und ECE-1-Substrate im

Entzündungsprozess

In der Entwicklungsanalyse von ECE-1-defizienten Mäusen wiesen Yanagisawa et al. 1998 die Bedeutung der ET-1-Synthese durch ECE-2 nach. 2000 erweiterten sie diese Untersuchung durch eine Studie an Mäusen, die weder ECE-1 noch ECE-2 synthetisieren konnten. Darin fanden sie eine Expression von ET-1 und ET-2 entsprechend der von ECE-1 knock out Tieren. Aus diesen Resultaten ergab sich die Schlussfolgerung, dass weitere Proteasen an der Synthese von Endothelin-1 beteiligt sein müssen bzw. die Aufgabe von ECE übernehmen können.

Auch Barker et al. sahen 2000 in glatten Muskelzellen von Pulmonalarterien bei Rindern, welche für eine spezifische Inhibition der Genexpression mit einem Phosphorothioat modifizierten Antisense-Oligonukleotid zu ECE-1c behandelt wurden, neben dem Absinken der ECE-1c mRNA und der ECE-1-Proteinmenge, dass die Konzentration von ET-1 davon nicht betroffen war.

Meidan et al. konnten 2005 Splicevarianten von ECE-1 b-d detektieren, die ebenfalls ET-1 spalten.

Zolk et al. wiesen in ihren Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie zwar ebenfalls einen Anstieg des Endothelins nach, ebenso Brunner et al. 1996 in Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz. Der Anstieg wurde hier jedoch als eine transiente Antwort diskutiert. Beide führten dies auf eine herabgesetzte Clearance durch Abnahme der Rezeptordichte zurück, denn die ET_b-Menge sank und die Vorläufer für ET-1, präproET-1 und ECE-1, verglichen mit gesunden Herzen, waren unverändert. Zusätzlich beschrieben Zolk et al. eine Desensibilisierung des Rezeptors.

Aus den höheren, basalen mRNA-Konzentrationen der ECE-1-Isoformen im akuten Modell, ergibt sich die Suche nach weiteren Reaktionspartnern von ECE-1. Zum Beginn dieser Arbeit war bislang bekannt, dass ECE-1 beispielsweise in die Synthese von Bradykinin, Substanz P und Neurotensin involviert ist. Bradykinin weist eine histaminähnliche Wirkung auf. Es reguliert den Tonus der glatten Muskulatur und die Gefäßpermeabilität ist somit vasoaktiv. Substanz P wird von Nervenzellen und Leukozyten gebildet und wirkt modulierend auf den Entzündungsverlauf, zudem chemotaktisch und ebenfalls vasodilatativ. Alle drei Peptide sind an der Schmerzverarbeitung und -leitung beteiligt. Neurotensin wirkt zusätzlich temperaturregulierend. All diese Effekte sind bedeutsam für den Verlauf der Inflammation.

C57Bl/6 Mäuse könnten als Ausdruck der bereits nachgewiesenen effektiveren Immunantwort neben durchgehend erhöhten IL-10 Titern, einer frühen IP-10 (interferon-gamma induziertes Protein) und RANTES-Sekretion und einer frühen IL-6 und nur geringen TNF- α -Aktivierung in dendritischen Zellen (Weinzierl et al.) differierende basale Titer für Substanz P und Bradykinin verglichen mit A.BY Tieren aufweisen.

4.8 ET-1 und ECE-1-Isoformen als therapeutischer Ansatzpunkt im

Myokarditismodell

ET-1 kann am Anfang einer Infektion protektiv sein (Zhao et al., 2006). Bei kontinuierlich erhöhten Spiegeln kann es zur Aufrechterhaltung einer Entzündungsreaktion beitragen (Yang et al., 2004) und sich somit schädlich auswirken.

Bislang gibt es unterschiedliche therapeutische Ansätze um auf endothelinassoziierte Erkrankungen einzuwirken. Neben immunmodulatorischen und immunsuppressiven sind bereits auch antivirale Strategien mitunter sehr erfolgreich versucht worden.

Antikörper gegen Endothelinrezeptoren führten bei Sakai et al. in Rattenherzen mit hochreguliertem Endothelinsystem zu einer Verbesserung des Outcomes, der linksventrikulären Dysfunktion und verhinderten Remodellierungsprozesse des Ventrikels. Watanabe et al. zeigten durch Gabe eines ET-1 Antikörpers (AwETN40) in Ratten mit Myokardinfarkt eine Verkleinerung des Infarktareales. Ono et al. stellten bei der Behandlung EMCV infizierter DBA/2 Mäuse mit dem nicht selektiven ET-Rezeptorantagonisten Bosentan eine Verbesserung der Korrelation von Herz- zu Körpergewicht, und damit eine Steigerung der Auswurfleistung und Kontraktilität durch Abnahme des kardialen Volumens, fest, dessen Ausmaß zusätzlich dosisabhängig war. Und auch Yang et al. konnten durch Verabreichung eines kombinierten ET-Rezeptorantagonisten eine längere Überlebenszeit von transgenen Mäusen beobachten, die eine angeborene kardiale Überexpression von ET-1 aufwiesen.

Direkt antivirale Strategien wurden mit Substanzen, die durch Bindung des Viruscapsides die Virusinternalisation selbst hemmen (z.B. Pleconaril), jene die das virale Protein selbst inaktivieren (NO-Metoprolol, Ribavirin) und Substanzen die das zelluläre Protein hemmen, welches für die Virusreplikation benötigt wird erfolgreich realisiert (Fechner et al., 2011). Auch lösliche Rezeptoranaloga wie sCAR-Fc binden das Viruskapsid und verhindern die Virusaufnahme (Pinkert et al., 2009).

siRNAs, short hairpin RNAs und Antisense- Oligonukleotide binden an das Virusgenom und führen zu seiner Degradierung, wobei in vivo Versuche dazu virale Vektoren als Vehikel benutzen (Kim et al., 2007).

Lim et al. erreichten 2006 eine Neutralisation der coxsackievirusinduzierten Myokarditis in Balb/c Mäusen durch eine Änderung des Coxsackie- und Adenovirus Rezeptor (hCAR-hDAF:Fc).

Interferone (IFN α , β , γ) sind hier ebenfalls antiviral und immunmodulatorisch wirksam (Wang et al., 2007). Und auch mesenchymale Stammzellen besitzen antivirale Aktivität in CVB3-Infektionen. So kann beispielsweise durch deren Transplantation ein niedrigeres CAR-Expressionslevel erreicht werden, welches zu geringerer Apoptose und reduziertem oxidativen Stress führt (van Linthout, 2010).

ECE-1 kann einen kurzen regulierenden Effekt haben, bleibt es erhöht, könnte es an der Chronifizierung beteiligt sein.

Entwickelte ECE-1 Inhibitoren sind neben dem seit langem bekannten Phosphoramidon beispielsweise der von Shetty et al. 1998 in Rattennieren getestete, rekombinante humane ECE-1-Inhibitor CGS 31447. Das von De Lombaert und Jeng et al. 2000 beschriebene CGS26303 führt bei langfristiger Gabe nach Mulder et al. 2004 zu einer Verbesserung der kardialen Funktionen wie Vor- und Nachlast und vermindert bereits entstandene kardiale Schäden. Im Verlauf wurde CGS26303 durch Jeng, Trapani und De Lombaert et al. (2000) weiter modifiziert zu CGS34043 und CGS35066 als selektiveren Inhibitoren.

Ahn et al. konnten 1998 durch PD069185, ein dreifach substituiertes Chinazolin in gelösten Membranfraktionen von CHO-Zellen, welche dauerhaft mit humaner ECE-1cDNA transfiziert sind, ECE-1 spezifisch hemmen.

Barker et al. erreichten 2000 durch die Verwendung von Phosphorothioat Antisense- ODN (Oligodeoxynucleotid) zu ECE-1c in den glatten Muskelzellen von Rinderpulmonalarterien ein Absinken der ECE-1c mRNA und des ECE-1 Proteinlevels.

Die Erkennung von bigET-1 durch ECE-1 an der beeinflussbaren Position 1 und dem C Terminal machten sich Takayanagi et al. 1998 zunutze, um die Hemmung von ECE-1 durch bigET-1 Analoga an präparierten Membranen von humanen CHO-K1-Zellen, welche ECE-1 exprimieren, nachzuweisen.

SOL1 stellt nach Nelissen et al. 2012 einen weiteren ECE-1 und NEP-Inhibitor dar.

Auch Indol-basierte Inhibitoren, insbesondere das oral applizierte Derivat 6 zeigte in dem murinem Mausmodell mit akutem Myokardinfarkt bei Brands et al. 2006 kardioprotektive Effekte.

Die ECE-1 Isoformen b, c und d stellen durch die in dieser Studie gesehenen Änderungen der mRNA eine mögliche weitere Ebene für therapeutische Ansätze dar, sofern sich diese auf Proteinebene ebenfalls nachweisen lassen. Ebenso denkbar ist die Intervention auf der Ebene der Promotoren von ECE-1b und d zur Regulierung der verantwortlichen Transkriptionsfaktoren.

5 Diskussion der angewandten Methoden

Verwendet wurden Kits, die standardisierte und reproduzierbare Vorgehensweisen und Voraussetzungen schaffen (RNA Aufreinigung, DNA Verdau, Bioanalyser, Reverse Transkription, PCR, qPCR).

Um eine hohe Ausbeute des instabilen und empfindlichen Bausteines RNA zu erzielen, muss diese vor Kontamination geschützt werden und sollte zügig isoliert werden, was durch die Homogenisierung des gesamten Mausherzens in einem Arbeitsschritt gewährleistet wurde.

Die Qualität und Quantität der RNA wurden durch photometrische Messung und die Analyse im Bioanalyser auf Integrität und Reinheit getestet. Die Messungen zeigten den Grad der Degradierung und keinen Hinweis auf Verunreinigungen. Die extrahierte Menge an RNA war ausreichend, um eine Wiederholung der Datenerhebung durchführen zu können. Mittels Gelelektrophorese der revers transkribierten cDNA konnte durch die parallel mitlaufende RT- die Wirksamkeit des DNA-Verdaus der isolierten RNA ebenfalls bestätigt werden. Das zusätzlich mitamplifizierte Wasser als Negativkontrolle in der Gelelektrophorese und in der folgenden quantitativen PCR konnte mögliche Verunreinigungen ausschließen.

Die real time PCR als quantifizierende Analyse der cDNA stellte mit der SYBR Green Methode die kostengünstigere Variante im Vergleich zu denen, die Sonden erfordern dar. Pipettierfehler werden hierbei durch Dreifachpipettierung auf der 96-well-Platte detektiert. Die direkt anschließende Schmelzkurvenanalyse ermöglicht die zusätzliche Qualitätskontrolle der Primer und zeigte keine Auffälligkeiten. Auch fanden sich keine Unterschiede zwischen den Schmelzkurven der Mausstämmen. Die Standardverdünnungsreihen zur Effizienztestung der Primer in der qPCR erlauben ebenfalls die Qualitätsprüfung und sichern die Reproduzierbarkeit der erhobenen Daten. Der geringe Stichprobenumfang pro Zeitpunkt schränkte die Analyse hinsichtlich Aussagekraft der Verläufe und Statistik ein und ermöglichte nur die Verwendung des Mann Whitney U Tests anstelle des t-Testes.

6 Zusammenfassung

Die Myokarditis als meist virusinduzierte Erkrankung des Herzens kann sowohl einen ausheilenden wie chronifizierenden Verlauf nehmen, Herzversagen und Tod können resultieren. Aufgrund der noch weitgehend unbekanntem, auch anteiligen autoimmunen, Ursachen liegen adäquate Therapien bislang nicht vor.

Es existieren Hinweise darauf, dass das Endothelinsystem in Vertebraten bei diesen inflammatorischen Mechanismen eine Rolle spielen könnte. Bislang nicht untersucht wurde hierbei die Expression der Isoformen von ECE-1.

Um die Entstehung, den Verlauf und mögliche Therapieoptionen von Myokarditis besser verstehen zu können, wurde in der vorliegenden Arbeit die Expression der ECE-1-Isoformen eines akuten ausheilenden mit einem chronischen Mausmodell verglichen. Alle infizierten Tiere entwickelten eine Myokarditis und die mRNA der ECE-1-Isoformen a bis d war durchgehend nachweisbar.

Es wurden Unterschiede in der relativen Expression der ECE-1 Isoformen zwischen beiden Krankheitsmodellen sowohl im Myokarditisverlauf, als auch in deren basaler Expression beobachtet. ECE-1b, c und d werden in A.BY im Infektionsverlauf hochreguliert und das basale Expressionsniveau aller vier Isoformen lag in C57Bl/6 deutlich über dem von A.BY Tieren. Diese waren jedoch aufgrund der zu kleinen Gruppengrößen nicht signifikant.

Die Analyse der präproET-1-Expression zeigte ebenfalls Unterschiede im Krankheitsverlauf in beiden Modellen. In A.BY war eine Hochregulation von präproET-1 ab Tag acht nach Infektion nachweisbar und das Expressionsniveau lag auch drei Wochen später noch über dem der C57Bl/6 Tiere. Diese Resultate waren aufgrund der zu kleinen Gruppengrößen ebenfalls nicht signifikant. Eine differierende basale präproET-1 mRNA Expression konnte nicht gefunden werden.

Diese Ergebnisse könnten einzelne der ECE-1-Isoformen als möglichen ursächliche Bausteine für die Entstehung chronifizierender Verläufe ausweisen und somit eine therapeutische Ebene für die Erforschung adäquater Therapien und immunologisch untermauerter Heilversuche sein.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Endothelin-Spaltungskaskade	16
Abbildung 2: Genebene ECE-1 murin	23
Abbildung 3: Myokardschädigung im Krankheitsverlauf in A.BY und C57BL/6.....	31
Abbildung 4: Ausprägung der Inflammation in A.BY (a-c) und C57BL/6 (d-f)	31
Abbildung 5: RT-qPCR der präproET-1-Standardreihe	50
Abbildung 6: präproET-1 Standardreihe	51
Abbildung 7: 18S-Standardreihe.....	52
Abbildung 8: Dissoziationskurve ECE-1a	53
Abbildung 9: Dissoziationskurve präproET-1	53
Abbildung 10: Dissoziationskurve 18S	54
Abbildung 11: Gelelektrophorese der ECE-1 Isoformenexpression und 18S cDNA im Verlauf der murinen Myokarditis	55
Abbildung 12: Relative mRNA-Expression der ECE-1-Isoformen a und b.....	57
Abbildung 13: Relative mRNA-Expression der ECE-1-Isoformen c und d.....	58
Abbildung 14: Vergleich der basalen ECE-1-Isoformenkonzentrationen	60
Abbildung 15: Relative mRNA-Expression ECE-1a akut gegen chronisch	61
Abbildung 16: Relative mRNA-Expression ECE-1b akut gegen chronisch	62
Abbildung 17: Relative mRNA-Expression ECE-1c akut gegen chronisch	64
Abbildung 18: Relative mRNA-Expression ECE-1d akut gegen chronisch	65
Abbildung 19: Relative Expression der präproET-1 mRNA im Myokarditisverlauf in A.BY und C57BL/6.....	67
Abbildung 20: Effektstärke Cohens d	73

8 Abkürzungsverzeichnis

A.BY	chronisches Mausmodell
Ala	Alanin
AMI	akuter Myokardinfarkt
ANF	antinukleärer Faktor
ANP	atriales natriuretisches Peptid
Arg	Arginin
As	Aminosäure
AwETN40	ET-1 Antikörper
bigEt-1/2/3	Vorläufer von Endothelin-1/2/3
bp	base pairs
bwd	backward
C	Cytosin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	complementary DNA
CD /CD	cluster of differentiation
CGS34043/ 35066/ 26303/ 31447	rekombinante, humane ECE-1 Inhibitoren
CHCL3	Chloroform
CHF	chronic heart failure
Chr	Chromosom
COOH	Carboxygruppe
CVB 3	Coxsackievirus B3
C57Bl/6	akutes Mausmodell
DAG	Diacylglycerol
DCM	dilatative Kardiomyopathie
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
ECE	Endothelin-converting enzym

EMCV	Encephalomyokarditisvirus
ET	Endothelin
ETa, ETb, ETc	Endothelinrezeptorsubtyp a, b und c
ETs	Transkriptionsfaktorfamilie
Fwd	forward
GATA	Transkriptionsfaktorfamilie
GITC	guanidine isothiocyanate Puffer
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie- stimulierender Faktor
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells
ICAM	interzelluläres Adhäsionsmolekül
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IFN	Interferon
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxidsynthe- tase
IP3	Inositoltriphosphat
IP10	Interferon-gamma induziertes Protein
Kb	kilo base
LB	lacto-bactone
Leu	Leucin
Lys	Lysin
MCS	multiple cloning site
MHC	major histokompatibility complex
MOPS	3-(N-morpholinopropanesulfonsäure
mRNA	messenger Ribonukleinsäure

NEP	Neutrale Endopeptidase
NFkB	Transkriptionsfaktor
NH ₂	Aminogruppe
NK-Zellen	natural killer cells
NO	Stickstoffmonoxid
ODN	Oligonucleotid
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	polymerase chain reaction
PD069185	Chinazolin, dreifach substituiert
Phe	Phenylalanin
Pfu	plaque forming unit
p. i.	post infectionem
qPCR	quantitative PCR
RANTES	regulated on activation, normal T cell expressed and secreted
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
siRNA	small interfering RNA
sCAR-Fc	lösliches CAR-Rezeptoranalogen
SOL1	ECE-1 und NEP-Inhibitor
SP1	Transkriptionsfaktor
Thr	Threonin
Th2-Zellen	T-Helferzellen
TNF	Tumornekrosefaktor
TPR	Total peripherer Widerstand
Trp	Trypsin
Tyr	Tyrosin

UV	Ultraviolett
Val	Valin
VP	virales Protein
x-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside

9 Literaturverzeichnis

1. Abassi ZA, Tate JE, Golomb E, Keiser HR. Role of neutral endopeptidase in the metabolism of endothelin. *Hypertension* 1992 Jul;20(1):89-95
2. Ahn K, Sisneros AM, Herman SB, Pan SM, Hupe D, Lee C, Nikam S, Cheng XM, Doherty AM, Schroeder RL, Haleen SJ, Kaw S, Emoto N, Yanagisawa M. Novel selective quinazoline inhibitors of endothelin converting enzyme-1. *Biochem Biophys Res Commun* 1998 Feb 4;243(1):184-190
3. Arai H, Hori S, Aramori I, Ohkubo H, Nakanishi S. Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature*. 1990 Dec 20;348(6303):730-732
4. Arai H, Nakao K, Takaya K, Hosoda K, Ogawa Y, Nakanishi S, Imura H. The human endothelin-B receptor gene. Structural organization and chromosomal assignment. *The J. Biol. Chem.*1993 Feb 15;268(5):3463-3470
5. Aramori I, Nakanishi S. Coupling of two endothelin receptor subtypes to differing signal transduction in transfected Chinese hamster ovary cells. *J Biol. Chem.* 1992 Jun 25;267(18):12468-74
6. Aretz HT, Billingham ME, Edwards WD, Factor SM, Fallon JT, Fenoglio JJ Jr, Olsen EG, Schoen FJ. Myocarditis. A histopathologic definition and classification. *Am J Cardiovasc Pathol* 1987;1 (1):3-14
7. Arinami T, Ishikawa M, Inoue A, Yanagisawa M, Masaki T, Yoshida MC, Hamaguchi H. Chromosomal assignments of the human endothelin family genes: the endothelin-1 gene (EDN1) to 6p23-p24, the endothelin-2 gene (EDN2) to 1p34 and the endothelin-3 gene (EDN3) to 20q13.2-q13.3. *Am. J. Hum. Genet.* 1991 May; 48(5) 990-6
8. Baba T, Kanda T, Kobayashi I. Reduction of cardiac endothelin-1 by angiotensin II type 1 receptor antagonist in viral myocarditis of mice. *Life Sci.* 2000 Jun 23;67(5):587-97
9. Badorff C, Lee GH, Lamphear BJ, Martone ME, Campbell KP, Rhoads RE, Knowlton KU. Enteroviral protease 2A cleaves dystrophin: evidence of cytoskeletal disruption in an acquired cardiomyopathy. *Nat Med* 1999 Mar;5(3):320-6
10. Barker S, Khan N Q, Wood E G, Corder R. Effect of an Antisense Oligodeoxynucleotide to Endothelin-Converting Enzyme-1c (ECE-1c) on ECE-1c mRNA, ECE-1 Protein and Endothelin-1 Synthesis in bovine pulmonary artery smooth muscle cells. *Mol Pharmacol* 2001; 59:163-169
11. Battistini D, D'Orléans-Juste P, Sirois P. Endothelins: circulating plasma levels and presence in other biologic fluids. *Lab. Invest.* 1993 Jun; 68(6):600-28
12. Baynash AG, Hosoda K, Giaid A, Richardson JA, Emoto N, Hammer RE, Yanagisawa M. Interaction of endothelin-3 with endothelin-B receptor is essential for development of epidermal melanocytes and enteric neurons. *Cell.* 1994 Dec30;79(7):1277-1285
13. Bloch KD, Friedrich SP, Lee ME, Eddy RL, Shows TB, Quertermous T. Structural organization and chromosomal assignment of the gene encoding endothelin. *Journal of Biological Chemistry* 1989 Jun 25;264(18):10851-10857
14. Bowles NE, Ni J, Kearney DL, Pauschinger M, Schultheiss HP, McCarthy R, Hare J, Bricker JT, Bowles KR, Tobwin JA. Detection of viruses in myocardial tissues by polymerase chain reaction. Evidence of adenovirus as a common cause of myocarditis in children and adults. *J Am Coll Cardiol.*2003 Aug 6;42(3):466-72
15. Brands M, Ergüden JK, Hashimoto K, Heimbach D, Krahn T, Schröder C, Siegel S, Stasch JP, Tsujishita H, Weigand S, Yoshida NH. Selective indole-based ECE

- inhibitors:synthesis and pharmacological evaluation. *Chem Med Chem* 2006 Jan;1(1):96-105
16. Brunner F, Doherty AM. Role of Et(B) receptors in local clearance of endothelin-1 in rat heart: studies with the antagonist PD 155080 and BQ-788. *FEBS Lett.* 1996 Nov 4;396(2-3):238-242
 17. Carthy CM, Yang D, Anderson DR, Wilson JE, McManus BM. Myocarditis as systemic disease: new perspectives on pathogenesis. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 1997 Dec;24(12):997-1003
 18. Chatterjee NK, Neiman C. Membrane-bound virions of coxsackievirus B4: cellular localization, analysis of the genomic RNA, genome-linked protein, and effect on host macromolecular synthesis. *Arch. Virol.* 1985;84(1-2):105-18
 19. Chen S, Mukherjee S, Chakraborty C, Chakrabarti S. High glucose-induced, endothelin-dependent fibronectin synthesis is mediated via NF-kappa B and AP-1. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2003 Feb;284(2):C263-72
 20. Chow LH, Beisel KW, McManus BM. Enteroviral infection of mice with severe combined immunodeficiency. Evidence for direct viral pathogenesis of myocardial injury. *Lab Invest.* 1992 Jan;66(1):24-31
 21. Clouthier DE, Hosoda K, Richardson JA, Williams SC, Yanagisawa H, Kuwaki T, Kumada M, Hammer RE, Yanagisawa M. Cranial and cardiac neural crest defects in endothelin-A receptor-deficient mice. *Development.* 1998 Mar;125(5):813-824
 22. Cunningham MW, Antone SM, Gulizia JM, Mc Manus BM, Fischetti VA, Gauntt CJ. Cytotoxic and viral neutralizing antibodies crossreact with streptococcal M protein, enteroviruses, and human cardiac myosin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992 Feb 15;89(4):1320-1324
 23. D`Ambrosio A, Patti G, Manzoli A, Sinagra G, Di Lenarda A, Silvestri F, Di Sciascio G. The fate acute myocarditis between spontaneous improvement and evolution to dilated cardiomyopathy: a review. *Heart* 2001;85(5): 499-504
 24. Keller D. Fallzahlberechnung für den Vergleich von zwei Gruppen. In: www.statistik-und-beratung.de. Stand: 14. Juli 2014. URL: www.statistik-und-Beratung.de/2014/07/fallzahlberechnung-fuer-den-vergleich-von-zwei-gruppen/ (letzter Abruf 04.01.2017)
 25. Davenport AP, Morton AJ, Brown MJ. Localization of endothelin-1 (ET-1), ET-2 and ET-3, mouse VIC, and sarafotoxin S6b binding sites in mammalian heart and kidney. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1991;17(7):152-5
 26. De Lombaert S, Blanchard L, Stamford LB, Tan J, Wallace EM, Satoh Y, Fitt J, Hoyer D, Simonsbergen D, Moliterni J, Marcopoulos N, Savage P, Chou M, Trapani AJ, Jeng AY. Potent and selective non-peptidic inhibitors of endothelin-converting enzyme-1 with sustained duration of action. *J Med Chem* 2000 Feb 10;43(3):488-504
 27. De Nucci G, Thomas R, D`Orléans-Juste P, Atunes E, Walder C, Warner TD, Vane VR. Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988 Dec;85(24):9797-800
 28. Denault JB, Claing A, D`Orléans-Juste P, Sawamura T, Kido T, Masaki T, Leduc R. Processing of proendothelin-1 by human furin convertase. *FEBS Lett* 1995 Apr 10;362(3):276-80
 29. Doherty PC, Zinkernagel RM. T-cell-mediated immunopathology in viral infections. *Transplant Rev.* 1974;19(0):89-120
 30. Dorfman AM, Wilson DB, Bruns GAP, Orkin SH. Human Transcription Factor GATA-2. *Journal of Biol. Chem.* 1992;267(2):1279-1285

31. Ehrenreich H, Anderson RW, Fox CH, Rieckmann P, Hoffmann GS, Travis WD, Coligan JE, Kehrl JH, Fauci AS. Endothelins, peptides with potent vasoactive properties, are produced by human macrophages. *The Journal of experimental medicine* 1990 Dec 1;172(6):1741-1748
32. Eckman EA, Watson M, Marlow L, Sambamurti K, Eckman CB. Alzheimer's disease beta-amyloid peptide is increased in mice deficient in endothelin-converting enzyme. *J. Biol. Chem.* 2003 Jan 24;278(4):2081-2084
33. Emoto N, Yanagisawa M. Endothelin-converting enzyme-2 is a membrane-bound, phosphoramidon-sensitive metalloprotease with acidic pH optimum. *J of Biol. Chem.* 1995 Jun 23;270(25):15262-15268;
34. Ergul A, Grubbs AL, Zhang Y, Spinale FG. Selective upregulation of endothelin converting enzyme-1a in the human failing heart. *J Card Fail.* 2000 Dec;6(4):314-20
35. Fareh J, Touyz RM, Schiffrin EL, Thibault G. Endothelin-1 and angiotensin II receptors in cells from rat hypertrophied heart. Receptor regulation and intracellular Ca²⁺ modulation. *Circ Res.* 1996 Feb;78(2):302-11
36. Fechner H, Pinkert S, Geisler A, Poller W, Kurreck J. Pharmacological and biological antiviral therapeutics for cardiac coxsackievirus infections. *Molecules* 2011 Oct 11;16(19):8475-8503
37. Finsnes F, Lyberg T, Christensen G, Skyønsberg OH. Effect of endothelin antagonism on the production of cytokines in eosinophilic airway inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2001 Apr;280(4):L659-65
38. Firth JD, Ratcliffe PJ. Organ distribution of the three rat endothelin messenger RNAs and the effects of ischemia on renal gene expression. *J Clin Invest.* 1992 Sep;90(3):1023-31
39. Fujisaki H, Ito H, Hirata Y, Tanaka M, Hata M, Lin M, Adachi S, Akimoto H, Marumo F, Hiroe M. Natriuretic peptides inhibit angiotensin II-induced proliferation of rat cardiac fibroblasts by blocking endothelin-1 gene expression. *J Clin Invest.* 1995 Aug;96(2):1059-65
40. Fukuroda T, Fujikawa T, Ozaki S, Ishikawa K, Yano M, Nishikibe M. Clearance of circulating endothelin-1 by ETB receptors in rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994 Mar 30;199(3):1461-5
41. Funke C, Farr M, Werner B, Dittmann S, Überla K, Piper C, Niehaus K, Horstkotte D. Antiviral effect of Bosentan and Valsartan during coxsackievirus B3 infection of human endothelial cells. *Journal of Gen. Virology.* 2010,91, 1959-1970
42. Funke-Kaiser H, Bolbrinker J, Theis S, Lemmer J, Richter CM, Paul M, Orzechowski HD. Characterization of the c-specific promoter of the gene encoding human endothelin-converting enzyme-1 (ECE-1). *FEBS Lett.* 2000 Jan 28;466(2-3):310-316
43. Gatmaitan BG, Chason JL, Lerner AM. Augmentation of the virulence of murine coxsackie-virus B-3 myocardopathy by exercise. *J Exp Med* 1970;131(6):1121-36
44. Giaid A, Michel RP, Stewart DJ, Sheppard M, Corrin B, Hamid Q. Expression of endothelin-1 in lungs of patients with cryptogenic fibrosing alveolitis. *Lancet.* 1993 Jun19;341(8860):1550-1554
45. Giesecke J. The long-term prognosis in acute myocarditis. *Eur Heart J* 1987; 8: 251-253
46. Godeny, EK., Gauntt CJ., Murine natural killer cells limit coxsackievirus B3 replication. *J Immunol.* 1987 Aug 1;139(3):913-8

47. Gougeon ML, Laurent-Crawford AG, Hovanessian AG, Montagnier L. Direct and indirect mechanisms mediating apoptosis during HIV infection: contribution to in vivo CD4 T Zell depletion. *Semin Immunol* 1993 Jun;5(3):187-94
48. Grodums E.I., Dempster G.. Myocarditis in experimental Coxsackievirus B3 infection. *Can. J. Microbiol.* 1959 Dec;5:605-615
49. Hasegawa H, Hiki K, Sawamura T, Aoyama T, Okamoto Y, Miwa S, Shimohama S, Kimura J, Masaki T. Purification of a novel endothelin-converting enzyme specific for big endothelin-3. *FEBS Lett.* 1998 May 29;428(3):304-8
50. Hayasaki Y, Nakajima M, Kitano Y, Iwasaki T, Shimamura T, Iwaki K. ICAM-1 expression on cardiac myocytes and aortic endothelial cells via their specific endothelin receptor subtype. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996 Dec 24;229(3):817-24
51. Haynes WG, Webb DJ. Contribution of endogenous generation of endothelin-1 to basal vascular tone. *Lancet* 1994 Sep 24;344(8926):852-4
52. Helset E, Kjaeve J, Hauge A. Endothelin-1-induced increases in microvascular permeability in isolated, perfused rat lungs requires leucocytes and plasma. *Circ Shock.* 1993 Jan; 39(1):15-20
53. Henke A, Huber S, Stelzner A, Whitton JL. The role of CD 8+ T lymphocytes in coxsackievirus B3-induced myocarditis. *J. of Virol.* 1995 Nov;69(11):6720-6728
54. Herskowitz A, Wolfgram LJ, Rose NR, Beisel KW. Coxsackievirus B3 murine myocarditis: a pathologic spectrum of myocarditis in genetically defined inbred strains. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1987 Jun;9(6):1311-9
55. Hirata Y, Emori T, Euchi S, Kanno K, Imai T, Ohta K, Marumo F. Endothelin receptor subtyp B mediates synthesis of nitric oxide by cultured bovine endothelial cells. *J Clin Invest.* 1993 Apr;91(4):1367-1373
56. Hirata Y, Yoshimi H, Takata S, Watanabe TX, Kumagai S, Nakajima K, Sakakibara K. Cellular mechanism of action by a novel vasoconstrictor endothelin in cultured rat vascular smooth muscle cells. *Biochemical and Biophysical research communications* 1988 Aug 15;154(3):868-875
57. Hoang MV, Tuner AJ. Novel activity of endothelin-converting enzyme: hydrolysis of bradykinin. *Biochem J.* 1997 Oct 1;327(1):23-6
58. Hofstra RM, Valdenaire O, Arch E, Osinga J, Kroes H, Löffler BM, Hamosh A, Meijers C, Buys CH. A loss-of-function mutation in the endothelin-converting enzyme 1 (ECE-1) associated with Hirschsprung disease, cardiac defects, and autonomic dysfunction. *Am. J. Hum. Genet.* 1999 Jan;64(1):304-308.
59. Hosoda K, Hammer RE, Richardson JA, Baynash AG, Cheung JC, Giaid A, Yanagisawa M. Target and natural (piebald-lethal) mutations of endothelin-B receptor gene produce megacolon associated with spotted coat color in mice. *Cell.* 1994 Dec 30;79(7):1267-76
60. Hosoda K, Nakao K, Tamura N, Arai H, Ogawa Y, Suga S, Nakanishi S, Imura H. Organization, structure, chromosomal assignment, and expression of the gene encoding the human endothelin-A receptor. *The Journal of Biol. Chem.* 1992 Sep 15;267(26): 18797-804
61. Hsu JY, Pfahl M. ET-1 expression und growth inhibition of prostate cancer cells: a retinoid target with novel specificity. *Cancer Res.* 1998 Nov 1;58(21):4817-22
62. Hua S.. Targeting sites of inflammation: intercellular adhesion molecule-1as a target for novel inflammatory therapies. *Front Pharmacol.* 2013 Oct 4;4:127. eCollection 2013

63. Huber SA, Lodge PA, Job LP. The Role of Virus and Immune Mediated Cardiocyte Injury in Coxsackievirus B-3 Myocarditis. In: H.-D. Bolte. Viral heart disease. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1984;64-73
64. Huber SA, Pfaeffle B. Differential Th1 and Th2 cell responses in male and female BALB/c mice infected with coxsackievirus group B type 3. *J Virol.* 1994;68(8): 5126-5132
65. Huber SA; Job LP, Auld KR. Influence of sex hormones on Coxsackie B-3 virus infection in Balb/c mice. *Cell Immunol* 1982;67(1):173-9
66. Hunter AR, Turner AJ. Expression and localization of endothelin-converting enzyme-1 isoforms in human endothelial cells. *Exp. Biol. Med.* 2006 Jun;231(6):718-722
67. Hyypiä T, Kallajoki M, Maaronen M, Stanway G, Kandolf R, Auvinen P, Kalimo H. Pathogenetic differences between coxsackie A and B virus infections in newborn mice. *Virus Res* 1993 Jan;27(1):71-8
68. Ikeda S, Emoto N, Alimsardjono H, Yokoyama M, Matsuo, M. Molecular isolation and characterization of novel four subisoforms of ECE-2. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 2002 Apr 26;293(1):421-426
69. Inoue A, Yanagisawa M, Takuwa Y, Mitsui Y, Kobayashi M, Masaki T. The human preproendothelin-1 gene. Complete nucleotide sequence and regulation of expression. *The J. of Biol. Chem.* 1989 Sep 5;264(25):14954-9
70. Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, Kasuya Y, Miyauchi T, Goto K, Masaki T. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989 Apr;86(8):2863-2867
71. Ishikawa T, Yanagisawa M, Kimura S, Goto K, Masaki T. Positive chronotropic effects of endothelin, a novel endothelium-derived vasoconstrictor peptide. *Pflugers Arch.* 1988 Nov;413(1):108-110
72. Ishikawa T. Yanagisawa M, Kimura S, Goto K, Masaki T. Positive inotropic action of novel vasoconstrictor peptide endothelin on guinea pig atria. *Am J Physiol.* 1988 Oct;255 (4 Pt 2):H970-H973
73. Ito M, Nakayama T, Naito S, Matsuo M, Shichijo K, Sekine I. expression of Ets-1 transcription factor in relation to angiogenesis in the healing process of gastric ulcer. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998 May 8;246(1):123-7
74. Ito H, Hirata Y, Hiroe M, Tsujino M, Adachi S, Takamoto T, Nitta M, Taniguchi K, Marumo F. Endothelin-1 induces hypertrophy with enhanced expression of muscle-specific genes in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Circ. Res.* 1991 Jul;69(1):209-215
75. Ito H, Hirata Y, Adachi S, Tanaka M, Tsujino M, Koike A, Nogami A, Murumo F, Hiroe M. Endothelin-1 is an autocrine/paracrine factor in the mechanism of angiotensin II-induced hypertrophy in cultured rat myocytes. *J Clin Invest.* 1993 Jul;92(1):398-403
76. Jeng AY, De Lombaert S, Beil ME, Bruseo CW, Savage P, Chou M, Trapani AJ. Design and synthesis of a potent and selective endothelin-converting enzyme inhibitor, CGS 35066. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000 Nov;36(5):36-39
77. Jones CR, Hiley CR, Pelton JT, Mohr M. Autoradiographic visualization of the binding sites for (125I) endothelin in rat and human brain. *Neurosci Lett.* 1989 Feb 27;97(3):276-9
78. Kamijo R, Shapiro D, Le J, Huang S, Aquet M, Vilcek J. Generation of nitric oxide and induction of major histocompatibility complex class II antigen in macrophages

- from mice lacking the interferon gamma receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*.1993 Jul 15;90(14):6626-30
79. Kandolf R, Sauter M, Aepinus C, Schnorr JJ, Selinka HC, Klingel K. Mechanisms and consequences of enterovirus persistence in cardiac myocytes and cells of the immune system. *Virus research* 1999 Aug;62(2). 149-158
80. Kandolf R, Canu A, Hofschneider PH. Coxsackie B3 virus can replicate in cultured human foetal heart cells and is inhibited by interferon. *J Mol Cell Cardiol*. 1985 Feb;17(2):167-81
81. Kandolf R, Hofschneider PH. Molecular cloning of the genome of a cardiotropic Coxsackie B3 virus: full-length reverse-transcribed recombinant cDNA generates infectious virus in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA*.1985 Jul;82(14):4818-22
82. Karne S, Jayawickreme CK, Lerner MR. Cloning and characterization of an endothelin-3 specific receptor (ETC receptor) from *Xenopus laevis* dermal melanophores. *J Biol Chem*.1993 Sep 5;268(25):19126-33
83. Kawai C, Takatsu T. Clinical and experimental studies on cardiomyopathy. *N Engl J Med*. 1975 Sep 18;293(12): 592-7
84. Kawai C, Matsumori A, Kumagai N, Tokuda M. Experimental Coxsackie virus B-3 and B-4 myocarditis in mice. *Jpn Circ J*. 1978 Jan;42(1):43-7
85. Kawai C. From myocarditis to cardiomyopathy: mechanisms of inflammation and cell death: learning from the past for the future. *Circulation* 1999 Mar 2;99(8):1091-100
86. Kearney MT, Cotton JM, Richardson PJ, Shah AM. Viral myocarditis and dilated cardiomyopathy: mechanisms, manifestations, and management. *Postgrad. Med. J*. 2001; 77(903):4-10
87. Kedzierski RM, Yanagisawa M. Endothelin system: the double-edged sword in health and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2001;41:851-76
88. Kim JY, Chung SK, Hwang HY, Kim H, Kim JH, Nam JH, Park SI. Expression of short hairpin RNAs against the coxsackievirus B3 exerts potential antiviral effects in Cos-7 cells and in mice. *Virus Res* 2007;125:9-13
89. Kishimoto C, Kuribayashi K, Masuda T, Tomioka N, Kawai C. Immunologic behavior of lymphocytes in experimental viral myocarditis: significance of T lymphocytes in the severity of myocarditis and silent myocarditis in BALB/c-nu/nu mice. *Circulation*. 1985 Jun;71(6):1247-54
90. Klingel K, Stephan S, Sauter M, Zell R, McManus BM, Bültmann B, Kandolf R. Pathogenesis of murine enterovirus myocarditis: virus dissemination and immune cell targets. *J. of Virol*. 1996 Dec;70(12): 8888-8895
91. Klingel K, Hohenadl C, Canu A, Albrecht M, Seemann M, Mall G, Kandolf R. Ongoing enterovirus-induced myocarditis is associated with persistent heart muscle infection: quantitative analysis of virus replication, tissue damage, and inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1992 Jan 1;89(1):314-318
92. Kloog Y, Ambar I, Sokolovsky M, Kochva E, Wollberg Z, Bdolah A. Sarafotoxin, a novel vasoconstrictor peptide: phosphoinositide hydrolysis in rat heart and brain. *Science* 1988 Oct 14;242(4876):268-270
93. Klump WM, Bergman I, Müller BC, Ameis D, Kandolf R. Complete nucleotide sequence of infectious Coxsackievirus B3 cDNA: two initial 5' uridine residues are regained during plus-strand RNA synthesis. *J Virol* 1990 Apr; 64(4): 1573-83
94. Korth P, Bohle RM, Corvol P, Pinet F. Cellular distribution of endothelin-converting enzyme-1 in human tissues. *J. Histochem. Cytochem*.1999 Apr; 47(4):447-62.

95. Kurihara H, Yushizumi M, Sugiyama T, Takaku F, Yanagisawa M, Masaki T, Hamaoki M, Kato H, Yazaki Y. Transforming growth factor- β stimulates the expression of endothelin mRNA by vascular endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 1989 Mar 31; 159(3):1435-1440
96. Kurihara Y, Kurihara H, Suzuki H, Kodama T, Maemura K, Nagai R, Oda H, Kuwaki T, Cao WH, Kamada N, et al.. Elevated blood pressure and craniofacial abnormalities in mice deficient in endothelin-1. *Nature*. 1994 Apr 21; 368(6473):703-710
97. Kühl U, Pauschinger M, Schwimmbeck P L, Seeberg B, Lober C, Noutsias M, Poller W, Schultheiss H P. Interferon- β treatment eliminates cardiotropic viruses and improves left ventricular function in patients with myocardial persistence of viral genomes and left ventricular dysfunction. *Circulation*. 2003; 107:2793-2798
98. Lee ME, Dhady MS, Temizer DH, Clifford JA, Yoshizumi M, Quertermous T. Regulation of Endothelin-1 Gene Expression by Fos and Jun. *J Biol Chem*. 1991 Oct 5; 266(28):19034-9
99. Leipner C, Grün K, Schneider I, Glück B, Sigusch HH, Stelzner A. 2004. Coxsackievirus B3-induced myocarditis: differences in the immune response of C57Bl/6 and Balb/c mice. *Med. Microbiol Immunol*. 2004 May; 193(2-3):141-147
100. Lerner A, Wilson FM, Reyes MP. Enteroviruses and the heart (with special emphasis on the probable role of coxsackieviruses, group B, types 1-5). II. Observations in humans. *Mod. Concepts Cardiovasc. Dis*. 1975 Mar; 44(3):11-15.
101. Lim BK, Shin JO, Choe SC, Choi SW, Jeong JO, Seong IW, Kim DK, Jeon ES. Myocardial injury occurs earlier than myocardial inflammation in acute experimental viral myocarditis. *Exp. Molecular Medicine*. 2005 Feb 28; 37(1): 51-57
102. Lim BK, Choi JH, Nam JH, Gil CO, Shin JO, Yun SH, Kim DK, Jeon ES. Virus receptor trap neutralizes coxsackievirus in experimental murine viral myocarditis. *Cardiovasc Res* 2006 Aug 1; 71(3):517-526
103. Lindenau S, von Langsdorff C, Saxena A, Paul M, Orzechowski HD. Genomic organisation of the mouse gene encoding endothelin-converting enzyme-1 (ECE-1) and mRNA expression of ECE-1 isoforms in murine tissues. *Gene* 2006 May 24; 373:109-115
104. Liu PP, Mason JW. Advances in the understanding of myocarditis. *Circulation* 2001; 104:1076-1082
105. Lodge PA, Herzum M, Olszewski J, Huber SA. Coxsackievirus B-3 myocarditis. Acute and chronic forms of the disease caused by different immunopathogenic mechanisms. *Am J Pathol*. 1987 Sep; 128(3):455-63
106. Lowenstein CJ, Hill SL, Lafond-Walker A, Wu J, Allen G, Landavere M, Rose NR, Herskowitz A. Nitric oxide inhibits viral replication in murine myocarditis. *J. Clin. Invest*. 1996 Apr 15; 97(8):1837-1843
107. Manea SA, Manea A, Heltianu C. Inhibition of JAK/STAT signaling pathway prevents high-glucose-induced increase in endothelin-1 synthesis in human endothelial cells. *Cell Tissue Res*. 2010 Apr; 340(1):71-9
108. Matsumori A, Wang H, Abelmann WH, Crumpacker CS. Treatment of viral myocarditis with ribavirin in an animal preparation. *Circulation* 1985 Apr; 71(4):834-9
109. Matsumoto H, Suzuki N, Onda H, Fujino M. Abundance of endothelin-3 in rat intestine, pituitary gland and brain. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989 Oct 16; 164(1):74-80

110. McManus BM, Chow LH, Wilson JE, Anderson DR, Gulizia JM, Gauntt CJ, Klingel KE, Beisel KW, Kandolf R. Direct myocardial injury by enterovirus: a central role in the evolution of murine myocarditis. *Clin Immunol Immunopathol.* 1993 Aug; 68(2): 159-69
111. Meidan R, Klipper E, Gilboa T, Muller L, Levy N. Endothelin-converting enzyme-1, abundance of isoforms a-d and identification of a novel alternatively spliced variant lacking a transmembrane domain. *Journal of Biological Chemistry* 2005 Dec 9;280(49):40867-74
112. Molenaar P, O'Reilly G, Sharkey A, Kuc RE, Harding DP, Plumpton C, Gresham GA, Davenport AP. Characterization and localization of endothelin receptor subtypes in the human atrioventricular conducting system and myocardium. *Circ. Res.* 1993 Mar;72(3):526-538
113. Mulder P, Barbier S, Monteil C, Jeng AY, Henry JP, Renet S, Thuillez C. Sustained improvement of cardiac function and prevention of cardiac remodeling after long-term dual ECE-NEP inhibition in rats with congestive heart failure. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004 Apr;43(4):489-494
114. Muller L, Barret A, Etienne E, Meidan R, Valdenaire O, Corvol P, Tougard C. Heterodimerization of endothelin-converting enzyme-1 isoforms regulates the subcellular distribution of this metalloprotease. *J. Biol. Chem.* 2003 Jan 3;278(1):545-555.
115. Nelboeck P, Fuchs M, Bur D, Löffler BM. Glycosylation of Asn-632 and Asn 651 is important for functional expression of endothelin-converting enzyme-1. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1998;31(1):4-6
116. Nelissen J, Lemkens P, Sann H, Bindl M, Bassissi F, Jasserand D, De Mey JG, Janssen BJ. Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of SOL1: a novel dual inhibitor of neutral endopeptidase and endothelin converting enzyme. *Life Sci* 2012 Oct 15;91(13-14):587-592
117. Neu N, Rose NR, Beisel KW, Herskowitz A, Gurri-Glass G, Craig SW. Cardiac myosin induces myocarditis in genetically predisposed mice. *J Immunol.* 1987 Dec 1;139(11):3630-3636.
118. Noutsias M. Inflammatorische Kardiomyopathie: Aktuelle Aspekte in der Pathogenese, Diagnose und immunmodulatorischen Therapie. *Cardiovasc* 2003;3(2):34-41
119. Ohnaka K, Takayanagi R, Yamauchi T, Okazaki H, Ohashi M, Umeda F, Nawata H. Identification and characterization of endothelin converting activity in cultured bovine endothelial cells. *Biochemical and Biophysical research communications* 1990 May 16;168(3):1128-1136
120. Omland T, Lie RT, Aakvaag A, Aarsland T, Dickstein K. Plasma endothelin determination as a prognostic indicator of 1-year mortality after acute myocardial infarction. *Circulation.*1994 Apr;89(4):1573-79
121. Ono K, Matsumori A, Shioi T, Furukawa Y, Sasayama S. Contribution of endothelin-1 to myocardial injury in a murine model of myocarditis: acute effects of bosentan, an endothelin receptor antagonist. *Circulation.* 1999 Oct26;100(17):1823-1829
122. Orzechowski HD, Richter CM, Funke-Kaiser H, Kröger B, Schmidt M, Menzel S, Bohnemeier H, Paul M. Evidence of alternative promoters directing isoform-specific expression of human endothelin-converting enzyme-1 mRNA in cultured endothelial cells. *Journal of molecular medicine* 1997 Jul;75(7):512-521
123. Orzechowski HD, Günther A, Menzel S, Zimmermann A, Funke-Kaiser H, real R, Subkowski T, Zollmann FS, Paul M. Transcriptional mechanism of protein

- kinase C-induced isoform-specific expression of the gene for Endothelin-Converting Enzyme-1 in human endothelial cells. *Mol. Pharmacol.* 2001 Sep; 60(6):1332-1342
124. Ouyang X, Zhang H, Bayston TA, Archard LC. Detection of Coxsackievirus B3 RNA in mouse myocarditis by nested polymerase chain reaction. *Clinic and Diagnostic Virology.* 1995 Mar;3(3):233-245
 125. Pauschinger M, Phan MD, Doerner A, Kuehl U, Schwimmbeck PL, Poller W, Kandolf R, Schultheiss HP. Enteroviral RNA replication in the myocardium of patients with left ventricular dysfunction and clinically suspected myocarditis. *Circulation.* 1999 Feb 23;99(7):889-95
 126. Petkova SB, Tanowitz HB, Magazine HI, Factor SM, Chan J, Pestell RG, Bouzahzah B, Douglas SA, Shtutin V, Morris SA, Tsang E, Weiss LM, Christ GJ, Wittner M, Huang H. Myocardial expression of endothelin-1 in murine *Trypanosoma cruzi* infection. *Cardiovasc Pathol.* 2000; Sep-Oct;9(5):257-65
 127. Pieske B, Beyermann B, Breu V, Löffler BM, Schlotthauer K, Maier LS, Schmidt-Schweda S, Just H, Hasenfuss G. Functional effects of endothelin and regulation of endothelin receptors in isolated human nonfailing and failing myocardium. *Circulation.* 1999 Apr 13;99(14):1802-9
 128. Pinkert S, Westermann D, Wang X, Klingel K, Dorner A, Savvatis K, Grossl T, Krohn S, Tschöpe C, Zeichhardt H. Prevention of cardiac dysfunction in acute coxsackievirus B3 cardiomyopathy by inducible expression of a soluble coxsackievirus-adenovirus receptor. *Circulation* 2009;120:2358-2366
 129. Price BD, Rueckert RR, Ahlquist P. Complete replication of an animal virus and maintenance of expression vectors derived from it in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996 Sep 3;93(18):9465-70
 130. Puffenberger EG, Hosoda K, Washington SS, Nakao K, deWit D, Yanagisawa M, Chakravart A. A missense mutation of the endothelin-B receptor gene in multigenic Hirschsprung's disease. *Cell.* 1994 Dec 30;79(7):1257-66
 131. Rao L, Debbas M, Sabbatini P, Hockenbery D, Korsmeyer S, White E. The adenovirus E1A proteins induce apoptosis, which is inhibited by the E1B 19-kDa and Bcl-2 proteins. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992 Aug 15;89(16): 7742-6
 132. Rubanyi GM, Polokoff MA. Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Pharmacological Reviews.* 1994 Sep;46(3):325-415
 133. Russell FD, Skepper JN, Davenport AP. Evidence using immunoelectron microscopy for regulated and constitutive pathways in the transport and release of endothelin. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1998 Mar;31(3):424-30
 134. Sakai S, Miyauchi T, Kobayashi M, Yamaguchi I, Goto K, Sugishita Y. Inhibition of myocardial endothelin pathway improves long-term survival in heart failure. *Nature.* 1996 Nov 28;384(6607):353-355
 135. Sakurai T, Yanagisawa M, Masaki T. Molecular characterization of endothelin receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 1992 Mar;13(3):103-8
 136. Schmidt M, Kröger B, Jacob E, Seulberger H, Subkowski T, Otter R, Meyer T, Schmalzing G, Hillen H. Molecular characterization of human and bovine endothelin converting enzyme (ECE-1). *FEBS Lett.* 1994 Dec 19;356(2-3):238-43
 137. Schultz J.C., Hilliard A.A., Cooper L. T. Jr, Charanjit S. R. Diagnosis and Treatment of viral myocarditis. *Mayo Clin Proc.* 2009 Nov;84-11:1001-1009
 138. Schweizer A, Valdenaire O, Nelböck P, Deutschle U, Dumas milne Edwards JB, Stumpf JG, Löffler BM. Human endothelin-converting enzyme (ECE-1): three

- isoforms with distinct subcellular localizations. *Biochem J.* 1997 Dec 15;328(3):871-877
139. Seko Y, Shinkai Y, Kawasaki A, Yagita H, Okumura K, Takaku F, Yazaki Y. Expression of perforin in infiltrating cells in murine hearts with acute myocarditis caused by coxsackievirus B3. *Circulation.* 1991 Aug;84(2):788-95
140. Seko Y, Matsuda H, Kato K, Hashimoto Y, Yagita H, Okumura K, Yazaki Y. Expression of intercellular adhesion molecule-1 in murine hearts with acute myocarditis caused by coxsackievirus B3. *J Clin Invest.* 1993 Apr;91(4):1327-36
141. Seko Y, Takahashi N, Yagita H, Okumura K, Yazaki Y. Expression of cytokine mRNAs in murine hearts with acute myocarditis caused by coxsackievirus b3. *J. of Pathology.* 1997 Sep;183(1):105-108
142. Seko Y, Tsuchimochi H, Nakamura T, Okumura K, Naito S, Imataka K, Fujii J, Takaku F, Yazaki Y. Expression of major histocompatibility complex class I antigen in murine ventricular myocytes infected with Coxsackievirus B3. *Circ. Res.* 1990 Aug;67(2):360-367
143. Seneri GG, Cecioni I, Vanni S, Paniccchia R, Bandinelli B, Vetere A, Janming X, Bertolozzi I, Boddi M, Lisi GF, Sani G, Modesti PA. Selective upregulation of cardiac endothelin system in patients with ischemic but not idiopathic dilated cardiomyopathy: endothelin-1 system in the human failing heart. *Circ Res.* 2000 Mar3;86(4):377-85
144. Sessa WC, Kaw S, Hecker M, Vane JR. The biosynthesis of endothelin-1 by human polymorphonuclear leukocytes. *Biochem. and Biophys. Research Comm.* 1991 Jan 31;174(2):613-618
145. Shetty SS, Savage P, DelGrande D, De Lombaert S, Jeng AY. Characterization of GCS 31447, a potent and nonpeptidic endothelin-converting enzyme inhibitor. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998; 31 (1): 68-70
146. Shimada K, Takahashi M, Ikeda M, Tanzawa K. Identification and characterization of two isoforms of an endothelin-converting enzyme-1. *FEBS Lett.* 1995 Sep 4;371(2):140-144
147. Shichiri m, Adachi S, Sedivy JM, Marumo F, Hirata Y. Biphasic regulation of the preproendothelin-1 gene by c-myc. *Endocrinology* 1997 Nov; 138(11): 4584-90
148. Shimada K, Takahashi M, Turner AJ, Tanzawa K. Rat endothelin-converting enzyme-1 forms a dimer through Cys412 with a similar catalytic mechanism and a distinct substrate binding mechanism compared with neutral endopeptidase-24.11. *Biochemical Journal* 1996 May 1;315(3):863-867
149. Shimada K, Matsushita Y, Wakabayashi K, Takahashi M, Matsubara A, Iijima Y, Tanzawa K, .et.al. Cloning and functional expression of human endothelin-converting-enzyme cDNA. *Biochemical and Biophysical research communications* 1995 Feb15;207(2):807-812
150. Simonson MS, Dunn MJ. Cellular signaling by peptides of the endothelin gene family. *FASEB J.* 1990 Sep;4(12):2989-3000
151. Simonson MS, Herman WH. Protein kinase C und protein tyrosine kinase activity contribute to mitogenic signaling by endothelin-1. Cross-talk between g protein-coupled receptors and pp60c-src. *J Biol Chem.* 1993 May 5;268(13):9347-9357
152. Stankova J, D'Orléans-Juste P, Rola-Pleszczynski M. ET-1 induces IL-6 gene expression in human umbilical vein endothelial cells: synergistic effect of IL-1. *Am J Physiol.* 1996 Oct;271(4):C1073-8

153. Stewart DJ, Kubac G, Costello KB, Cernacek P. Increased plasma endothelin-1 in the early hours of acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 1991 Jul;18(1):38-43
154. Stewart DJ, Cernacek P, Costello KB, Rouleau JL. Elevated endothelin-1 in heart failure and loss of normal response to postural change. *Circulation* 1992 Feb;85(2):510-7
155. Szalay G, Sauter M, Hald J, Weinzierl A, Kandolf R, Klingel K. Sustained nitric oxide synthesis contributes to immunopathology in ongoing myocarditis attributable to interleukin-10 disorders. *Am J Pathol* 2006 Dez;169(6):2085-93
156. Takayanagi R, Liu W, Ito T, Ohnaka K, Nawata H. Big endothelin analogues with inhibitory activity on endothelin-converting enzyme-1. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998;31(1):62-63
157. Thomas PB, Liu ECK, Webb ML, Mukherjee R, Spinale FG. Evidence of an endothelin-1 autocrine loop in cardiac myocytes: relation to contractile function in congestive heart failure. *Am J Physiol.* 1996;40:H2629-H2673.
158. Trapani AJ, De Lombaert S, Beil ME, Bruseo CW, Savage P, Chou M, Jeng AY. CGS 34043: a non-peptidic, potent and long-acting dual inhibitor of endothelin converting enzyme-1 and neutral endopeptidase 24.11. *Life Sci* 2000;67(9):1025-1033
159. Turner AJ, Murphy LJ. Molecular pharmacology of endothelin converting enzymes. *Biochem. Pharmacol.* 1996 Jan 26;51(2):91-102
160. Turner AJ, Brown CD, Carson JA, Barnes K. The neprilysin family in health and disease. *Adv Exp Med Biol.* 2000;477:229-40
161. Turner AJ, Tanzawa K. Mammalian membrane metallopeptidases: NEP, ECE, KELL, and PEX. *FASEB J.* 1997 Apr;11(5): 355-364
162. Uchida Y, Ninomiya H, Sakamoto T, Lee JY, Endo T, Nomura A, Hasegawa S, Hirata F. ET-1 released histamine from guinea pig pulmonary but not peritoneal mast cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992 Dec 15; 189(2):1196-201
163. Valdenaire O, Rohrbacher E, Mattei MG. Organization of the gene encoding the human endothelin-converting enzyme (ECE-1). *J Biol Chem.* 1995 Dec 15;270(50):29794-29798
164. Valdenaire O, Lepailleur-Enouf D, Egidy Y, Thouard A, Barret A, Vranckx R, Tougaard C, Michel JB. A fourth isoform of endothelin-converting enzyme (ECE-1) is generated from an additional promoter molecular cloning and characterization. *European Journal of Biochemistry.* 1999 Sep;264(2):341-349
165. Van Linthout S, Savvatis K, Miteva K, Peng J, Ringe J, Warstat K, Schidt-Lucke C, Sittlinger M, Schultheiss HP, Tschope C. Mesenchymal stem cells improve murine acute coxsackievirus B3-induced myocarditis. *Eur Heart J* 2011 Sep;32(17):2168-2178
166. Wang YX, da Cunha V, Vincelette J, White K, Velichko S, Xu Y, Gross C, Fitch RM, Halks-Miller M, Larsen BR. Antiviral and myocyte protective effects of murine interferon-beta and γ in coxsackievirus B3-induced myocarditis and epicarditis in balb/c mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;293:H69-H76
167. Watanabe T, Suzuki N, Shimamoto N, Fujino M, Imada A. Contribution of endogenous endothelin to the extension of myocardial infarct size in rats. *Circ Res.* 1991 Aug;69(2):370-7
168. Weinzierl AO, Szalay G, Wolburg H, Sauter M, Rammensee HG, Kandolf R, Stevanovic S, Klingel K. Effective chemokine secretion by dendritic cells and expansion of cross-presenting CD4-/CD8+ dendritic cells define a protective

- phenotype in the mouse model of coxsackievirus myokarditis. *J Virol.* 2008 Aug;82(16):81-60
169. Wessely R, Henke A, Zell R, Kandolf R, Knowlton KU. Low-level expression of a mutant coxsackieviral cDNA induces a myocytopathic effect in culture: an approach to the study of enteroviral persistence in cardiac myocytes. *Circulation.* 1998 Aug 4;98(5):450-7
170. Wilson DB, Dorfman DM, Orkin SH. A nonerythroid GATA-binding protein is required for function of the human preendothelin-1 promoter in endothelial cells. *Mol Cell Biol.* 1990 Sep;10(9):4854-62
171. Wilson FM, Miranda QR, Chason JL, Lerner AM. Residual pathologic changes following murine coxsackie A and B myocarditis. *Am J Pathol.* 1969 May;55(2): 253-65
172. Wolfgram LJ, Beisel KW, Herskowitz A, Rose NR. Variations in the susceptibility to Coxsackievirus B3-induced myocarditis among different strains of mice. *The J. of Immunology.* 1986 Mar1;136(5):1846-1852
173. Woodruff JF, Woodruff JJ. Involvement of T lymphocytes in the pathogenesis of coxsackie virus B3 heart disease. *J Immunol* 1974 Dec; 113(6): 1726-34
174. Woodruff JF. Viral myocarditis. A review. *Am J Pathol.* 1980 Nov;101(2):425-484
175. Xu D, Emoto N, Giaid A, Slaughter C, Kaw C, deWit D, Yanagisawa M. ECE-1: a membrane-bound metalloprotease that catalyses the proteolytic activation of big endothelin-1. *Cell* 1994 Aug 12;78(3):473-485
176. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature.* 1988 Mar 31;332(6163): 411-415
177. Yanagisawa H, Yanagisawa M, Kapur RP, Richardson JA, Williams SC, Clouthier DE, deWit D, Emoto N, Hammer RE. Dual genetic pathways of endothelin-mediated intercellular signaling revealed by targeted disruption of endothelin converting enzyme-1 gene. *Development.* 1998 Mar;125(5):825-836
178. Yanagisawa H, Hammer RE, Richardson JA, Emoto N, Williams SC, Takeda Si, Clouthier DE, Yanagisawa M. Disruption of ECE-1 and ECE-2 reveals a role for endothelin-converting enzyme-2 in murine cardiac development. *J of Clin Invest.* 2000 May;105(10):1373-1382
179. Yang LL, Gros R, Kabir MG, Sadi A, Gotlieb AI, Husain M, Stewart DJ. Conditional cardiac overexpression of endothelin-1 induces inflammation and dilated cardiomyopathy in mice. *Circulation.* 2004 Jan 20;109(2): 255-261
180. Yoshimoto S, Ishizaki Y, Mori A, Sasaki T, Takakura K, Murota S. The role of cerebral microvessel endothelium in regulation of cerebral blood flow through production of endothelin-1. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1991;17(7):260-3
181. Yushizumi M, Kurihara H, Sugiyama T, Takaku F, Yanagisawa M, Masaki T, Yazaki Y. Hemodynamic shear stress stimulates endothelin production by cultured endothelial cells. *Biochem. And Biophys. Research Comm.* 1989 Jun15;161(2):859-864
182. Zaragoza C, Ocampo C, Saura M, Leppo M, Wei XQ, Quick R, Moncada S, Liew FY, Lowenstein CJ. The role of inducible nitric oxide synthase in the host response to Coxsackievirus myocarditis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998 Mar 3;95(5):2469-74

183. Zhao XS, Pan W, Bekeredjian R, Shohet RV. Endogenous endothelin-1 is required for cardiomyocyte survival in vivo. *Circulation* 2006 Aug 22;114(8):830-837
184. Zidovetzki R, Chen P, Chen M, Hofman FM. Endothelin-1-induced interleukin-8 production in human brain-derived endothelial cells is mediated by the proteinkinase C and protein tyrosine kinase pathways. *Blood*. 1999 Aug 15;94(4):1291-9
185. Zolk O; Quattek J, Sitzler G, Schrader T, Nickenig G, Schnabel P, Shimada K, Takahashi M, Böhm M. Expression of endothelin-1, endothelin- converting enzyme, and endothelin receptors in chronic heart failure. *Circulation*. 1999 Apr 27;99(16): 2118-2123

Anhang

dCt-Daten A.BY

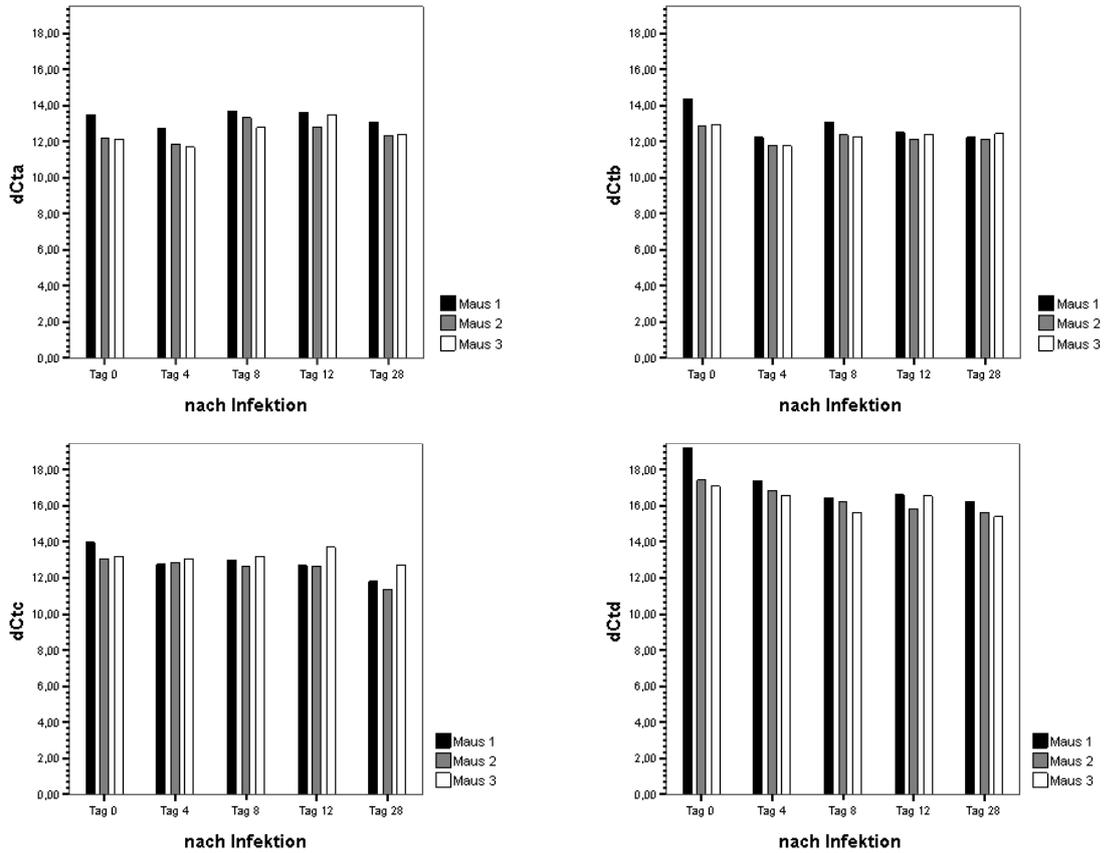


Abbildung: dCt-Daten der ECE-1-Isoformen im Stamm A.BY

dCt ist das Ergebnis der Ct-Werte nach real-time PCR und Relativierung dieser auf 18S zum jeweiligen Zeitpunkt nach Infektion (p.i.). y-Achse: dCt der mRNA der ECE-1-Isoform; x-Achse: Myokarditisverlauf (Tag0 bis Tag28); Balken entsprechen der einzelnen Maus (schwarz= 1. Maus; grau= 2. Maus; weiß= 3. Maus).

dCt-Daten C57BI/6

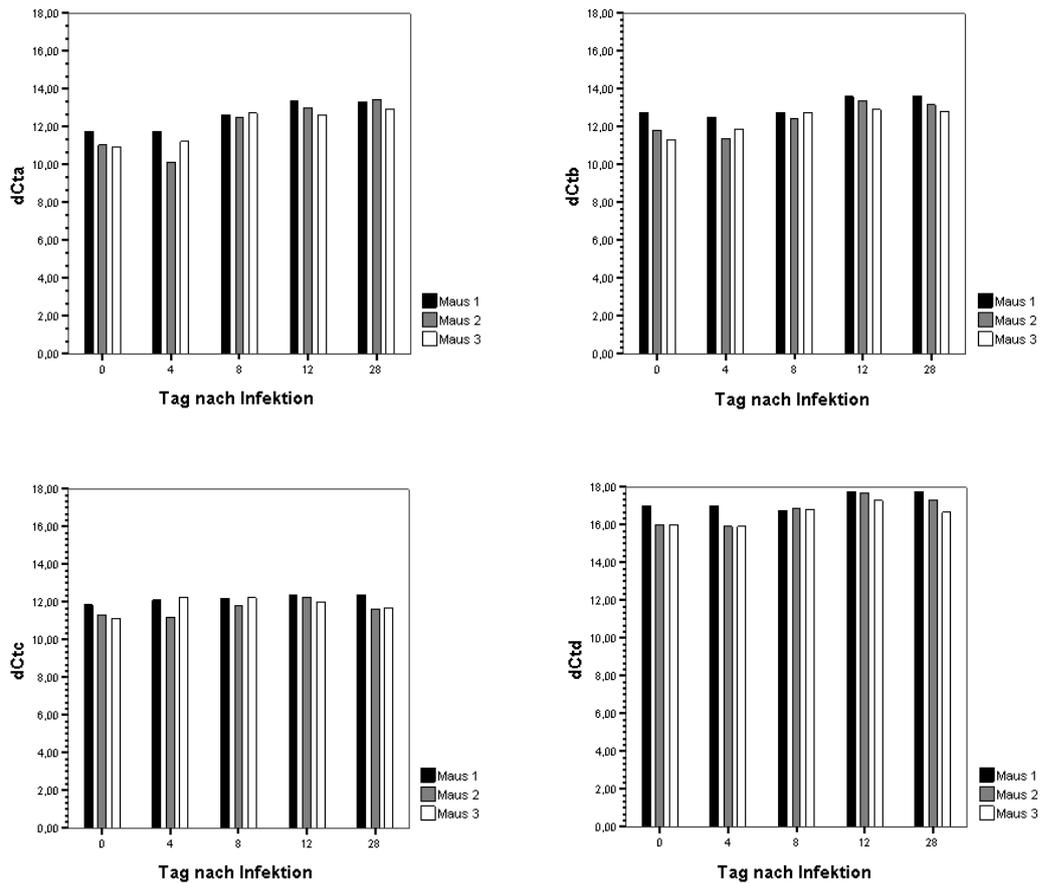


Abbildung: dCt-Daten der ECE-1-Isoformen im Stamm C57BL/6

dCt ist das Ergebnis der Ct-Werte nach real-time PCR und Relativierung dieser auf 18S zum jeweiligen Zeitpunkt nach Infektion (p.i.). y-Achse: dCt der mRNA der ECE-1-Isoform; x-Achse: Myokarditisverlauf (Tag0 bis Tag28). Balken entsprechen der einzelnen Maus (schwarz= 1. Maus; grau= 2. Maus; weiß= 3. Maus).

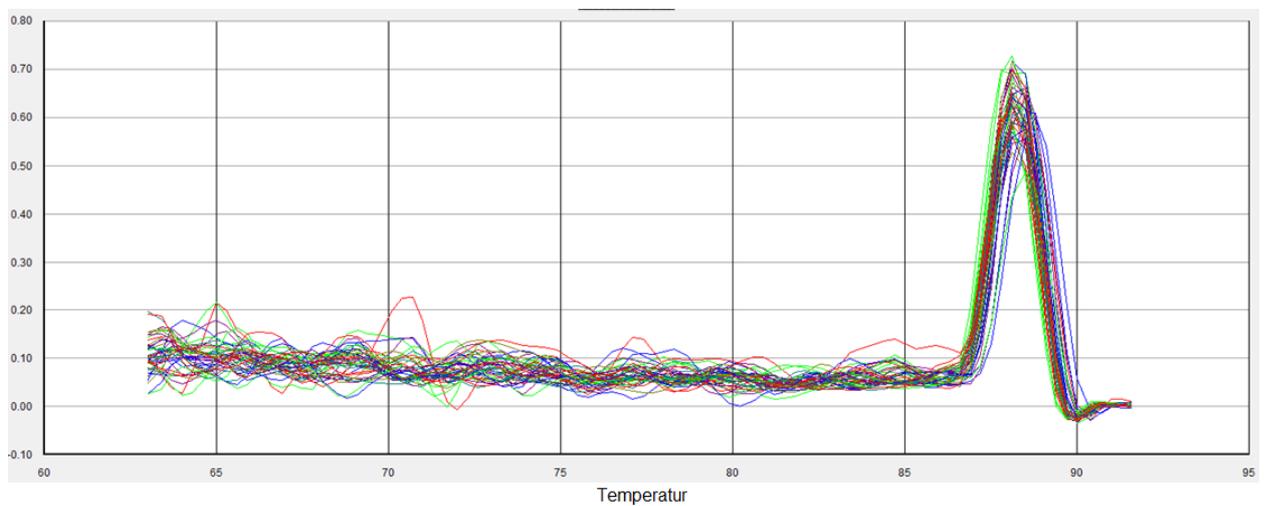
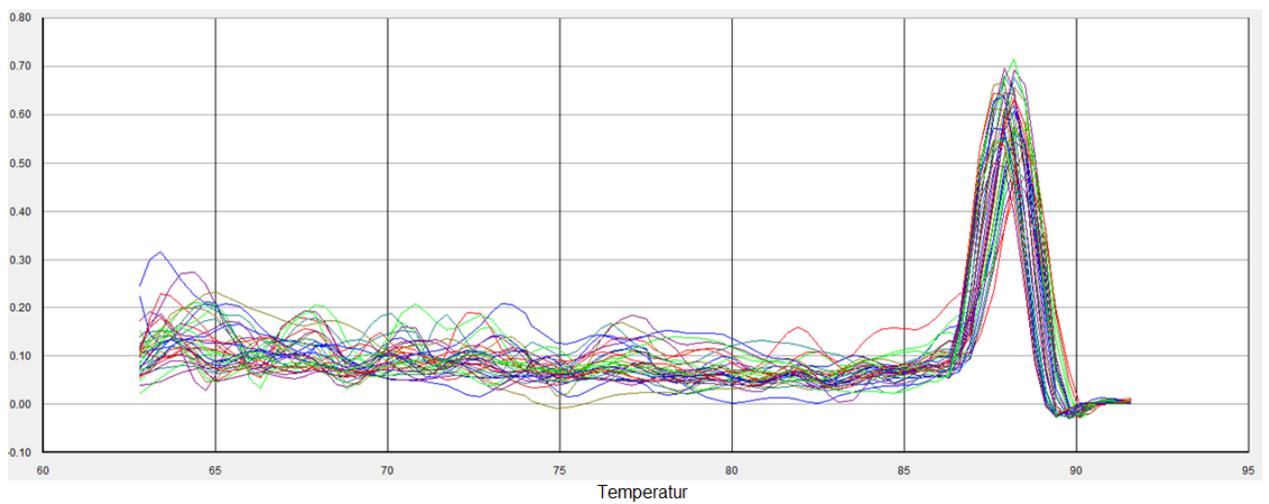
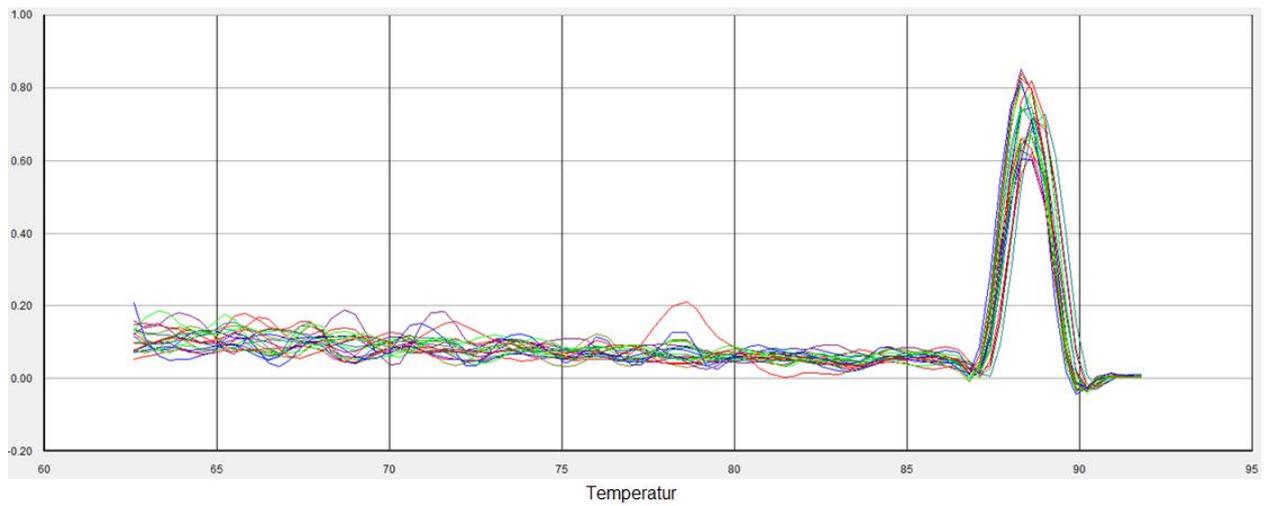
Dissoziationskurven ECE-1 b bis d

Abbildung: Dissoziationskurven ECE-1-Isoformen b, c und d

Veröffentlichung als freier Vortrag

S. Lindenau, S. Boche, M. Sauter, K. Klingel, M. Paul, H.-D. Orzechowski. Differentielle Expression des Endothelinsystems in Mausmodellen der akuten und chronischen viralen Myokarditis (V 1428) 73. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, Mannheim, 12.-14. April, 2007

Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. med. I. Roots, Leiter des Instituts für Klinische Pharmakologie der Charite Berlin, für die Möglichkeit, diese Arbeit in seinem Institut durchführen zu dürfen.

Meinem Doktorvater Herrn PD Dr. med. H.D. Orzechowski, danke ich ganz besonders für das Thema, die uneingeschränkte, engagierte Unterstützung und Inspiration während der gesamten Dissertation.

Auch Dr. rer. nat. Steffi Lindenau möchte ich besonders danken für ihre durchgehend kritische und ausdauernde Begleitung, Ihre Geduld und konstruktiven Anregungen.

Ich danke weiterhin dem gesamten Team der klinischen Pharmakologie am Campus Benjamin Franklin während meiner Zeit, insbesondere Frau Schwaneberg, für die fundierte und gewissenhafte Einarbeitung und Manuela Margarin, für unerschütterliche Motivation.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, die mich absolut, mühevoll und beharrlich während der Erstellung dieser Arbeit unterstützt hat.

Abschließender Dank gilt meinem ehemaligen Chefarzt Prof. Dr. med. M. Walz, der durch unermüdliches Nachfragen seinen Teil zum Abschluss dieser Arbeit beigetragen hat.

Lebenslauf

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

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Sandra Boche, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Expression der mRNA des Endothelin-konvertierenden Enzyms-1 und Präporendothelins-1 im murinen Coxsackievirus B3-Myokarditismodell selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (URM) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik und Resultaten entsprechen den URM und werden von mir verantwortet.

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

Datum

Unterschrift: