

**Die mitochondriale Funktion bei
Coxsackievirus B3-induzierter Myokarditis:
Wirkung einer kardialen Überexpression des
Adeninnukleotid-Translokators**

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

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

vorgelegt von

LINDA EBERMANN
aus Berlin

September 2010

Diese Arbeit wurde angefertigt vom 08.09.2005 bis 28.02.2010 am Institut für Kardiologie und Pulmologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, unter Leitung von Prof. Dr. med. Heinz-Peter Schultheiss und Dr. rer. nat. Andrea Dörner.

1. Gutachter: Prof. Dr. Heinz-Peter Schultheiss
2. Gutachter: Prof. Dr. Petra Knaus

Disputation am: 27.01.2011

MEINEN ELTERN.

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Einleitung	1
1.1 Myokarditis und dilatative Kardiomyopathie	1
1.2 Tiermodelle der Myokarditis	2
1.2.1 Coxsackieviren	3
1.2.2 Virusinduzierte Toxizität	3
1.2.3 Cytotoxische T-Lymphozyten.....	4
1.2.4 Autoimmunmyokarditis.....	4
1.3 Die mitochondriale Funktion	6
1.3.1 Struktur und Funktion der Mitochondrien.....	6
1.3.2 Die oxidative Phosphorylierung	7
1.3.3 Die mitochondriale Apoptose	9
1.3.4 Der Adeninnukleotid-Translokator	10
1.3.4.1 Struktur und Funktion des ANT	10
1.3.4.2 Die Isoformen des ANT	12
1.3.4.3 Der ANT1 und die mitochondriale Apoptose.....	14
1.3.5 Der mitochondriale Energiestoffwechsel bei Herzerkrankungen	15
1.4 Ziele der Arbeit	18
2 Material und Methoden.....	19
2.1 Chemikalien	19
2.2 Puffer und Stammlösungen	21
2.3 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme	25
2.4 Enzyme	25
2.5 Antikörper	26
2.5.1 Primärantikörper	26
2.5.2 Sekundärantikörper	26
2.6 Nukleinsäuren	26
2.6.1 Synthetische Oligonukleotide.....	26
2.6.1.1 Genotypisierung der Maus.....	26
2.6.1.2 Amplifizierung von β -Aktin	26

2.6.1.3	Bestimmung der Spleißvarianten	27
2.6.1.4	Amplifizierung der Sonden für Northern Blots	27
2.6.1.5	Amplifizierung der Sonden für Southern Blots.....	27
2.6.1.6	Sequenzierungsprimer.....	27
2.6.2	TaqMan™ Sonden.....	27
2.7	Gebrauchswaren	28
2.8	Sonstige Materialien und Geräte	28
2.9	Sterilisierung.....	29
2.10	Virus	29
2.11	Zell-Linien und Medien	30
2.12	Molekularbiologische Arbeitstechniken	30
2.12.1	Isolierung von DNA aus eukaryotischen Geweben	30
2.12.1.1	Isolierung von DNA aus Schwanzspitzenbiopsien zur Genotypisierung.....	30
2.12.1.2	Isolierung von DNA aus Herzgewebe	30
2.12.2	Isolierung von RNA aus eukaryotischen Zellen und Geweben	31
2.12.3	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	32
2.12.4	Agarose-Gelelektrophorese.....	32
2.12.4.1	Gelelektrophorese von DNA und RNA	32
2.12.4.2	Denaturierende Gelelektrophorese von RNA	32
2.12.4.3	Aufreinigung von PCR-Produkten aus Agarosegelen	33
2.12.5	Kopienzahlbestimmung mittels Southern Blot.....	33
2.12.6	Transfer und Nachweis von Nukleinsäuren auf Nylonmembranen.....	33
2.12.6.1	RNA- und DNA-Transfer mittels Northern bzw. Southern Blot	33
2.12.6.2	Radioaktive Markierung von DNA.....	35
2.12.6.3	Nachweis und Quantifizierung der Hybridisierungsprodukte	36
2.12.6.4	Rehybridisierung radioaktiv markierter Membranen	36
2.12.6.5	RNase-Protection-Assay (RPA)	36
2.12.7	Enzymatische Modifikationen von DNA	37
2.12.8	Polymerase-Kettenreaktion	37
2.12.9	cDNA-Synthese mittels Reverser Transkriptase (RT)	37
2.12.10	Semi-quantitative RT-PCR	38
2.12.11	Quantitative real-time PCR mittels TaqMan.....	38
2.12.12	Präamplifizierung.....	39
2.12.13	Sequenzierung	40
2.13	Proteinbiochemische Arbeitsmethoden.....	40

2.13.1	Proteinextraktion	40
2.13.1.1	Isolierung von Gesamtzellextrakt aus Herzgewebe	40
2.13.1.2	Isolierung von Mitochondrien und Cytosol aus Herzgewebe.....	40
2.13.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinen.....	41
2.13.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	42
2.13.4	Elektrotransfer von Proteinen (Western Blot)	42
2.13.5	Detektion von Proteinen auf PVDF-Membranen	43
2.13.6	Massenspektrometrische Analyse	43
2.13.7	Enzymaktivität.....	44
2.13.7.1	Aktivität der Atmungskettenkomplexe.....	44
2.13.7.2	Aktivität der Creatinkinase	45
2.13.8	Bestimmung der Lipidperoxidation.....	46
2.14	Zellbiologische Arbeitsmethoden.....	46
2.14.1	Isolierung primärer embryonaler Kardiomyozyten der Maus (PECM)	46
2.14.2	Isolierung primärer neonataler Kardiomyozyten der Ratte (PNCM)	47
2.14.2.1	Zellzahlbestimmung	48
2.14.2.2	Inkubation von Kardiomyozyten mit Cytokinen	48
2.15	Tiermodelle	48
2.15.1	ANT1-transgenes Mausmodell.....	48
2.15.2	Mausmodell der CVB3-Myokarditis.....	49
2.15.3	Mausmodell des Streptozotocin (STZ)-Diabetes.....	50
2.16	Virologische Methoden	50
2.16.1	Infektion von Zellkulturen mit Coxsackieviren.....	50
2.16.2	Bestimmung der Coxsackievirus-Konzentration durch Plaque-Assay	51
2.16.3	Nachweis der CVB3-RNA mittels in situ Hybridisierung	52
2.17	Hämatoxylin-Eosin-Färbung von Paraffin-Schnitten.....	52
2.18	Datenbanken.....	52
2.19	Programme	52
2.20	Statistische Evaluierung.....	53
3	Ergebnisse	54
3.1	Charakterisierung der resistenten und permissiven Tiermodelle.....	54
3.1.1	CVB3-Myokarditis im resistenten und permissiven Tiermodell	55
3.1.2	Der mitochondriale Energiestoffwechsel in der CVB3-Myokarditis	56
3.1.2.1	Die Aktivität der Atmungskettenenzyme in der CVB3-Myokarditis	56

3.1.2.2	Die Expression des ANT im murinen Myokarditis-Modell.....	58
3.1.2.3	Das Creatinkinase-System in der CVB3-Myokarditis	60
3.1.3	Die mitochondriale Apoptose in der CVB3-Myokarditis	61
3.1.4	Das antioxidative Stress-System in der CVB3-Myokarditis	63
3.1.5	Einfluss auf die kardiale Viruslast.....	65
3.1.6	Der Einfluss der Cytokine auf die mitochondriale Funktion	66
3.2	Einfluss der ANT1-Expression auf kardiale Erkrankungen	70
3.2.1	Charakterisierung des transgenen Mausstamms mit herzspezifischer ANT1- Überexpression	70
3.2.1.1	Analyse der Transgenintegration.....	71
3.2.1.2	Analyse der Transgenexpression	72
3.2.2	CVB3-Myokarditis im ANT1-transgenen Mausmodell	80
3.2.2.1	Überexpression des ANT1 in der CVB3-induzierten Myokarditis	80
3.2.2.2	CVB3-Myokarditis in infizierten ANT1-transgenen C57BL/6-Tieren.....	82
3.2.2.3	Der Energiestoffwechsel in CVB3-infizierten ANT1-transgenen Tieren.....	85
3.2.2.4	Die Apoptose im CVB3-infizierten ANT1-transgenen Mausmodell	86
3.2.3	Das ANT1-transgene Tiermodell in der diabetischen Kardiomyopathie	89
3.2.3.1	Induktion des Diabetes Typ I in ANT1-transgenen Mäusen	89
3.2.3.2	ANT-Expression in der diabetischen Kardiomyopathie	90
3.2.3.3	Kardioprotektiver Effekt der ANT1-Überexpression bei diabetischer Kardiomyopathie	91
4	Diskussion	94
4.1	CVB3-Myokarditis-Modell der Maus	94
4.2	Die mitochondriale Funktion im Mausmodell der CVB3-Myokarditis	96
4.2.1	Energieproduktion über die Atmungskette.....	96
4.2.2	Der ANT im resistenten und permissiven Modell der CVB3-Myokarditis.....	99
4.2.3	Der Energietransfer über das Creatinkinase-System	100
4.3	Apoptose und oxidativer Stress im CVB3-Myokarditis-Modell.....	102
4.3.1	Das antioxidative Stress-System in resistenten und permissiven Mausstämmen ..	102
4.3.2	Die Apoptose in resistenten und permissiven Mausstämmen	104
4.4	ANT1-Überexpression in kardialen Erkrankungen.....	106
4.4.1	Charakterisierung der ANT1-transgenen Maus	106
4.4.2	Experimentelle ANT1-Überexpression in der CVB3-Myokarditis	108
4.4.3	ANT1-Überexpression im experimentellen Diabetes Typ I	110
4.4.4	Beurteilung der ANT1-Überexpression in kardialen Erkrankungen	112

5	Zusammenfassung –Summary	113
5.1	Zusammenfassung.....	113
5.2	Summary	115
6	Literaturverzeichnis	117
7	Publikationsverzeichnis	137
7.1	Veröffentlichungen	137
7.2	Kongressbeiträge.....	137
7.3	Auszeichnungen	138
	Danksagung	139
	Lebenslauf	140
	Eidesstattliche Versicherung	141

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenin
A	Ampere
aa	Aminosäure(n)
ADP	Adenosindiphosphat
α MHC	<i>alpha myosin heavy chain</i>
ANT	Adennukleotid-Translokator
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
C	Cytosin
CAR	Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor
cDNA	komplementäre DNA
CK	Creatinkinase
cm	Zentimeter
c.p.m.	<i>counts per minute</i>
CVB3	Coxsackievirus B3
d	Tag(e)
Da	Dalton
DCM	dilatative Kardiomyopathie
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dpi	Tag(e) <i>post infectionem</i>
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FMN	Flavinmononucleotid
$\times g$	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
g	Gramm
G	Guanin
h	Stunde
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
HRP	<i>horse radish peroxidase</i> (Meerrettich-Peroxidase)
Hrsg.	Herausgeber
IFN β	Interferon <i>beta</i>

IgG	Immunglobulin
IL-1 β	Interleukin 1 <i>beta</i>
i. p.	intraperitoneal
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
l	Liter
λ	Wellenlänge
M	Molar (mol/l)
μ Ci	Mikro-Curie
mg	Milligramm
μ g	Mikrogramm
min	Minute
Mio IE	Millionen internationale Einheiten
ml	Milliliter
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
mPTP	<i>mitochondrial permeability transition pore</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
ms	Millisekunde
mtDNA	mitochondriale DNA
n	Anzahl der Proben
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid, reduziert
nm	Nanometer
nt	Nukleotid(e)
P	Wahrscheinlichkeitsmaß
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PECM	primäre embryonale (Maus-)Kardiomyozyten
pfu	<i>plaque forming units</i>
p. i.	<i>post infectionem</i>
PNCM	primäre neonatale (Ratten-)Kardiomyozyten

Abkürzungsverzeichnis

r	Korrelationskoeffizient
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Rotationen pro Minute
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
s	Sekunde
SEM	<i>standard error of the mean</i> , Standardfehler
ssRNA	einzelsträngige RNA
STZ	Streptozotocin
T	Thymin
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TG	Transgen
TGF β	<i>Transforming growth factor beta</i>
TNF α	Tumor-Nekrose-Faktor <i>alpha</i>
U	<i>unit</i> (Einheit der Enzymaktivität)
UTR	nicht translatierte Region
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt
Vol	Volumeneinheiten
w/v	Gewicht pro Volumen
WT	Wildtyp (C57BL/6)

1 EINLEITUNG

1.1 Myokarditis und dilatative Kardiomyopathie

Die Myokarditis ist eine entzündliche Erkrankung des Herzmuskels, die in Verbindung mit einer kardialen Dysfunktion auch als inflammatorische Kardiomyopathie bezeichnet wird¹. Es werden inflammatorische Kardiomyopathien idiopathischer, autoimmuner und infektiöser Ätiologie unterschieden. Infektiöse Agenzien sind vor allem kardiotope Viren, die häufig im Herzgewebe von Patienten mit Myokarditis und auch dilatativer Kardiomyopathie (DCM) nachweisbar sind. Hierzu zählen vor allem, aber nicht ausschließlich, Enteroviren, Adenoviren, Parvovirus B19, Humanes Herpesvirus 6, Epstein-Barr-Virus, Cytomegalievirus, Influenza A-Virus und Hepatitis C-Virus²⁻⁶. Neben zahlreichen bekannten Viren können seltener auch bakterielle Erreger (z. B. Borrelien, Chlamydien), aber auch Protozoen wie *Trypanosoma cruzii*, der Erreger der Chagas-Krankheit, und einige Pilze (z. B. Aspergillus, Candida) eine Myokarditis verursachen. Zu den nicht infektiösen Ursachen zählen vor allem Alkoholmissbrauch, aber auch Medikamente, Autoimmunerkrankungen oder Strahlen^{7,8}.

Über die Inzidenz der Myokarditis in Deutschland und weltweit liegen keine vollkommen gesicherten Daten vor, da die Erkrankung häufig subklinisch verläuft. Sie wird aber bei routinemäßigen Autopsien in 1-9 % der Fälle angenommen⁹. In Fällen, in denen sie diagnostiziert wird, kann die Myokarditis über klinische, histologische und immunhistochemische Methoden in mehrere Untergruppen klassifiziert werden^{10, 11}. [1] Die fulminante Myokarditis ist eine heftige Erkrankung, die einhergeht mit schwerer kardialer Dysfunktion und Herzversagen. Jedoch haben Patienten, die die ersten Wochen überleben, eine exzellente Langzeitprognose und können eine vollständige Heilung erwarten^{11, 12}. Demgegenüber erfahren Patienten mit [2] akuter und [3] chronisch aktiver Myokarditis einen deutlich mildereren Verlauf mit moderater linksventrikulärer Dysfunktion. Diese Patientengruppen haben aber gleichzeitig eine deutlich schlechtere Langzeitprognose mit einem erhöhten Risiko für eine chronische Infektion und einer 5- bzw. 10-Jahres-Überlebensrate von 46 bzw. 25 %¹¹⁻¹³. Über eine antivirale und immunsuppressive Therapie kann manchmal die Eliminierung des Virus und das Abklingen der Inflammation erreicht werden. Dennoch entwickelt sich bei etwa 25 % der Patienten mit klinisch manifestierter Myokarditis innerhalb von zwei bis vier Jahren nach Diagnosestellung eine DCM, deren 5-Jahres-Mortalität ohne Herztransplantation 50 % beträgt^{11, 13}. Die DCM geht einher mit Strukturveränderungen des Herzgewebes wie Fibrosierung und Vernarbung und ist charakterisiert durch die progressive Einschränkung der links- und rechtsventrikulären Funktion bei gleichzeitiger Dilatation des linken und des rechten Ventrikels^{7, 14, 15}. Die DCM stellt neben der koronaren Herzerkrankung die häufigste Ursache einer Herzinsuffizienz dar, d. h. das Unvermögen

des Herzens, den gesamten Organismus seinen Bedürfnissen entsprechend mit Blut zu versorgen, und ist eine der Hauptursachen für Herztransplantationen. In Deutschland liegt die Inzidenz der DCM derzeit bei 29 neuen Fällen pro 10⁶ Einwohner^{7, 15}.

In Biopsieproben von Patienten mit DCM können zum Teil virale Genome nachgewiesen werden und die Persistenz kardiotroper Viren führt zu einer signifikanten Verschlechterung der Prognose^{6, 16, 17}. Der kausale Zusammenhang zwischen Enterovirusinfektion, insbesondere Coxsackieviren, und einer Myokarditis konnte durch Analyse von Biopsiematerial mittels serologischer und molekularbiologischer Verfahren, wie *in situ* Hybridisierung und PCR, sowie tierexperimenteller Versuche gezeigt werden. Auch ist es weithin akzeptiert, dass zumindest bei einem Teil der Patienten mit DCM eine Virusmyokarditis ursächlich vorausgegangen ist^{2, 18-22}.

1.2 Tiermodelle der Myokarditis

Eine virale Myokarditis kann in verschiedenen Inzuchtstämmen der Maus durch intraperitoneale Injektion von Coxsackievirus B3 (CVB3) induziert werden und ähnelt in ihrem Erscheinungsbild der humanen Erkrankung. Die Anfälligkeit für die Myokarditis ist jedoch abhängig vom Tropismus des Virus, dem Alter des Wirts und dem verwendeten Tiermodell²³ sowie weiteren Faktoren wie Geschlecht, Hormonstatus, Ernährung, körperliche Aktivität und genetische Faktoren sowohl des Wirts als auch des Virus^{23, 24}.

Die Infektion führt innerhalb von 24 Stunden zu einer nachweisbaren Virämie, welche in der Regel bis zum Tag 3 nach der Infektion andauert und es dem Virus ermöglicht, sekundär weitere Organe wie Pankreas, Leber, Milz und Herz zu befallen. In der akuten Phase (Tag 0-3) erreicht die virale Replikation ihr Maximum. In der subakuten Phase (Tag 4-14) wirkt die Aktivierung der immunologischen Abwehr des Wirts einer weiteren Zunahme des Virustiters entgegen, so dass am Tag 10 nach der Infektion im Allgemeinen keine Viren mehr detektierbar sind^{23, 24}. Eine vollständige Eliminierung des Virus und eine damit einhergehende Ausheilung der Myokarditis ist für die sogenannten resistenten Inzuchtstämme wie C57BL/6, B10.A und DBA/2 beschrieben worden. Im Gegensatz dazu, kann in permissiven Mausstämmen, wie auch bei einigen Patienten, nach dieser akuten Phase eine chronische Phase eintreten, die durch eine persistierende, geringgradige Entzündung mit zunehmender Fibrosierung und Dilatation der Ventrikel charakterisiert ist²⁵⁻²⁹. Hierzu zählen vor allem die Stämme A/J, A.BY und A.SW, die unter der Bezeichnung „A-Stämme“ zusammengefasst werden, sowie SWR-Mäuse. Die Infektion von murinen Inzuchtstämmen mit CVB3 bietet somit ein geeignetes Tiermodell, um die pathophysiologischen und molekularbiochemischen Prozesse in der viralen Myokarditis zu untersuchen.

1.2.1 Coxsackieviren

Coxsackieviren gehören innerhalb der Familie der *Picornaviridae* (*pico* lat. „klein“ + RNA) zur Gattung *Enterovirus* und sind lytische, nicht umhüllte RNA-Viren, deren Genom als lineare Einzelstrang-RNA mit positiver Polarität [(+)ssRNA] vorliegt³⁰⁻³². Sie werden aufgrund ihrer Pathogenität bei neugeborenen Mäusen in Typ A und B klassifiziert³³, wobei Viren des Typus A eine diffuse Myositis mit schlaffer Lähmung des Gewebes und Typ B-Viren eine herdförmige Myositis mit spastischer Lähmung, aber auch Meningitis, Pankreatitis und Myokarditis verursachen^{33, 34}. Weiter werden Coxsackieviren des Typus A in 23 und die des Typus B in sechs verschiedene Serotypen (CVB1-6) unterteilt³⁰.

Als zellulärer Internalisierungsrezeptor für Coxsackieviren wurde der Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor (CAR) identifiziert^{35, 36}. Der CAR ist ein Typ 1 Transmembranprotein der Immunglobulin-Superfamilie^{37, 38} und ist in den *tight junctions* lokalisiert. Seine extrazelluläre Domäne vermittelt neben der Aufnahme von Adeno- und Coxsackie B-Viren die Zell-Zell-Adhäsion und -Kontaktfindung^{35, 39} in der Morphogenese und Differenzierung von Herz und Gehirn^{40, 41}. Der *decay accelerating factor* (DAF, CD55) ist ein weiteres Zelloberflächenprotein, das CVB3 zwar binden, aber nicht internalisieren kann^{42, 43}.

1.2.2 Virusinduzierte Toxizität

Unter Verwendung des murinen Tiermodells konnte gezeigt werden, dass die im Verlauf der CVB3-Myokarditis auftretende Schädigung des Gewebes durch zwei verschiedene Pathomechanismen zustande kommt. Zum einen durch die direkte virusinduzierte Cytolyse, zum anderen durch sekundäre, viruseliminierende Immunmechanismen des Wirts^{24, 26, 44-47}.

Es ist belegt, dass Kardiomyozyten durch CVB3 infiziert werden können⁴⁸⁻⁵⁰ und dies einhergeht mit viraler Replikation und der Induktion des apoptotischen Zelltods⁵¹⁻⁵³. Daneben führt eine immunsuppressive Behandlung in der frühen Phase der Erkrankung in Mäusen zu einer Verschärfung der Myokarditis und einem Anstieg der Viruskonzentration bzw. einer Verzögerung der Viruseliminierung^{49, 54, 55}. Den viralen Mechanismus hinter der myokardialen Schädigung verdeutlichten auch Untersuchungen von Chow *et al.*, in denen die Inokulation mit CVB3 in SCID (*severe combined immunodeficiency*)-Mäusen, die einen Mangel an sowohl reifen T- als auch B-Lymphozyten haben, eine erhebliche Myokarditis mit hoher Mortalität auslöste⁵⁶.

Die virusinduzierte Cytotoxizität tritt vor allem in der akuten Myokarditis auf und ist charakterisiert durch fokale Nekrosen. Auch ohne inflammatorisches Infiltrat ist eine Zunahme der Expression proinflammatorischer Cytokine wie Interleukin 1 *beta* (IL-1 β), Tumor-Nekrose-Faktor *alpha* (TNF α) und Interferon *gamma* (IFN γ) zu beobachten^{24, 57, 58}. In der subakuten Phase, ab Tag 7 nach der Infektion, kommt es zunehmend zur

Infiltration von zunächst NK (*natural killer*)-Zellen, dann Makrophagen und T-Lymphozyten^{26, 59, 60}. Die Ausschüttung inflammatorischer Cytokine wie IL-1 β , TNF α , IFN γ und Interleukin 2 (IL-2) kann teilweise bis zu 80 Tage nach der Infektion anhalten^{24, 57} und auch in Patienten mit akuter Myokarditis und DCM wurden erhöhte Level an TNF α , Interleukin 1 *alpha* (IL-1 α) und IL-1 β im Blut nachgewiesen⁶¹. Im akuten Myokarditis-Modell klingt die Inflammation bis Tag 21 nach der Infektion ab und die bleibende fibrotische Schädigung ist gering. Das Virus ist bereits am Tag 10 nach der Infektion nicht mehr im Serum, dem Pankreas und der Milz zu detektieren, am Tag 14 nach der Infektion auch nicht mehr im Herzen⁶⁰. Im chronischen Tiermodell hingegen persistiert das Virus im Herzen und die Viruspersistenz ist begleitet von einer fortgesetzten kardialen Inflammation^{28, 62-64}, die zu einer sukzessiven Verschlechterung der kardialen Struktur und Funktion führt. Welche Faktoren die Persistenz des Virus begünstigen, ist nicht eindeutig geklärt, jedoch wurden mehrfach Mutationen in der VP1-Sequenz und vor allem der 5'-UTR des viralen Genoms beschrieben, die mit langfristiger Viruspersistenz assoziiert werden^{28, 64-68}. Die Gruppe um Rose hat darüber hinaus den Adjuvantien-Effekt des Virus als induzierenden Faktor einer Autoimmunerkrankung diskutiert⁶⁹.

1.2.3 Cytotoxische T-Lymphozyten

Auf Seiten des Immunsystems des Wirts haben insbesondere die cytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) neben ihrer viruseliminierenden Funktion einen Anteil an der myokardialen Schädigung^{26, 70, 71}. Hier haben Untersuchungen von Henke *et al.* ergeben, dass ein Mangel an CD8-positiven CTLs in *knock-out* C57BL/6-Mäusen mit einer Verringerung der CVB3-induzierten Myokarditis und der myokardialen Viruslast verbunden ist. Die Entfernung von CD4-positiven T-Lymphozyten (T_H) führte hingegen zu einer höhergradigen Myokarditis. Bei gleichzeitigem Mangel an CTLs und T_H-Zellen entwickelten die Tiere nur minimale Gewebeschäden trotz hoher Virustiter im Herzen⁷¹. Zudem ist bekannt, dass autoreaktive CTLs auch nicht infizierte Kardiomyozyten lysieren und somit zu einer Schädigung des Gewebes beitragen^{26, 70}.

1.2.4 Autoimmunmyokarditis

Der Charakter der immunologischen Reaktion und die Ausprägung der Myokarditis sind in großem Maße vom genetischen Hintergrund des infizierten Mausstamms abhängig. Beispielsweise entwickeln die meisten BALB/c- und alle DBA/2-Mäuse nach Infektion mit CVB3 eine akute kardiale Inflammation, die in etwa zwei Wochen andauert. Im Gegensatz dazu zeigen infizierte Tiere der A-Stämme bis 56 Tage nach der Infektion das Bild einer aktiven Myokarditis und darüber hinaus eine deutlich höhere myokardiale Schädigung im

Vergleich zu den beiden anderen Stämmen. Überdies konnte in BALB/c-, aber nicht in DBA/2-Mäusen, eine ausgedehnte Apoptose sowohl in den inflammatorischen Infiltraten als auch in Kardiomyozyten außerhalb der inflammatorischen Foki detektiert werden⁷². Die Myokarditis ist in BALB/c-Mäusen vor allem von Lyt2(+)-Zellen (CTL), in DBA/2-Mäusen von L3T4(+)-Zellen (T_H) und in A-Stämmen wiederum von beiden Zellpopulationen abhängig. Herzreaktive Autoantikörper hingegen können in A- und in BALB/c-Mäusen nachgewiesen werden, nicht jedoch in DBA/2-Mäusen²⁶. Der Nachweis herzreaktiver Antikörper in CVB3-infizierten Mäusen weist auf eine Beteiligung von Autoimmunitätsmechanismen in der Pathogenese der murinen Myokarditis hin⁷³ und tatsächlich kann in einigen Stämmen die virale Infektion eine Autoimmunmyokarditis verursachen, die durch herzreaktive Autoantikörper und fortgesetzte Schädigung des Herzgewebes mit einhergehender Beeinträchtigung der Herzfunktion charakterisiert ist. Dieses Vorkommen von herzreaktiven IgG-Autoantikörpern wurde z. B. in BALB/c-Mäusen und den A-Stämmen (z. B. A.SW, SWR), nicht jedoch in DBA/2- oder C57BL/6-Mäusen beobachtet^{25, 26, 72, 73}.

Als erstes Autoantigen wurde das kardiale Myosin identifiziert⁷⁴, das in prädisponierten Inzuchtstämmen auch ohne die Beteiligung von CVB3 eine schwere Myokarditis und hohe Antikörpertiter hervorrufen kann⁷⁵. Die im Verlauf einer virusinduzierten Myokarditis stattfindende Gewebeschädigung im Herzen führt hier möglicherweise zu einer Freilegung versteckter kardialer Epitope; die autoaggressive Reaktion könnte aber auch auf molekulares Mimikry zurückzuführen sein, bei dem virusspezifische Antikörper mit herzspezifischen Epitopen kreuzreagieren^{76, 77}. Auch in Patienten mit akuter Myokarditis⁷⁸ und DCM konnten Autoantikörper gegen verschiedene kardiale Proteine nachgewiesen werden darunter der Adennukleotid-Translokator (ANT, s. Kapitel 1.3.4)^{79, 80}, Myosin^{81, 82}, der Calcium-Kanal⁸³ und Aktin⁸⁴.

Schwimmbeck *et al.* fanden homologe Sequenzen zwischen CVB3 und dem ANT. Antikörper, die mit synthetischen Peptiden generiert wurden, und auch Serumproben von Patienten mit Myokarditis und DCM hybridisierten im Western Blot sowohl mit ANT (50 % der Seren) als auch dem VP1-Protein von CVB3 (35 %) ⁸⁵. Weitere Untersuchungen ergaben, dass autoreaktive ANT-Antikörper die kardiale Funktion beeinträchtigen⁸⁶. Die Autoantikörper sind organ- und konformationspezifisch⁸⁷ und inhibieren durch Blockade der Substratbindestelle des ANT den Nukleotidaustausch *in vitro*⁸⁸ und *in vivo*^{89, 90}. Für Myosin-Antikörper konnte eine Induktion der Lyse von Kardiomyozyten gezeigt werden^{76, 91}. Die durch funktionell aktive Autoantikörper hervorgerufene fortdauernde Beeinträchtigung der kardialen Funktion schlägt sich in einer Verschlechterung der Prognose bei Nachweis von Autoantikörpern auch ohne Viruspersistenz im Patienten nieder^{82, 92}.

1.3 Die mitochondriale Funktion

1.3.1 Struktur und Funktion der Mitochondrien

Mitochondrien sind intrazelluläre Organellen von etwa 2 µm Länge, die in allen eukaryotischen Zellen mit Ausnahme der Erythrozyten vorkommen. Durch die Kombination einer glatten äußeren Membran mit einer stark gefalteten inneren Membran, die Einstülpungen werden Cristae genannt, entstehen zwei getrennte Kompartimente: der Matrixraum, umgeben von der inneren Membran, und der Intermembranraum zwischen den beiden Membranen. Sowohl die Anzahl der Mitochondrien als auch die Zahl und die Form der Cristae, die der Oberflächenvergrößerung dienen, sind in den verschiedenen Geweben unterschiedlich. Dabei besitzen Gewebe mit sehr intensivem oxidativen Stoffwechsel, wie beispielsweise das Herzgewebe, eine große Anzahl an Mitochondrien mit sehr vielen Cristae³¹⁹.

Die äußere Membran der Mitochondrien ist durch das Vorhandensein von Porinporen (*voltage-dependent anion channel*, VDAC) für Moleküle bis zu einem Molekulargewicht von ca. 5 kDa durchlässig. Größere Moleküle können die Membran nur über aktiven Transport durch mitochondriale Transportproteine passieren.

Die innere Membran der Mitochondrien ist impermeabel und für die mitochondrialen Substrate und Metabolite existieren hochspezifische Translokatoren, die einen kontrollierten Transport auch gegen ein Konzentrationsgefälle ermöglichen. Neben diesen Transportern, z. B. der Phosphat-Transporter und der ANT (s. Kapitel 1.3.4), sind in die innere Membran die Multienzymkomplexe der Atmungskette (s. Kapitel 1.3.2) eingebettet. Im Intermembranraum sind viele ATP-verbrauchende Enzyme wie die Acyl-CoA-Synthase und die Creatinkinase (CK) lokalisiert. An spezifischen Kontaktstellen ist die Außenmembran mit der Innenmembran verknüpft⁹³ und bildet Mikrokompartimente, in denen ATP-verbrauchende Reaktionen mit ATP-produzierenden Prozessen effizient verbunden sind⁹⁴⁻⁹⁷.

Innerhalb der mitochondrialen Matrix befinden sich Proteine verschiedener Enzymsysteme, z. B. die Enzyme der β -Oxidation und des Citratzyklus. Neben dieser Gruppe der Proteine, die vor allem am Energiestoffwechsel beteiligt sind, befinden sich in der Matrix die mitochondriale DNA (mtDNA) und in großer Zahl Proteine, die an der Transkription, Replikation und Reparatur der mtDNA sowie der Translation und Proteinfaltung beteiligt sind⁹⁸.

Die Bezeichnung der Mitochondrien als „biochemische Kraftwerke der Zelle“ basiert auf ihrer Rolle in der Produktion von ATP, das die Zelle für alle wichtigen Reaktionen wie die Synthese von Nukleinsäuren, Proteinen, Lipiden sowie Kohlenhydraten, den Aufbau von Ionengradienten und vor allem bei der Muskelkontraktion benötigt. In einer aeroben Zelle werden ungefähr 95 % des ATP durch die oxidative Phosphorylierung (s. Kapitel 1.3.2)

regeneriert, während nur 5 % in der Glykolyse entstehen ³²⁰. Unter anaeroben Bedingungen oder bei Defekten in der mitochondrialen Funktion wird die glykolytische ATP-Synthese kompensatorisch erhöht, es wird mehr Laktat gebildet und die Konzentration von energiereichem Creatinphosphat (PCr) im Cytosol sinkt.

Darüber hinaus spielen die Mitochondrien bei der Regulation der Mitochondrien-abhängigen Apoptose eine entscheidende Rolle (s. Kapitel 1.3.3).

1.3.2 Die oxidative Phosphorylierung

Die wichtigste Funktion der Mitochondrien ist die Bereitstellung von ATP über die oxidative Phosphorylierung von ADP. An den Multienzymkomplexen der Atmungskette werden in einer Reihe von nacheinander stattfindenden Redoxreaktionen Elektronen von Elektronendonoren mit höherem Energieniveau auf Elektronenakzeptoren mit niedrigerem Energieniveau übertragen. Die durch den Elektronenfluss freigesetzte Energie wird gleichzeitig genutzt, um Protonen aus der mitochondrialen Matrix über die innere Membran in den Intermembranraum zu transportieren. Dies erzeugt gespeicherte Energie in Form eines elektrochemischen Protonengradienten, der sich aus einem pH-Gradienten und einem elektrischen Potential über der Membran zusammensetzt. Über ein ATP-synthetisierendes Protein (F_0F_1 -ATPase) können die Protonen entlang des Gradienten zurückfließen, wobei die ATP-Produktion aus ADP und Phosphat angetrieben wird. Die Reduktionsäquivalente von NADH, FMN_{H₂} und FADH₂ stammen aus dem mitochondrialen Citratzyklus, dem Abbau von Fettsäuren und der Glykolyse. Um die in der cytosolisch stattfindenden Glykolyse entstehenden Reduktionsäquivalente der mitochondrialen Atmungskette zuzuführen, existieren mitochondriale Shuttle-Mechanismen ³¹⁹.

Das System der oxidativen Phosphorylierung, in Abbildung 1.1 schematisch dargestellt, besteht aus den vier Multienzymkomplexen der Atmungskette und der ATP-Synthase (F_0F_1 -ATPase). Weiter sind auch mitochondriale Transportproteine wie der ANT und der Phosphat-Carrier beteiligt, die die für die ATP-Synthase-Reaktion benötigten Substrate ADP und Phosphat zur Verfügung stellen.

Die vier Multienzymkomplexe der Atmungskette sind:

Komplex I, die NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase oder NADH-Dehydrogenase, ist mit ungefähr 40 Untereinheiten, davon sieben mitochondrial kodiert, der größte der Atmungskettenkomplexe. Er katalysiert die Reduktion von Ubichinon zu Ubichinol durch Transfer der Elektronen von NADH, welches vor allem aus dem Citratzyklus stammt.

Komplex II, die Succinat:Ubichinon-Oxidoreduktase oder Succinat-Dehydrogenase ist auch Teil des Citratzyklus. Er besteht aus nur vier nukleär kodierten Untereinheiten und enthält die prosthetische Gruppe FAD. Die Succinat-Dehydrogenase katalysiert die

Oxidation von Succinat zu Fumarat; hierbei werden die Elektronen auf Ubichinon transferiert. Komplex II ist der einzige Komplex, der keine Protonen transferiert, da hier die Änderung der freien Energie bei der Übertragung von Elektronen zu gering ist.

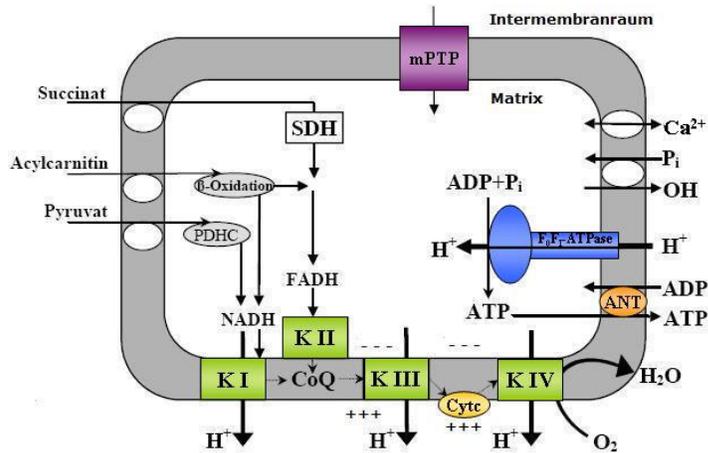


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der oxidativen Phosphorylierung an der inneren mitochondrialen Membran (modifiziert nach ³²¹). K I – Komplex I, K II – Komplex II, K III – Komplex III, K IV – Komplex IV, CoQ – Coenzym Q (Ubichinon), Cyt c – Cytochrom c, SDH – Succinat-Dehydrogenase, PDHC – Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex, mPTP – mitochondriale Permeabilitäts-pore, P_i – anorganisches Phosphat, Ca²⁺ - Calcium-Ionen, H⁺ - Protonen

Komplex III, die Ubichinol: Cytochrom-c-Oxidoreduktase oder Cytochrom c-Reduktase besteht aus elf Untereinheiten, von denen eine mitochondrial kodiert ist. Hier werden in einer als Q-Zyklus bezeichneten Reaktionsfolge Elektronen von Ubichinol übertragen, um Cytochrom c zu reduzieren.

Komplex IV, die Cytochrom c:O₂-Oxidoreduktase, besser bekannt als Cytochrom c-Oxidase (COX), besteht aus 13 Untereinheiten, von denen drei mitochondrial kodiert sind. Am letzten Komplex der Elektronentransportkette werden vier Elektronen von Cytochrom c-Molekülen auf molekularen Sauerstoff übertragen und zusammen mit vier Protonen aus der Matrix zwei Wassermoleküle gebildet.

Die F₀F₁-ATPase, manchmal auch als Komplex V bezeichnet, besteht aus 14 Untereinheiten, von denen zwei mitochondrial kodiert werden. Über einen mechanischen Rotationsmechanismus treiben Protonen, die durch den Protonenkanal der F₀F₁-ATPase entlang des Gradienten über die innere mitochondriale Membran in die Matrix zurückfließen, die Rotation der ATP-synthetisierenden Untereinheit und damit die Kondensationsreaktion von ADP und Phosphat zu ATP an. Das in der Matrix gebildete ATP wird anschließend über den ANT im Austausch für cytosolisches ADP ausgeschleust (s. Kapitel 1.3.4).

Die Oxidation der Substrate und die Phosphorylierung von ADP sind über den elektrochemischen Protonengradienten eng miteinander gekoppelt, so dass die Atmungsgeschwindigkeit über die Verfügbarkeit von Sauerstoff, ADP und Substrat kontrolliert wird⁹⁹.

Spezifische Inhibitoren können die einzelnen Enzyme der Atmungskette in ihrer Funktion hemmen und werden in der Analyse der Atmungskettenaktivität zur gezielten Untersuchung der einzelnen Enzymkomplexe genutzt. Hier sind vor allem Rotenon (Komplex I), Malonat (Komplex II), Antimycin A (Komplex III), Cyanide (Komplex IV), Oligomycin (F_0F_1 -ATPase) und Atractylosid (ATR) bzw. Carboxyatractylosid (CAT) (ANT) zu nennen.

1.3.3 Die mitochondriale Apoptose

Sind Zellen beschädigt oder werden zu stark belastet, können sie den programmierten Zelltod von innen induzieren. Die intrinsische, Mitochondrien-abhängige Apoptose ist durch die Permeabilisierung der Mitochondrien durch Bildung einer nicht spezifischen Pore (*mitochondrial permeability transition pore*, mPTP) innerhalb der inneren mitochondrialen Membran charakterisiert. Die molekulare Struktur und Identität der mPTP ist bisher nicht geklärt (s. auch Abbildung 1.5), jedoch ermöglicht sie den Austausch von kleinen geladen Teilchen, Wasser und Molekülen bis zu einer Größe von 1,5 kDa¹⁰⁰. Dadurch erhöht sich die Permeabilität der inneren Mitochondrienmembran, die zur Schwellung der Mitochondrien und schließlich der Ruptur der äußeren Mitochondrienmembran führt. Ins Cytosol freigesetzte Intermembranproteine wie Cytochrom c, AIF und Smac/DIABLO treiben den Untergang der Zelle voran. Cytochrom c bindet und aktiviert Apaf-1, das über eine Konformationsänderung mit der Pro-Caspase-9, eine inaktive Cysteinprotease, assoziieren kann (Abbildung 1.2). Die dadurch ausgelöste autolytische Aktivierung der Caspase-9 führt zu Induktion der Caspase-Kaskade, an deren Ende die aktivierte Caspase-3 durch Spaltung verschiedener zellulärer Moleküle wie Lamin und Aktin sowie durch Aktivierung von DNasen zum Zelltod beiträgt^{101, 102}. Mitochondrien können zudem extrinsische, apoptogene Signale über die Caspase-8 amplifizieren¹⁰³.

An der Regulation der Porenbildung sind die Proteine der Bcl-2-Familie beteiligt. Diese enthält pro- (z. B. Bad, Bax und Bid) und antiapoptotisch (z. B. Bcl-2 und Bcl-X_L) wirkende Mitglieder und das Schicksal der Zelle ist abhängig vom Gleichgewicht zwischen diesen Gruppen. Die proapoptotischen Mitglieder der Bcl-2-Proteine befinden sich häufig im Cytosol und agieren als Sensoren für zelluläre Schädigung und Stress. Dann relokalisieren sie an die Oberfläche der Mitochondrien und interagieren mit den dort vorhandenen antiapoptotischen Proteinen. Diese Interaktion beeinträchtigt die normale Funktion der antiapoptotischen Bcl-2-Proteine und führt zur Bildung der mPTP¹⁰⁰.

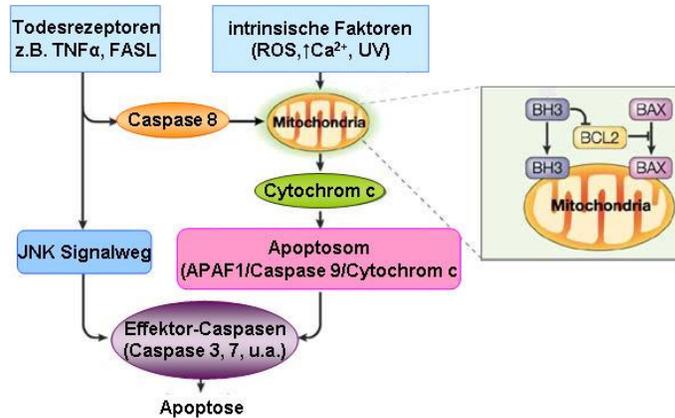


Abbildung 1.2: Vereinfachte Darstellung der apoptotischen Signalwege (nach ¹⁰³). Der extrinsische Todesrezeptor-abhängige Weg aktiviert die Effektor-Caspasen entweder direkt über JNK (*c-Jun-N-terminal kinase*) oder über den intrinsischen Apoptoseweg der Mitochondrien. Der intrinsische Weg resultiert in der Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien, die zur Bildung des Apoptosoms und der anschließenden Aktivierung der Effektor-Caspasen führt. Apoptogene Stimuli führen zur Translokation von BH3-Proteinen zu den Mitochondrien, die direkt proapoptotische Mitglieder der Bcl-2-Familie, wie Bax und Bak, aktiviert. Diese bilden eine mitochondriale Permeabilitätspore und unterdrücken zusätzlich die Fähigkeit der antiapoptotischen Bcl-2-Proteine, wie Bcl-2 und Bcl-X_L, die Translokation proapoptotischer Moleküle zu verhindern. FASL - FAS-Ligand; ROS - reaktive Sauerstoffspezies; TNFα - Tumor Nekrose Faktor alpha; UV - ultraviolettes Licht; Ca²⁺ - Calcium-Ionen.

Weitere regulatorische Faktoren sind reaktive Sauerstoffspezies (ROS), die Lipide, Proteine und Nukleinsäuren oxidieren. Die erhöhte oxidative Schädigung der Zelle erzeugt ein positives Feedback an die Apoptose ¹⁰⁴. Es wurde gezeigt, dass antiapoptotische Proteine wie Bcl-2 und Bcl-X_L die Bildung von ROS verhindern ¹⁰⁵ und den Protonenfluss, das Membranpotential und die ATP-Produktion stabilisieren ^{106, 107}. Neben der Reduktion des Membranpotentials regulieren somit auch durch cytotoxischen Stress aktivierte *second messenger* wie ROS und NO (Stickstoffmonoxid) die Öffnung mPTP.

Darüber hinaus haben die mitochondriale Ca²⁺-Konzentration, die Alkalisierung der Matrix ¹⁰⁸ sowie Adeninnukleotide ¹⁰² Einfluss auf die mPTP.

1.3.4 Der Adeninnukleotid-Translokator

1.3.4.1 *Struktur und Funktion des ANT*

Der Adeninnukleotid-Translokator (ANT) ist der einzige bekannte Carrier, der mitochondriales ATP und cytosolisches ADP über die innere Mitochondrienmembran austauscht. Er gehört zur Familie der mitochondrialen Carrier (MCF), die spezifisch

Metabolite über die innere Mitochondrienmembran transportieren. Den Mitgliedern dieser Familie ist, basierend auf der hohen Homologie ihrer Aminosäuresequenzen, eine dreigliedrige Struktur mit sechs Transmembranregionen gemeinsam^{109, 110}. Der ANT liegt als Homodimer aus zwei identischen Untereinheiten von 30 kDa in der inneren Mitochondrienmembran vor¹¹¹. Jedes Monomer besteht aus drei separaten, strukturell verwandten Modulen von 100 Aminosäuren (Abbildung 1.3). Jedes Modul setzt sich zusammen aus zwei hydrophoben, transmembranären α -Helices (22 aa), die durch hydrophile, matrixexponierte, helikale Loops (40-50 aa) verbunden sind. Der Aminoterminus ragt in den Intermembranraum. Die Nukleotidbindestelle befindet sich im hydrophoben Abschnitt der zweiten Domäne¹¹².

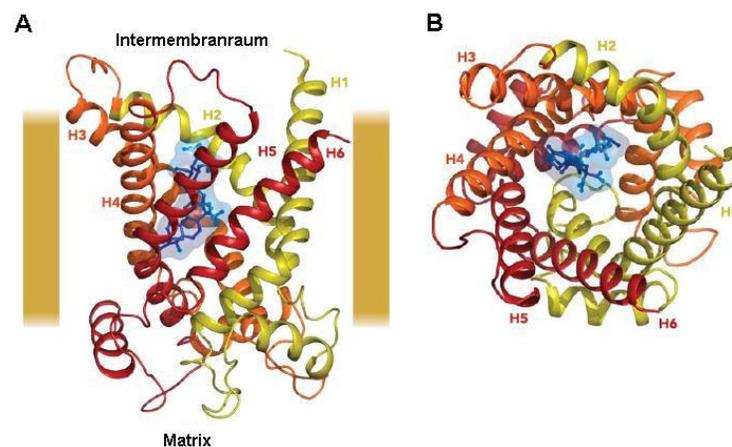


Abbildung 1.3: Struktur des ANT im Komplex mit Carboxyatractylosid (aus¹¹³). Schleifen-Darstellung der sechs Transmembranhelices (H1-H6). Das erste, zweite und dritte Modul sind jeweils in gelb, orange und rot eingefärbt. CAT ist in blau dargestellt. (A) Laterale Ansicht. (B) Ansicht vom Intermembranraum.

Die Substratbindung auf der cytosolischen (*c-state*) und der matrixzugewandten Seite (*m-state*) löst eine drastische Konformationsänderung aus, die die hydrophilen Nukleotide durch den Proteinkanal schleust¹¹⁴. Über einen Antiport-Mechanismus (Abbildung 1.4) werden ADP und ATP im Verhältnis 1:1 ausgetauscht^{115, 116}. Der Transport ist hochspezifisch und wird getrieben durch die im Protonengradienten gespeicherte Energie in Richtung ATP-Export^{115, 117, 118}, ist aber grundsätzlich in beide Richtungen möglich^{119, 120}. Die Rate des Nukleotidaustauschs ist dabei abhängig vom Membranpotential, den ADP/ATP-Verhältnissen beiderseits der Membran, der Konzentration endogener Inhibitoren wie Acyl-CoA und der Aktivität des Transporters¹¹⁴. Die ANT-Aktivität kann durch Phosphorylierung an Tyrosin¹⁹⁴ reguliert werden und hat regulatorische Effekte auf die zelluläre Respiration¹²¹. Schon 1987 haben Kholodenko *et al.* beschrieben, dass unter physiologischen Bedingungen der ANT die oxidative Phosphorylierung reguliert¹²². Der

ANT spielt somit als Verbindungsglied zwischen mitochondrialer Energieproduktion und cytosolischem Energieverbrauch eine zentrale Rolle im Energiehaushalt der Zelle.

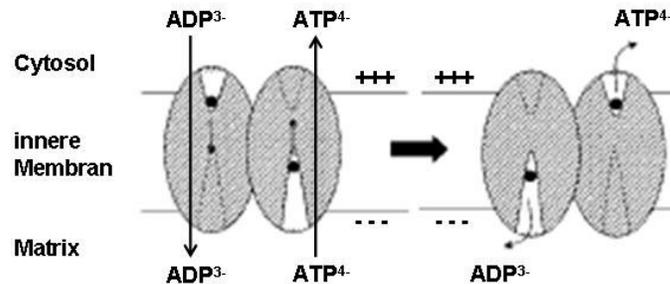


Abbildung 1.4: Adeninnukleotid-Transport durch den ANT (modifiziert nach ¹¹⁶). Darstellung der Untereinheiten der funktionellen Einheit des ANT in der inneren mitochondrialen Membran. Die beiden Untereinheiten sind anisotrop in cis-Konformation angeordnet, d. h. es gibt jeweils zwei gleichartige Bindungsstellen auf jeder Seite der Membran. Der ANT transportiert über einen Antiport-Mechanismus ein ADP^{3-} -Molekül von der cytosolischen Seite der inneren mitochondrialen Membran in die Matrix und gleichzeitig schleust er ein ATP^{4-} -Molekül heraus. Der Transport wird getrieben durch den Protonengradienten über der Membran und resultiert in einem einfachen Ladungsausgleich.

In stark energieverbrauchenden Geweben wie dem Herzmuskel ist der ANT mit einem Anteil von ca. 14 % am gesamten mitochondrialen Protein das am häufigsten vorkommende Protein der inneren Mitochondrienmembran ¹²³. Der ANT konnte sowohl im peripheren Teil der inneren Mitochondrienmembran als auch in den Cristae des Mitochondriums nachgewiesen werden ⁹⁵. Mittels ANT-Isotyp-spezifischer Antikörper und Sequenzanalyse des Aminoterminus konnten sowohl ANT1 als auch ANT2 in der Peripherie von kardialen Mitochondrien lokalisiert werden, während in den Cristae ausschließlich ANT2 vorkommt ¹²⁴.

Der ANT ist kernkodiert ¹²⁵ und die mRNA wird an cytosolischen Ribosomen translatiert. Da die Sequenz keine aminoterminal Präsequenz für die Translokation ins Mitochondrium enthält, liegt die Zielinformation des AAC in der Aminosäuresequenz selbst, wobei jedes der drei Module Informationen beisteuert ^{126, 127}. Der posttranslationale Transfer erfolgt als löslicher Komplex aus mehreren Proteinmolekülen ¹²⁸. Der Import in die innere Mitochondrienmembran findet über Interaktionen mit dem TOM-Komplex, Tim10 und Tim12 statt und ist abhängig vom Membranpotential ^{126, 127, 129}.

1.3.4.2 Die Isoformen des ANT

Im Menschen sind vier Isoformen des ANT und bisher sieben Pseudogene bekannt ¹³⁰⁻¹³⁶. Alle Isoformen bestehen aus 298 Aminosäuren und besitzen eine hohe Homologie

zueinander¹³². Die ANT-Gene sind in vier Exons und drei Introns unterteilt, wobei die Intronsequenzen in den extramembranären Loops 1, 4 und 5 liegen^{133, 137}. Unterschiede in den Promoter- und Intronregionen der ANT-Gene lassen auf eine individuelle regulatorische Kontrolle der Expression schließen¹³⁵. Die Gene sind auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert: ANT1 und ANT4 auf Chromosom 4, ANT2 auf dem langen Arm des X-Chromosoms und ANT3 in den pseudoautosomalen Regionen des X- und Y-Chromosoms^{134, 137, 138}. In *Saccharomyces cerevisiae* und in Nagern wurden bisher drei Isoformen unterschieden^{136, 139, 140}.

Die Isoformen des ANT werden in verschiedenen Geweben koexprimiert¹⁴¹. ANT1 ist mit einem Anteil von 70 % des Gesamt-ANT-Proteins¹⁴² die am stärksten vertretene Isoform vor allem im Herz- und Skelettmuskel sowie des Gehirns^{131, 137, 140, 141}. Innerhalb des Herzens unterscheidet sich die Expression von ANT1 und auch der anderen Isoformen nicht zwischen dem linken und dem rechten Ventrikel, dem Septum oder dem Atrium¹⁴². Für die ANT1-Isoform wurde beschrieben, dass sie an der mPTP (s. Kapitel 1.3.4.3) beteiligt ist, obwohl es bisher nicht endgültig geklärt ist, ob ANT1 ein Strukturelement der Pore ist oder lediglich eine regulatorische Funktion besitzt^{102, 143-149}. Baines und Molkentin haben kürzlich einen neuen Mechanismus vorgeschlagen, bei dem ANT1 den Zelltod durch die Hochregulation von Bax vermittelt, dies jedoch unabhängig von der mPTP ist¹⁵⁰. Neben seiner Funktion im Energiestoffwechsel und der Apoptose ist der ANT1 in vielfältige andere Prozesse involviert und interagiert mit Proteinen der Signaltransduktion¹⁵¹⁻¹⁵⁴ und auch viralen Proteinen^{155, 156}.

Der ANT2 bildet im Herz- und Skelettmuskel sowie dem Gehirn einen ungefähren Anteil von 25 % des Gesamt-ANT-Proteins. Im Unterschied zum ANT1 ist die ANT2-Expression in der Niere und in mitotisch aktiven Geweben wie Leber, Milz, Fibroblasten und Lymphozyten hoch (>50 %) ^{135, 137, 142}. Stepien *et al.* haben ebenfalls eine hohe ANT2-Expression in proliferierenden Myoblasten im frühen Stadium der Entwicklung beschrieben. In der finalen Entwicklungsstufe jedoch kommt es zu einem Anstieg der ANT1-Transkription bei gleichzeitiger Abnahme der ANT2-mRNA¹⁴¹, wobei es im Zuge der postnatalen Reifung des Herzens zu einer fünffachen Erhöhung der ANT-Aktivität kommt¹⁵⁷. Das ANT2-Gen ist wachstumsreguliert. Die Transkription nimmt zu, sobald ruhende Zellen durch Serum oder Wachstumsfaktoren stimuliert werden, nimmt hingegen in differenzierenden Zellen ab¹³⁰. Der Übergang von oxidativem zu glykolytischem Metabolismus ist begleitet von einer Induktion der ANT2-Expression¹⁵⁸, wahrscheinlich um cytosolisches ATP aus der Glykolyse ins Mitochondrium zu pumpen und so eine Sicherstellung der mitochondrialen energieabhängigen Funktionen zu gewährleisten¹²⁰. Für den ANT2 konnte eine Beteiligung am Apoptoseprozess nicht gezeigt werden¹⁵⁹.

Die ANT3-Isoform ist ubiquitär vorhanden, macht jedoch in allen Geweben nur zwischen 7 % (im Herz) und 29 % (in Fibroblasten) des Gesamt-ANT-Proteins aus^{138, 142}. Zamora *et al.* haben gezeigt, dass die Überexpression von ANT3 in HeLa-Zellen Apoptose induziert¹⁶⁰.

Die ANT4-Isoform wurde in sehr geringer Menge ausschließlich in Testes, Leber und Gehirn detektiert¹³⁶ und die Expression ist beschränkt auf reifende Gameten in adulten Mäusen¹⁶¹.

1.3.4.3 Der ANT1 und die mitochondriale Apoptose

Das Ausmaß der Beteiligung des ANT1 an der mPTP reicht von der Annahme, dass ANT1 selbst die Pore bildet oder zumindest ein struktureller Bestandteil der Pore ist bis hin zur These, dass ANT1 lediglich an der Regulation der Pore beteiligt ist. Ebenso ist heftig umstritten, welche anderen Proteine an der Bildung der mPTP teilnehmen (Abbildung 1.5)^{100, 102, 149}.

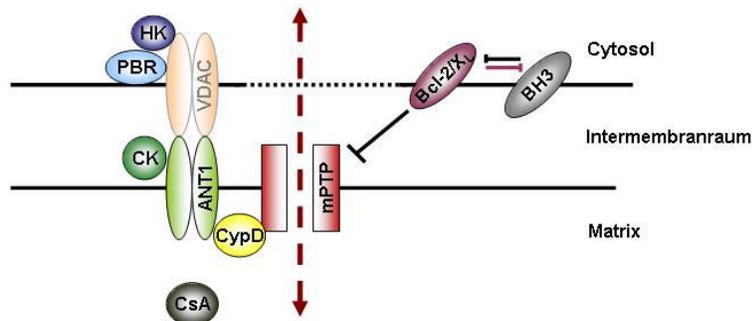


Abbildung 1.5: Komponenten des mPTP-Komplexes (nach¹⁰⁰). Die gegenwärtige Vorstellung geht davon aus, dass die Kernelemente der mPTP bisher noch nicht identifiziert wurden. Die regulatorische Funktion von Cyclophilin D (CypD) und ANT gelten als gesichert. Fraglich sind hingegen die Beteiligung der mitochondrialen Creatinkinase (CK), der Hexokinase II (HK) und des Benzodiazepin-Rezeptors (PBR). Bcl-2, Bcl-X_L und proapoptotische Proteine mit einer BH3-Domäne wie Bax und Bid sind ebenfalls als mögliche regulatorische Komponenten mit eingeschlossen. Die Beteiligung des VDAC, der lange Zeit zusammen mit ANT1 als porenbildendes Protein behandelt wurde, kann mittlerweile nahezu ausgeschlossen werden.

Für ANT1 ist gezeigt worden, dass er mit pro- und antiapoptotischen Proteinen wie Bax und Bcl-2 interagiert und dadurch regulierend auf die mPTP wirkt^{162, 163}. In Verbindung mit Bax bildet in Liposomen rekonstituiertes ANT1 nach Induktion mit Ca²⁺ und Atractylosid reversibel eine Kationen-spezifische Pore^{162, 164-166}, während sich Bcl-2 und auch Bcl-X_L stabilisierend auf die ADP/ATP-Transportaktivität auswirken^{107, 163, 167}. Darüber hinaus ist

ANT1 auch mit Cyclophilin D assoziiert, ein Enzym der Proteinfaltung mit Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerase-Aktivität, das ebenfalls mit der Induktion der mPTP in Verbindung gebracht wird¹⁵⁹. Oxidativer Stress und Thiolgruppen fördern die Bindung von mitochondrialem Cyclophilin D an ANT1. Diese Bindung unterstützt die durch Ca^{2+} -induzierte Konformationsänderung des ANT, die die Öffnung der mPTP im Herzen vorantreibt¹⁶⁸⁻¹⁷¹. Weitere Hinweise auf eine zumindest regulatorische Rolle des ANT wurden in verschiedensten Untersuchungen erbracht. So kann die durch Ca^{2+} -induzierte mPTP durch ATP revertiert werden. Des Weiteren können Liganden, die die c-Konformation des ANT stabilisieren (z. B. Atractylosid, Carboxyatractylosid) die mPTP induzieren, während Liganden, die die m-Konformation stabilisieren (z. B. Bongkrekensäure, ein Exotoxin aus *Pseudomonas cocovenenans*) die mPTP verhindern^{172, 173}. Es scheint, als habe der ANT1 eine metabolische Carrier-Konformation und eine apoptotische Poren-Konformation.

1.3.5 Der mitochondriale Energiestoffwechsel bei Herzerkrankungen

In DCM-Patienten konnten Änderungen in der oxidativen Phosphorylierung beobachtet werden, jedoch ist das Erscheinungsbild der Atmungskette in der DCM sehr heterogen. Buchwald *et al.* haben zunächst beschrieben, dass bei Patienten mit DCM der Gehalt an Cytochrom c und die Cytochrom-abhängigen Enzymaktivitäten der Komplexe III und IV verringert sind¹⁷⁴. Seither hat es zahlreiche weitere Beschreibungen der Atmungskettenenzyme in DCM-Patienten gegeben, wobei Einschränkungen vor allem in der Aktivität der Komplexe I und III sowie Komplex IV gefunden wurden¹⁷⁵⁻¹⁷⁸. Bornstein *et al.* haben allerdings eine erhebliche Zunahme in der Aktivität der Atmungskettenenzyme in idiopathischer DCM gemessen und diese Ergebnisse auf einen kompensatorischen Mechanismus zurückgeführt¹⁷⁹. Poliovirus-Infektion, ebenfalls ein Enterovirus wie CVB3, ist assoziiert mit einer rasanten Abnahme der zellulären Atmung durch die Inhibierung des Elektronenflusses an Komplex II der Atmungskette¹⁸⁰. Eine Abnahme der Aktivität von Komplex I und III wurde in *Trypanosoma*-infizierten Herzen sowohl in der akuten als auch der chronischen Infektion beobachtet¹⁸¹.

Patientenherzen mit DCM und Herzversagen sind zudem durch eine geringe Energiereserve charakterisiert. Sie spiegelt sich in einem verringerten Verhältnis von Creatinphosphat zu ATP wieder¹⁸²⁻¹⁸⁴, das sich als zuverlässiger prognostischer Faktor für die Mortalität von DCM-Patienten eignet¹⁸⁵. Der Mangel an energiereichem Creatinphosphat in DCM-Patienten ist auf eine kombinierte Abnahme des kardialen Creatins und der CK-Aktivität zurückzuführen¹⁸⁶, der Änderungen im Expressionsmuster der CK-Isoenzyme zugrunde liegen^{187, 188}. Veränderungen in der enzymatischen Aktivität und der

Expression der Isoformen der CK, insbesondere der dimeren cytosolischen CK, aber auch der oktameren mitochondrialen CK werden als signifikante Marker eines gestörten myokardialen Energiestoffwechsel betrachtet¹⁸⁸⁻¹⁹¹.

In Patienten mit DCM und Myokarditis kann eine Erhöhung der kardialen ANT-Expression um bis zu 48 % gemessen werden, die spezifisch für dieses Krankheitsbild ist und z. B. in ischämischer Kardiomyopathie nicht nachzuweisen ist^{192, 193}. Gleichzeitig ist jedoch die Transportkapazität des ANT in DCM-Hezen reduziert^{191, 192}. Weitere Untersuchungen zeigten, dass diese Veränderungen durch eine Verschiebung der Expression der ANT-Isoformen bedingt ist, bei der der Anteil am ANT-Gesamtprotein von ANT1 erhöht, der ANT2-Anteil verringert und der ANT3-Anteil unverändert ist^{194, 195}. In Patienten mit inflammatorischer Kardiomyopathie konnte der Isoformshift in der ANT-Expression mit enteroviraler Persistenz bei gleichzeitiger geringer Infiltration des Herzens mit Lymphozyten assoziiert werden¹⁹⁶. Die unterschiedlichen Expressionsmuster der ANT-Isoformen sind möglicherweise auf einen Kompensationsmechanismus zurückzuführen, da für ANT1 eine geringere Nukleotid-Transportrate als für ANT2 ermittelt wurde^{118, 139, 197}.

ANT1 *knock-out* Mäuse zeigen Charakteristika mitochondrialer Myopathie und Kardiomyopathie. Die Untersuchung des ANT1-defizienten Herzens ergab eine progressive kardiale Hypertrophie mit mitochondrialer Proliferation. Mitochondrien aus Muskel- und Herzzellen zeigten schwere Defekte in der oxidativen Phosphorylierung, die in einer erhöhten Produktion von ROS resultierte. Adulte *knock-out* Mäuse hatten zudem einen erhöhten Laktatspiegel im Blut, der auf das Vorliegen einer metabolischen Azidose hinweist. Übereinstimmend offenbarten diese Mäuse eine schwere Intoleranz gegenüber körperlichen Anstrengungen^{198, 199}. Die Eliminierung der ANT1-Isoform führt zudem zu einem Krankheitsbild, das dem der chronischen progressiven externen Ophthalmoplegie (CPEO), einer langsam verlaufenden mitochondrialen Myopathie, die vor allem die extraokularen Muskeln betrifft, entspricht²⁰⁰. Damit konform geht die Entdeckung von bisher fünf Punktmutationen im ANT1-Gen, nämlich A89D, L98P, D104G, A114P und V289M, in zumindest einigen Patienten mit autosomaler dominanter CPEO (adPEO)²⁰¹. Auch das Senger's Syndrom, einer autosomal rezessiven Erkrankung, die u. a. durch angeborene Herzdefekte charakterisiert ist, ist mit einer ANT1-Fehlfunktion verbunden²⁰². Sharer hat den ANT1 als einen relevanten Faktor in mitochondrialen Erkrankungen bezeichnet²⁰³.

Kardiale Überexpression von ANT1 in transgenen Ratten hat hingegen einen protektiven Effekt in Hypertonie-induzierter Herzinsuffizienz. Eine erhöhte ANT1-Expression war in der Lage trotz vergleichbarer hypertotonischer Bedingungen eine kardiale Hypertrophie zu verhindern und die linksventrikuläre Funktion zu verbessern. Die ANT1-Überexpression

führte zu einer Verringerung der Fibrose und einer Verbesserung der Gewebestruktur des Herzens und infolgedessen zu einer erhöhten Überlebensrate. Dieses war auf eine verbesserte mitochondriale Funktion und eine reduzierte Apoptose zurückzuführen²⁰⁴.

AAV (*adeno-associated virus*)-Vektor-basierte ANT1-Überexpression konnte aus ANT1 *knock-out* Mäusen isolierten Kardiomyozyten den normalen Phänotyp wieder herstellen. Die Transformation verbesserte den ADP/ATP-Austausch, die oxidative Phosphorylierung und sogar die histopathologischen Veränderungen²⁰⁵. Auch *Preconditioning*-Experimente haben gezeigt, dass eine erhöhte ANT-Expression möglicherweise Teil eines kardioprotektiven Programms ist. Beim *Preconditioning* werden Versuchstiere einzelnen oder mehreren kurzen subletalen Ischämie-Episoden oder hypothermischen Bedingungen ausgesetzt und so ein kardialer Schutz gegen eine volle ischämischen Attacke aufgebaut. Die Genexpression von Genen, die während der Ischämie herunterreguliert werden, wie Cytochrom c-Oxidase (COX), Cytochrom c, β -F₁-ATPase und ANT, wird stabilisiert und somit ein kardioprotektiver Effekt erzielt^{206, 207}.

1.4 Ziele der Arbeit

Das Herz benötigt große Mengen an Energie in Form von ATP, um seine kontraktile Funktion aufrechtzuerhalten. Einschränkungen des mitochondrialen Energiestoffwechsels wurden bisher bei Patienten mit DCM nachgewiesen, hingegen gibt es nur wenige Erkenntnisse zur akuten Myokarditis. Zum einen interessiert hier die Frage, inwiefern bereits zu einem frühen Zeitpunkt des chronischen Verlaufs möglicherweise ursächliche Veränderungen auftreten und zum anderen, ob die Art dieser Veränderungen möglicherweise prognostische Faktoren zur Unterscheidung zwischen akutem und chronischem Verlauf darstellen können. Dazu sollte im Rahmen dieser Arbeit der mitochondriale Energiestoffwechsel und die Apoptose in zwei murinen Myokarditis-Modellen, die sich in der genetischen Disposition für den chronischen Verlauf unterscheiden, beschrieben werden. Da der Krankheitsverlauf der viralen Myokarditis vom genetischen Hintergrund und dem immunologischen Status des Wirts beeinflusst wird, sollten weiterführend Faktoren der murinen Immunantwort und deren Einfluss auf die Komponenten des Energiestoffwechsels und der Apoptose identifiziert werden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollten die Auswirkungen einer gezielten Manipulation des mitochondrialen Systems auf den Verlauf der viralen Myokarditis untersucht werden. Herzspezifisch ANT1-transgene Mäuse wurden zunächst basal und anschließend im CVB3-Myokarditis-Modell charakterisiert und sowohl der mitochondriale Energiestoffwechsel als auch die Apoptose, beide verknüpft mit dem ANT1, untersucht. Zudem sollte mit diesem Tiermodell erstmals der Zusammenhang zwischen ANT1-Expression und enteroviraler Replikation beleuchtet werden.

In einem dritten Projekt sollte die Allgemeingültigkeit der These einer kardioprotektiven Wirkung einer hohen ANT1-Expression überprüft werden. Dazu wurde die ANT1-transgene Maus in einem experimentellen Diabetes Typ I-Modell eingesetzt und an ausgewählten Parametern die Auswirkungen der ANT1-Überexpression auf die Herzfunktion bei diabetischer Kardiomyopathie bestimmt.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Chemikalien

Chemikalien, die nicht gesondert aufgeführt sind, wurden von den Firmen Sigma-Aldrich, München, bzw. Merck, Darmstadt, bezogen.

Produkt	Firma
Agar, <i>noble</i>	DIFCO Laboratories, Lawrence/USA
Agarose	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf
Antimycin A	Sigma-Aldrich, München
BrdU (Bromdesoxyuridin)	BD Biosciences, Heidelberg
BSA (Bovines Serum Albumin)	Sigma-Aldrich, München
BSA (Bovines Serum Albumin), <i>fatty acid free</i>	Sigma-Aldrich, München
Collagenase Typ 2	Worthington, Lakewood/USA
Coomassie Brilliant Blue	Sigma-Aldrich, München
Cytochrom c	Sigma-Aldrich, München
Cytokine: IL-1 β , IFN β TNF α , TGF β	ImmunoTools, Friesoythe R & D Systems, Wiesbaden
DCPIP (Dichloroindophenol)	Sigma-Aldrich, München
Decylubichinon	Sigma-Aldrich, München
DEPC (Diethylpyrocarbonate)-Wasser, RNase-frei	USB Corporation, Cleveland/USA
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich, München
[³² P]-dCTP	Amersham-Buchler, Braunschweig
DMEM, <i>high glucose</i> , ohne L-Glutamin	PAA, Pasching/A
DMEM, <i>low glucose</i>	GIBCO/Invitrogen, Darmstadt
dNTP Mix	ABgene, Epsom/UK
dNTP Set	Rapidozym, Berlin
n-Dodecyl- β -D-Maltosid	Sigma-Aldrich, München
Eagle-Pulver	Invitrogen, Darmstadt
Express Hyb-Hybridisierungslösung	Clontech, Mountain View/USA
FBS Gold (<i>Fetal Bovine Serum</i>)	PAA, Pasching/A
Fibronektin, 0,1 % Lösung	Sigma-Aldrich, München
Formaldehyd	Sigma-Aldrich, München
Formamid	Fluka, Buchs/CH
FUDR (5-Fluoro-2'-deoxyuridine)	Sigma-Aldrich, München
L-Glutamin	Invitrogen, Darmstadt
HBSS (<i>Hank's Buffered Salt Solution</i>)	GIBCO/Invitrogen, Darmstadt

Produkt	Firma
HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)	Roth, Karlsruhe
Lithiumborohydrid	Sigma-Aldrich, München
Magermilchpulver	Roth, Karlsruhe
Malonat	Sigma-Aldrich, München
MOPS (6-Morpholinpropansulfonsäure)	Fluka, Buchs/CH
Natrium-Ascorbat	Sigma-Aldrich, München
Natriumcitrat	Sigma-Aldrich, München
Natrium-Succinat	Sigma-Aldrich, München
Neutralrot	Merck, Darmstadt
NADH	Sigma-Aldrich, München
NuPAGE LDS <i>Sample Buffer</i>	Invitrogen, Darmstadt
Nystatin	Invitrogen, Darmstadt
PBS Dulbecco's (1x, ohne Ca ²⁺ & Mg ²⁺)	PAA, Pasching/A
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin
peqGOLD 1 kb DNA-Leiter	Peqlab, Erlangen
peqGOLD 100 bp DNA-Leiter Plus	Peqlab, Erlangen
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich, München
Random Hexamers	Promega, Mannheim
RNase Away	Fisher Scientific, Schwerte
RNasin RNase Inhibitor Gold	Peqlab, Erlangen
Rotenon	Sigma-Aldrich, München
SeeBlue Plus II Pre-stained Standard	Invitrogen, Darmstadt
Sephadex G-50 Medium	Sigma-Aldrich, München
Streptozotocin	Sigma-Aldrich, München
Sucrose	Sigma-Aldrich, München
Triton X-100	Sigma-Aldrich, München
Trizma [®] Base	Sigma-Aldrich, München
TRIzol [®] Reagent	Invitrogen, Darmstadt
Trypsin	GIBCO/Invitrogen, Darmstadt
Trypsin/EDTA	PAA, Pasching/A
Ubichinon	Sigma-Aldrich, München

2.2 Puffer und Stammlösungen

Die Lösungen für den routinemäßigen Gebrauch wurden nach Sambrook *et al.*³²² hergestellt. Die Chemikalien wurden je nach Bedarf mit bidestilliertem (H₂O bidest.) oder sterilem Wasser angesetzt.

Antimycin A Stocklösung

50 mg/ml Antimycin A in Ethanol (100 %)

Blockpuffer für Western Blot (1×)

1× TBS, 0,1 % Tween[®] 20, 5 % Milchpulver (w/v)

Citratpuffer

0,1 M Natriumcitrat, pH 4,5

Collagenase Stammlösung

200 mg Collagenase in 20 ml HBSS, sterilfiltrieren

Coomassie-Entfärbelösung

10 % Essigsäure, 30 % Ethanol

Coomassie-Färbelösung

0,2 % Coomassie-Brilliant Blau R250 (w/v), 10 % Essigsäure, 30 % Methanol

Cytochrom c (oxidiert) Stocklösung

5 mM Cytochrom c in 10 mM KH₂PO₄

Cytochrom c (reduziert) Stocklösung

5 mM Cytochrom c (oxidiert) in KH₂PO₄, Ascorbat

Cytokine (Stocklösung)

Cytokine wurden in 1 ml sterilem Wasser gelöst, sterilfiltriert und bei -20 °C gelagert.

DCPIP Stocklösung

100 mM DCPIP in H₂O bidest.

Decylubichinon (oxidiert) Stocklösung

100 mM Decylubichinon in Ethanol (100 %)

Decylubichinon (reduziert) Stocklösung

20 mM Decylubichinon (oxidiert) in Ethanol, Lithiumborhydrid, HCl

Denaturierungslösung

1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH

Desoxycholat-Wasser

0,1 % Desoxycholat (w/v), 10 mg/ml BSA (*fatty acid free*)

DNA-Ladepuffer (10×)

50 % Glycerol, 0,4 % Bromphenolblau (w/v)

Duodecylmaltosid Stocklösung

100 mM Duodecylmaltosid in H₂O bidest.

Eagle-Overlay

9,61 g Eagle-Pulver, 0,5 ml Nystatin, 1 Mio IE Penicillin, 759 U/mg Streptomycin, 1,7 g Natriumhydrogencarbonat, ad 750 ml H₂O

FUDR Stocklösung

2 mM FUDR in H₂O bidest.

KCN Stocklösung

500 mM KCN in H₂O bidest.

Komplex I-Puffer

10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mg/ml BSA, 200 µM NADH, 0,24 mM KCN, 2 µg/ml Antimycin A, 80 µM Decylubichinon

Komplex II-Puffer

50 mM Tris-HCl pH 7,5, 20 mM Succinat, 2 µg/ml Antimycin A, 2 µg/ml Rotenon, 2 mM KCN, 50 µM DCPIP, 50 µM Ubichinon

Komplex III-Puffer

10 mM Kaliumphosphat pH 7,55, 2 mM EDTA, 2,4 mM KCN, 40 µM Rotenon, 40 µM oxidiertes Cytochrom c, 80 µM reduziertes Decylubichinon

Komplex IV-Puffer

10 mM KH₂PO₄ pH 6,5, 1 mg/ml BSA, 0,3 M Sucrose, 2,5 mM Duodecylmaltosid, 40 µM reduziertes Cytochrom c

Laufpuffer

50 ml 20× NuPAGE MES SDS *Running Buffer*, ad 1 l H₂O bidest.

Lysispuffer für DNA

50 mM Tris pH 8,0, 100 mM EDTA pH 8,0, 100 mM NaCl, 1 % SDS

Lysispuffer für Proteine

20 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM NaCl, 5 mM EDTA, 3 mM MgCl₂, 0,5 % Triton X-100, 1 % Protease Inhibitor Cocktail

Mitochondrien-Puffer

0,3 M Sucrose, 5 mM MOPS, 1 mM EGTA, 1 mg/ml BSA, pH 7,4 (KOH)

MOPS-Puffer (10×)

0,2 M MOPS, 50 mM Natriumacetat, 10 mM EDTA pH 7,0

NADH Stocklösung

100 mM NADH in 10 mM Tris-HCl pH 8,5

Proteinase K

10 mg/ml Proteinase K, 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM CaCl₂

Protein-Ladepuffer (2×)

50 % NuPAGE LDS *Sample Buffer* 4×, 10 % 1 M DTT

RNA-Ladepuffer

5 % Glycerol, 0,04 % Bromphenolblau (w/v), 0,05 % Ethidiumbromid (10 mg/ml) (w/v)

RNA-Probenpuffer

720 µl Formamid, 80 µl gesättigte Bromphenolblau-Lösung, 180 µl 37 %-ige Formaldehyd-Lösung, 160 µl 10× MOPS-Puffer, 1,5 µl Ethidiumbromid, ad 1,5 ml H₂O bidest.

RNaseA Stocklösung

4 mg/ml RNaseA in H₂O bidest.

Rotenon Stocklösung

0,5 mg/ml Rotenon in DMSO

SSC (20×)

3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat, pH 7,0

Stripping-Puffer für Nukleinsäure-Sonden

0,5 % SDS

Stripping-Puffer für Antikörper

15 g Glycin, 1 % SDS, 0,001 % Tween 20, pH 3,2, ad 1 l H₂O bidest.

TAE (50×)

2 M Tris, 5,7 % Essigsäure, 50 mM EDTA, pH 8,3

TBS (10×)

0,5 mM Tris, 1,38 M NaCl, 27 mM KCl, pH 7,4

TBST (Waschpuffer für Western Blot)

1× TBS, 0,1 % Tween® 20

TE-Puffer (10×) pH 7,4

100 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 7,4

Transferpuffer (1×)

50 ml NuPAGE *Transfer Buffer*, 20 % Methanol, ad 1 l H₂O bidest.

Trypsin-Lösung

15 mg Trypsin in 25 ml HBSS

Ubichinon Stocklösung

10 mM Ubichinon in Ethanol (100 %)

Waschlösung I für Hybridisierung von Nukleinsäuren

2× SSC, 0,05 % SDS

Waschlösung II für Hybridisierung von Nukleinsäuren

0,1× SSC, 0,1 % SDS

2.3 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme

Produkt	Firma
Ambion RPA II Kit	Ambion Europe Ltd., Huntingdon/UK
BCA Protein Assay Kit	Pierce, Rockford/USA
CK (Nac) Granutest 2.5	Merck, Darmstadt
DirectPCR Lyse Reagenz	Peqlab, Erlangen
ECL Plus Western Blotting Detection Reagents	Amersham, München
High Pure PCR Cleanup Micro Kit	Roche, Mannheim
QIAGEN Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
Rodeo ECL Western Blotting Detection Reagents	USB Corporation, Cleveland/USA

2.4 Enzyme

Enzyme wurden mit den mitgelieferten Puffern nach Angaben des Herstellers eingesetzt.

Enzym	Firma
AmpliTaq DNA Polymerase	Applied Biosystems, Darmstadt
<i>Bam</i> HI	New England Biolab, Frankfurt a. M.
peqGold DNase I	Peqlab, Erlangen
<i>Hinc</i> II	New England Biolab, Frankfurt a. M.
MMLV Reverse Transkriptase	Invitrogen, Darmstadt
Platinum <i>High-Fidelity Taq</i> Polymerase	Invitrogen, Darmstadt
Proteinase K	Promega, Mannheim
RNaseA	Serva, Heidelberg
<i>Sac</i> I	New England Biolab, Frankfurt a. M.
<i>Sma</i> I	New England Biolab, Frankfurt a. M.
<i>Ssp</i> I	Roche, Mannheim
Superscript II Reverse Transkriptase	Invitrogen, Darmstadt
TaqMan Universal PCR MasterMix UNG	Applied Biosystems, Darmstadt
Trypsin/EDTA	Invitrogen, Darmstadt

2.5 Antikörper

2.5.1 Primärantikörper

Antikörper	Firma
Rabbit anti-ANT	Pineda, Berlin
Mouse anti-Bax (B-9)	Santa Cruz Biotech, Heidelberg
Rabbit anti-Bcl-2	Novus Biologicals, Cambridge/UK
Rabbit anti-Caspase-3	BD Biosciences, Heidelberg
Rabbit anti-Catalase	Acris, Herford
Rabbit anti-Superoxid Dismutase 2	Abcam, Cambridge/UK

Die Antikörper gegen die M- und B-Isoform der cytosolischen CK wurden freundlicherweise von Dr. Uwe Schlattner zur Verfügung gestellt.

2.5.2 Sekundärantikörper

Antikörper	Firma
Anti-Kaninchen IgG HRP-Konjugat	Dako, Glostrup/DK
Anti-Maus IgG HRP-Konjugat	Dako, Glostrup,/DK

2.6 Nukleinsäuren

2.6.1 Synthetische Oligonukleotide

Alle synthetische Oligonukleotide wurden von der Firma TibMolbiol, Berlin, bezogen und in DNA- und RNA-freiem H₂O bidest. gelöst.

2.6.1.1 *Genotypisierung der Maus*

Primerbezeichnung	Nukleotidsequenz 5' → 3'
MK10BANT	GTG GTG CCT CGT TCC AGC TG
ANT1 36	CAG TTT GAC CCT CTC GAT CGG
βGlobin5'	CCA ATC TGC TCA CAC AGG A
βGlobin3'	GAG GCT GTC CAA GTG ATT C

2.6.1.2 *Amplifizierung von β-Aktin*

Primerbezeichnung	Nukleotidsequenz 5' → 3'
Actin5'mouse	AGG GAA ATC GTG CGT GAC AT
Actin3'mouse	CAT CTG CTG GAA GGT GGA CA

2.6.1.3 Bestimmung der Spleißvarianten

Primerbezeichnung	Nukleotidsequenz 5' → 3'
αMHCex1	CAG AGA TTT CTC CAA CCC AG
αMHCex2	CTG AAG AAT GTG GAC CAC AG

2.6.1.4 Amplifizierung der Sonden für Northern Blots

Primerbezeichnung	Nukleotidsequenz 5' → 3'
1371s	AAG GAT TCC TAT GTG GTC G
2307a	ATC CTT AAT GTC ACG CAC GA
MHCp_ex2.5	CTG TTC CTC TCT CTG TCC AG
MHCp_ex2.3	CGT GAT CTG CTG TCT ACA GG

2.6.1.5 Amplifizierung der Sonden für Southern Blots

Primerbezeichnung	Nukleotidsequenz 5' → 3'
Actin5'mouse	AGG GAA ATC GTG CGT GAC AT
βAkt3int	ACT TGT ACT ATG GCC TCA GG
ANT1_ex2.5	GCA TGC CAG CAA ACA GAT C
ANT1_ex2.3	GTC ATA GAC TCC GAA GTA GG

2.6.1.6 Sequenzierungsprimer

Primerbezeichnung	Nukleotidsequenz 5' → 3'
MK10BANT	GTG GTG CCT CGT TCC AGC TG
ANT1_ex2.3	GTC ATA GAC TCC GAA GTA GG
ANT1_ex2.5	GCA TGC CAG CAA ACA GAT C
hGHPolyA3	CAG GCA TCT ACT GAG TGG ACC

2.6.2 TagMan™ Sonden

TagMan™ Gene Expression Assays (Applied Biosystems, Darmstadt)

mRNA	Assay
18S (Human)	Hs99999901_s1
ANT1 (Ratte)	Rn00821477_g1
ANT2 (Maus)	Mm00846873_g1
ANT4 (Maus)	Mm00617754
Bax (Maus)	Mm00432050_m1

mRNA	Assay
Bcl-2 (Maus)	Mm00477631_m1
CAR (Ratte)	Rn01477162_m1
Cytochrom B	auf Bestellung
HPRT (Maus)	Mm00446968_m1
IFN β 1 (Maus)	Mm00439546_s1
IL-1 β (Maus)	Mm00434228_m1
Myh6 (Maus)	Mm01313844_mH
TGF β (Maus)	Mm00441724_m1
TNF α (Maus)	Mm00443258_m1

2.7 Gebrauchswaren

Gebrauchswaren, die nicht gesondert aufgeführt sind, wurden von den Firmen VWR International, Darmstadt, und Eppendorf, Hamburg, bezogen.

Produkt	Firma
Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare, München
Amersham Hybond-N+ Nylonmembran	GE Healthcare, München
ImmunBlot PVDF Membran	Bio-Rad Laboratories, München
Kodak Biomax MR Film	VWR International, Darmstadt
Kunststoff-Stößel für 1,5 ml-Gefäß (<i>Pellet Pestle</i>)	Sigma-Aldrich, München
MicroAmp 96well Optical Reaction Plate	Applied Biosystems, Darmstadt
Mullkompressen, steril	Fuhrmann Verbandstoffe, Much
NuPAGE Novex Bis-Tris Gel 4-12 %	Invitrogen, Darmstadt
Optical Adhesive Covers	Applied Biosystems, Darmstadt
Whatman-Papier	Bio-Rad Laboratories, München

2.8 Sonstige Materialien und Geräte

Zusätzlich zur allgemeinen Laborausstattung wurden folgende Materialien und Geräte benutzt:

Produkt	Firma
Accu-Chek Glucometer	Roche, Mannheim
Bioscan QC 2000	Bioscan, Washington/USA
CO ₂ -Inkubator CB 150	Binder, Tuttlingen
DNA Thermal Cycler Cetus	Perkin Elmer, Waltham/USA
Feinpinzette Dumont#5	FST Medizintechnik, Bad Oeynhausen
Feinschere "Spring scissor straight"	FST Medizintechnik, Bad Oeynhausen

Produkt	Firma
Gewebehomogenisator 432N1275 (Tenbroek)	VWR International, Darmstadt
Handhomogenisator 432-1202	VWR International, Darmstadt
HERASafe Sterilbank	Thermo Electron, Waltham/USA
Homogenisierungssystem MICCRA x842.1	Roth, Karlsruhe
Hybridisierungs-ofen Compact Line OV4	Biometra GmbH, Göttingen
Liquid Scintillation Analyzer	Packard GmbH, Dreieich
Mastercycler ep Gradient S	Eppendorf, Hamburg
Mastercycler personal	Eppendorf, Hamburg
Mikroskop BX51	Olympus, Hamburg
Mikroskop DMIL DFC 480	Leica, Wetzlar
Mini Trans-Blot Cell	Bio-Rad Laboratories, München
Motor für Pellet Pestle (Z-35, 997-1)	Sigma-Aldrich, München
NanoDrop® ND-1000 Spektrophotometer	Peqlab, Erlangen
NovexMini Cell	Invitrogen, Darmstadt
PCR-Cycler Primus 96 advanced	Peqlab, Erlangen
Potter-Elvehjem Glas-Glas	VWR International, Darmstadt
SmartSpec™ 3000	Bio-Rad Laboratories, München
Kühlzentrifuge 5415R, Rotor F45-24-11	Eppendorf, Hamburg
TRIO Thermoblock	Biometra, Göttingen
UltraTurrax T25basic	IKA Labortechnik, Berlin
UV Stratlinker®1800	Stratagene, LaJolla/USA
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Avanti	Beckman Coulter, Fullerton/USA

2.9 Sterilisierung

Die Sterilisierung von Lösungen erfolgte für 30 min bei 120 °C und 10^5 Pascal im Dampfdruckautoklaven oder, bei hitzeempfindlichen Lösungen, durch Sterilfiltration (Porengröße: 0,2 µm). Gebrauchswaren wurden entweder autoklaviert oder über Nacht bei 220 °C hitzesterilisiert.

2.10 Virus

Das Coxsackievirus B3 (Nancy-Stamm, ATCC VR-30) wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Heinz Zeichhardt (Institut für Virologie, Charité – Universitätsmedizin Campus Benjamin Franklin) zur Verfügung gestellt.

2.11 Zell-Linien und Medien

Zell-Linie	Beschreibung	Medium
HeLa	Humanes zervikales Adenokarzinom	DMEM <i>high glucose</i> ¹
PNCM	Primäre neonatale Rattenkardiomyozyten	DMEM <i>low glucose</i> ²
PECM	Primäre embryonale Mauskardiomyozyten	DMEM <i>high glucose</i> ³

¹DMEM wurde mit 2 mM L-Glutamin, 10 % FBS und 1 % Penicillin/Streptomycin versetzt.

²DMEM wurde mit 2 mM L-Glutamin, 1 % Penicillin/Streptomycin und 2 μ M FUDR versetzt.

³DMEM, ohne L-Glutamin, wurde mit 10 % FBS und 1 % Penicillin/Streptomycin versetzt.

2.12 Molekularbiologische Arbeitstechniken

2.12.1 Isolierung von DNA aus eukaryotischen Geweben

2.12.1.1 *Isolierung von DNA aus Schwanzspitzenbiopsien zur Genotypisierung*

Zur Genotypisierung von Wildtyp- und ANT1-transgenen Mäusen wurde genomische DNA aus lysierten Schwanzspitzenbiopsien isoliert. Die Schwanzspitzenbiopsie (1-3 mm) wurde mit 100 μ l Lysispuffer und 10 μ l Proteinase K-Lösung (10 mg/ml) bei 37 °C über Nacht oder bei 55 °C für 3 h inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Deaktivierung der Proteinase K durch Erhitzung der Probe auf 95 °C für 10 min im Thermoblock. Nach Abkühlung der Probe im Eis für 5 min wurden 800 μ l TE/RNaseA-Lösung (1000 μ l 1 \times TE-Puffer pH 7,4, 2,5 μ l 4 mg/ml RNaseA) hinzupipettiert und die Zellreste bei 16 000 \times g für 5 min pelletiert. Vom Überstand wurden 1-2 μ l für die Genotypisierungs-PCR (2.12.8) eingesetzt.

2.12.1.2 *Isolierung von DNA aus Herzgewebe*

Die Isolierung von DNA aus Herzgewebe erfolgte mittels alkoholischer Fällung mit Isopropanol. Ein Gewebestück von ca. 20 mg wurde mit 700 μ l Lysispuffer und 35 μ l Proteinase K-Lösung (10 mg/ml) bei 55 °C über Nacht inkubiert. War das Gewebe anschließend noch nicht vollständig verdaut, wurden weitere 20-35 μ l Proteinase K hinzupipettiert und die Probe im Thermomixer für 1 h geschüttelt. Diese Suspension wurde zunächst auf Eis für 10 min gekühlt, dann 300 μ l 6 M NaCl hinzupipettiert, durch Inversion gut gemischt und für weitere 5 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellreste pelletiert (16 000 \times g, 10 min, 4 °C) und der Überstand in ein 2 ml Eppendorf-

Gefäß überführt. Um eine RNA-freie DNA-Präparation zu erhalten, wurde die RNA durch einen Verdau mit RNase A entfernt; hierzu wurden 5 µl RNase A (4 mg/ml) zum Überstand gegeben und in einem Wasserbad bei 37 °C für 15 min inkubiert. Zur anschließenden Fällung der DNA wurde zum Überstand 1 ml Isopropanol pipettiert, durch Inversion gemischt und bei 16 000 × g für 20 min und 4 °C zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstands wurde das Pellet mit 500 µl 70 %-igem Ethanol (-20 °C) gewaschen (16 000 × g, 15 min, 4°C). Der Überstand wurde sorgfältig entfernt und das DNA-Pellet bei RT für 10-15 min getrocknet. In Abhängigkeit von der Größe wurde das Pellet in 50-100 µl TE-Puffer pH 7,4 aufgenommen und bei 37 °C für 30 min im Thermomixer gelöst. Die Konzentration der DNA wurde mit Hilfe des NanoDrop® Spektrophotometers bestimmt (2.12.3).

2.12.2 Isolierung von RNA aus eukaryotischen Zellen und Geweben

Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte nach dem Prinzip der Einschrittmethode nach Chomczynski und Sacchi ²⁰⁸. Dafür wurde die monophasische Lösung TRIzol® verwendet, welche Phenol und Guanidinisothiocyanat enthält. Durch das chaotrope Guanidinisothiocyanat werden Wasserstoffbrückenbindungen aufgelöst und so die Gewebestandteile lysiert, Proteine denaturiert und dadurch RNasen inaktiviert. Das enthaltene Phenol bewirkt im sauren Milieu, dass denaturierte Proteine und kleinere DNA-Fragmente aus dem Lysat entfernt werden.

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus Gewebe wurde ein Gewebestück von ca. 20-50 mg in 1 ml TRIzol-Lösung aufgenommen und mit einem autoklavierten Kunststoff-Stößel in einem 1,5 ml Eppendorf-Gefäß zerkleinert. Nach Zugabe von 1/10 Vol Chloroform wurde die Probe für 15 s gevortext und anschließend 5 min auf Eis gestellt. Die Auftrennung der Phasen erfolgte in einem Zentrifugationsschritt bei 12 000 × g für 15 min und 4 °C. Die farblose, obere Phase wurde sorgfältig abgenommen und in ein frisches Eppendorfgefäß überführt, 1 Vol gekühltes Isopropanol (4 °C) hinzugegeben, mehrfach invertiert und auf Eis für 15 min inkubiert. Die RNA wurde anschließend bei 12 000 × g und 4 °C für 15 min pelletiert. Das Pellet wurde einmal mit 800 µl 75 %-igem Ethanol gewaschen (7400 × g, 8 min, 4 °C) und bei RT für 10-15 min getrocknet. Die RNA wurde anschließend je nach Größe in 35-100 µl RNase-freiem Wasser (DEPC-Wasser) aufgenommen, bei 60 °C für 10 min gelöst und dann bei -80 °C gelagert.

Bei der Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen wurde das Medium aus der Kulturplatte abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 600 µl TRIzol-Lösung pro Well einer 6-Well-Platte auf die Zellen gegeben, durch auf- und abpipettieren die Zellen abgelöst und das Zell-Lysat in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Mit dem Homogenat wurde nach obiger Beschreibung verfahren, um die

RNA zu extrahieren. Im letzten Schritt wurde das RNA-Pellet in 35 μ l DEPC-Wasser gelöst. Die Konzentration der RNA wurde mit dem NanoDrop® ND-1000 Spektrophotometer gemessen (2.12.3) und die Qualität der präparierten RNA mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft (2.12.4.1).

2.12.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde mit einem Spektrophotometer (NanoDrop® ND-1000, ThermoScientific, Peqlab, Erlangen) bestimmt. Nach Abgleichen des Nullwerts konnte das Absorptionsmaximum der gemessenen Nukleinsäuren (bei 260 nm) bestimmt und gleichzeitig Verunreinigungen durch Proteine (bei 280 nm) bzw. Salze (bei 230 nm) festgestellt werden. Nach dem Lambert-Beer-Gesetz korreliert die Konzentration der Nukleinsäuren linear mit der Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm. Der Quotient E_{260/280} ist ein Maß für die Reinheit der Probe und sollte für DNA ca. 1,8 und für RNA ca. 2,0 betragen.

2.12.4 Agarose-Gelelektrophorese

2.12.4.1 *Gelelektrophorese von DNA und RNA*

Die elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren erfolgte mit Agarosegelen. Zur Herstellung eines 1 %-igen Gels wurde 1 g Agarose mit 100 ml 1 \times TAE-Puffer gemischt, aufgekocht und nach Zugabe von 4 μ l Ethidiumbromid (10 mg/ml) in den vorbereiteten Gelträger gegossen. Ethidiumbromid ist ein Fluoreszenzfarbstoff, dessen flaches, mehrgliedriges Ringsystem zwischen benachbarten Basenpaaren interkaliert und so eine Sichtbarmachung der DNA unter UV-Licht (302 nm) ermöglicht. Die Probe wurde im Verhältnis 1:1 mit dem DNA-Ladepuffer gemischt und nach der Auftragung erfolgte die Elektrophorese in 1 \times TAE-Puffer bei 6-8 V/cm². Ein Größenstandard (100 bp DNA-Leiter) wurde parallel mitgeführt und ermöglichte die Größenbestimmung der DNA-Fragmente.

2.12.4.2 *Denaturierende Gelelektrophorese von RNA*

Denaturierende Agarosegele²⁰⁹ wurden zum Transfer gelelektrophoretisch aufgetrennter RNA auf eine Nylonmembran (Amersham Hybond-N+, GE Healthcare, München) mit anschließender Hybridisierung radioaktiver Sonden zur Detektion spezifischer Transkripte verwendet (2.12.5).

Zur Herstellung des benötigten Agarosegels (1,5 %) wurden 0,65 g Agarose und 5 ml 10 \times MOPS-Puffer zusammen mit 40 ml autoklaviertem, bidestilliertem Wasser aufgekocht, nach dem Abkühlen auf 60 °C mit 9 ml Formaldehyd (\geq 37 %, Endkonzentration: 6,2 %)

gemischt und in eine vorbereitete Gelkammer gegossen. Die RNA-Proben (5-10 µg Gesamt-RNA) wurden mit 5,5 µl frisch angesetztem RNA-Ladepuffer vermischt, bei 65 °C für 5 min denaturiert und unverzüglich für 5 min auf Eis gestellt, um eine Renaturierung zu vermeiden. Nach dem Auftragen der Proben erfolgte die Elektrophorese in 1× MOPS-Puffer bei einer konstanten Spannung von 4 V/cm². Vor dem Transfer wurde die RNA im Transilluminator sichtbar gemacht und deren Intaktheit überprüft. Die RNA wurde als nicht degradiert eingestuft, wenn die 28S- und 18S-rRNA deutlich und scharf umrissen erkennbar waren und die Bande der 28S-rRNA stärker als die der 18S-rRNA war.

2.12.4.3 Aufreinigung von PCR-Produkten aus Agarosegelen

Die Isolierung von PCR-Produkten aus Agarosegelen erfolgte mit dem QIAGEN Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden). Nach der elektrophoretischen Auftrennung der DNA (2.12.4.1) wurde das gesuchte Fragment mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten, in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Die Aufreinigung der DNA erfolgte dann nach dem Protokoll des Herstellers. Die in EB-Puffer (10 mM Tris-Cl, pH 8,5) eluierte DNA wurde anschließend gelelektrophoretisch analysiert (2.12.4.1).

2.12.5 Kopienzahlbestimmung mittels Southern Blot

Mittels Southern Blot wurde die Zahl der integrierten Kopien des Transgen-Konstrukts in Relation zum endogenen ANT1-Gen bestimmt. Zur Erzeugung eines endogenen ANT1-Standards wurden 5, 10 und 20 µg DNA aus Wildtyp-Herzen (2.12.1.2) mit *Bam*HI verdaut (2.12.7). Von transgenen Tieren der beiden Linien 17 und 20 wurden jeweils 10 µg DNA mit *Bam*HI und *Sspl* verdaut, auf einem Gel elektrophoretisch aufgetrennt (2.12.4.1) und auf eine Nylonmembran transferiert (2.12.6.1). In einer PCR (2.12.8) wurde unter Verwendung der Primer ANT1_ex2.5 und ANT1_ex2.3 eine Sequenz von 472 bp des Exon 2 des ANT1-Gens amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde radioaktiv markiert (2.12.6.2) und als Sonde zur Detektion der ANT1-Sequenzen auf der Membran eingesetzt (2.12.6). Die Quantifizierung der Signalstärke erfolgte unter Verwendung der Software ScionImage, wobei die Intensität des transgenen Signals mit der der drei endogenen Standards verglichen wurde.

2.12.6 Transfer und Nachweis von Nukleinsäuren auf Nylonmembranen

2.12.6.1 RNA- und DNA-Transfer mittels Northern bzw. Southern Blot

Die mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennten Nukleinsäuren (2.12.4.1 und 2.12.4.2) wurden im Kapillarblot auf eine Nylonmembran transferiert. Bei dieser Methode

wird der Nukleinsäuretransfer durch eine gerichtete Ionenwanderung mittels Kapillarkräfte vollzogen.

Beim Northern Blot wurde das RNA-Gel im Anschluss an die Elektrophorese zunächst zweimal für jeweils 30 min in bidestilliertem Wasser gewaschen, um das Formaldehyd auszuspülen. Für den Transfer der RNA auf die Membran (nach Sambrook *et al.*, 1989) wurde der Blot in folgender Reihenfolge aufgebaut (Abbildung 2.1): In eine Schale mit 10× SSC-Transferpuffer wurde ein Whatman-Papier gelegt, welches eine Flüssigkeitsbrücke zwischen zwei Pufferkammern bildete. Darauf wurde das Agarosegel gelegt, das von einem Dichtring aus Parafilm isoliert wurde, um ein Vorbeileiten des Transferpuffers an Agarosegel und Membran zu verhindern. Auf das Gel wurden zunächst luftblasenfrei die zugeschnittene Membran und zwei Whatman-Papiere gelegt. Darüber wurde ein Stapel trockene Papiertücher geschichtet und schließlich mit einem Gewicht beschwert. Geblottet wurde bei RT über Nacht.

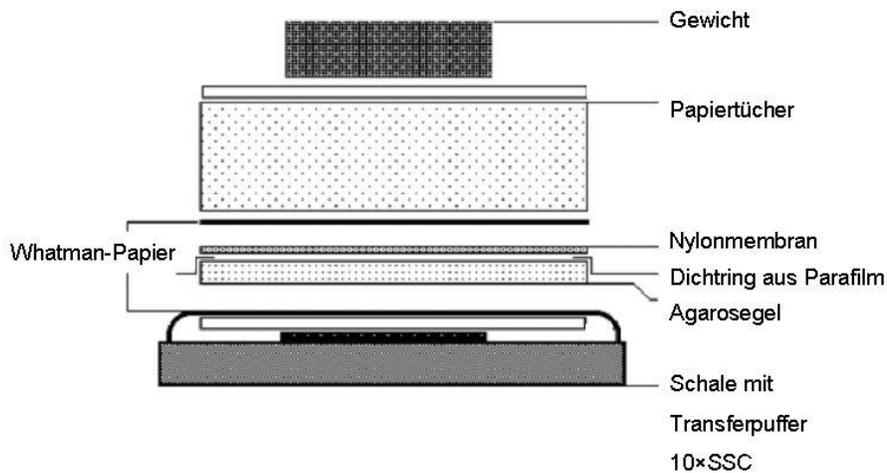


Abbildung 2.1: Schematischer Aufbau eines Kapillarblots

Im Anschluss an den Transfer wurde die Membran für 15-30 min bei RT luftgetrocknet, die Nukleinsäuren mittels UV-Crosslinker (UV Stratalinker 1800, Stratagene) auf der Membran fixiert (zweimal 150 mJoule/cm²) und unter UV-Licht die transferierte RNA quantitativ und qualitativ begutachtet. Gleichzeitig wurden die Banden der 18S- und 28S-rRNA mit einem weichen Bleistift auf der Membran markiert, um als RNA-Längenstandard (1,8 bzw. 4,4 kb) erkennbar zu sein.

Beim Southern Blot wurde ebenfalls nach obigem Protokoll verfahren. Hierbei entfiel der initiale Waschschrift des Northern Blots, da das beim Southern Blot verwendete Gel kein Formaldehyd enthielt (2.12.4.1). Stattdessen wurde das Gel zweimal für 20 min in Denaturierungslösung inkubiert, um die DNA zu denaturieren und auf den DNA-Transfer

vorzubereiten. Als DNA-Längenstandard wurden die Banden des mitgeführten 1 kb-DNA-Leiter auf der Membran markiert.

2.12.6.2 Radioaktive Markierung von DNA

Die radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten ²¹⁰ erfolgte mittels PCR unter Verwendung radioaktiv markierter Nukleotide, die in die Syntheseprodukte eingebaut wurden. Als Sonden wurden mit [³²P]-dCTP radioaktiv markierte PCR-Produkte unter Verwendung der entsprechenden *reverse*-Primer (Northern Blot) bzw. beider Primer (Southern Blot) hergestellt. Für die Markierungsreaktion wurden 25-30 ng aufgereinigtes PCR-Produkt (s. 2.12.4.3), 2,5 µl 10× PCR-Puffer, 0,5 µl AmpliTaq DNA-Polymerase, 0,5 µl 10 mM dNTPs (ohne dCTP), 0,5 µl *reverse*-Primer (20 µM) und ggf. 0,5 µl *forward*-Primer in ein Gesamtvolumen von 20 µl pipettiert und mit 20 µl Mineralöl überschichtet. Durch Zugabe von 5 µl radioaktiv-markiertem [³²P]-dCTP (10 µCi/µl) wurde die Markierungsreaktion gestartet. Nach Beendigung der Reaktion wurden die markierten Sonden über Sephadex-Säulen aufgereinigt. Dazu wurde in H₂O bidest. gelöstes Sephadex G-50 luftblasenfrei in eine Pasteurpipette geschichtet. Unter dem Plexiglas-Schutz wurde die radioaktive Sonde auf die Säule pipettiert und anschließend ca. 1 ml H₂O bidest. zugegeben. Die erste Fraktion von ca. 500 µl Eluat wurde verworfen. Danach wurden 10 Fraktionen à 50 µl aufgefangen und die Radioaktivität in jeder Fraktion mit dem Bioscan QC 2000 gemessen. Die Fraktionen mit der höchsten Radioaktivität wurden anschließend vereinigt und als Sonde verwendet. Bis zur Hybridisierung wurde diese bei 4 °C oder -20 °C gelagert.

2.12.6.2.1 Hybridisierung radioaktiver Sonden an membrangebundene RNA und DNA

Die Nylonmembran (2.12.6.1) wurde in einer Hybridisierungsröhre mit 5 – 10 ml ExpressHyb-Hybridisierungslösung im Hybridisierungsofen bei 68 °C (Northern Blot) bzw. bei 60 °C (Southern Blot) für 30 min prähybridisiert. Anschließend wurden 500 µl der entsprechenden aufgereinigten Sonde (2.12.6.2) hinzugegeben und die Membran bei 68 °C (Northern Blot) bzw. bei 60 °C (Southern Blot) für 1 h hybridisiert. Die Hybridisierungslösung wurde verworfen und die Membran in 10 ml Waschlösung I bei Raumtemperatur für 15 min gewaschen. Die Waschlösung I wurde ebenfalls verworfen und die Membran mit je 10 ml der Waschlösung II bei 50 °C zweimal für 20 min gewaschen. Die Membran wurde entnommen und feucht in Klarsichtfolie eingeschlagen.

2.12.6.3 Nachweis und Quantifizierung der Hybridisierungsprodukte

Zur Detektion und Quantifizierung der hybridisierten, radioaktiv markierter DNA-Fragmente wurde die in Klarsichtfolie eingeschlagene hybridisierte Membran (2.12.6.3) in eine Filmkassette gelegt, ein Röntgenfilm (Amersham Hyperfilm ECL, GE Healthcare, München) aufgelegt und bei -80 °C für 1 h bis hin zu mehreren Tagen inkubiert, so dass ein auswertbares Signal erhalten wurde. Anschließend wurde der Film entwickelt, eingescannt und die Intensität des Hybridisierungssignals unter Verwendung der Software ScionImage bestimmt.

2.12.6.4 Rehybridisierung radioaktiv markierter Membranen

Zur Rehybridisierung einer bereits markierten Membran wurden die gebundenen, radioaktiven Sonden durch 5-minütiges Schwenken in 0,5 %-igem SDS bei 95 – 98 °C im Wasserbad von der Membran gelöst (Strippen). Dieser Vorgang wurde wiederholt, bis auf der Membran kein radioaktives Signal mehr detektierbar war. Danach wurde der Blot erneut hybridisiert (2.12.6.3).

2.12.6.5 RNase-Protection-Assay (RPA)

Der RNase-Protection-Assay (RPA, durchgeführt durch Dr. Yong Wang) wird verwendet, um spezifische mRNAs einer RNA-Präparation quantitativ zu bestimmen. Hierbei wird mit Hilfe einer RNA-Polymerase eine radioaktive *antisense*-RNA-Sonde unter Zugabe von [α - 32 P]-UTP hergestellt. Anschließend wird diese mit der komplementären mRNA in der RNA-Probe hybridisiert. Die nicht hybridisierten, einzelsträngigen RNAs und die einzelsträngigen Überhänge der Hybride werden durch enzymatischen Verdau abgebaut. Übrig bleiben somit nur doppelsträngige Fragmente einer definierten Größe, die nach gelelektrophoretischer Auftrennung sichtbar gemacht werden können.

Die Expression der ANP-mRNA wurde unter Verwendung des Ambion RPA II Kit (Ambion Europe Ltd., Huntingdon, UK) untersucht^{204, 211}. Mit Hilfe der SP6-RNA-Polymerase wurde eine radioaktiv-markierte ANP-komplementäre Sonde von 290 nt transkribiert. Eine zur rL32-mRNA komplementäre Sonde (127 nt) wurde als interner Expressionsstandard generiert. Jeweils 10 μ g der RNA-Präparationen (2.12.2) wurden mit ca. 40 000 c.p.m. der ANP- und 40 000 c.p.m. der rL32- Sonden im gleichen Reaktionsansatz hybridisiert. Die hybridisierten, doppelsträngigen Fragmente, die vor dem Verdau durch RNase A+T1 geschützt waren, wurden mittels denaturierender Gelelektrophorese (5 % w/v Polyacrylamid, 8 M Urea) aufgetrennt und mit einem FUJIX BAS 2000 Phospho-Imager (Raytest GmbH, Straubenhardt) analysiert. Die Angabe erfolgte als Phosphor-stimulierte Lumineszenz (PSL) pro mm².

2.12.7 Enzymatische Modifikationen von DNA

Die Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen wurde in einem Volumen von mindestens 20 µl unter Verwendung von 5-10 U Enzym pro µg DNA für 90 min durchgeführt. Die Verwendung des optimalen Reaktionspuffers und der enzym-spezifischen Temperatur erfolgte nach Angaben der Hersteller.

2.12.8 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) diente der Amplifizierung und dem Nachweis spezifischer DNA-Sequenzen. In Abhängigkeit von Primer-Länge, Basenzusammensetzung und der Länge der zu amplifizierenden DNA wurde die PCR-Reaktion unter verschiedenen, optimierten PCR-Bedingungen durchgeführt.

Ein Standard-PCR-Ansatz wurde nach folgendem Pipettierschema zusammengestellt:

DNA (30-500 ng)	x µl
Primer 1 (20 µM)	0,5 µl
Primer 2 (20 µM)	0,5 µl
dNTPs (20 mM)	0,5 µl
PCR-Puffer (10×)	2,5 µl
AmpliTaq DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,25 µl
H ₂ O bidest.	ad 25 µl

Das PCR-Programm umfasst eine initiale Denaturierung der DNA bei 94 °C für 3 min. Im Anschluss folgten 35 Zyklen nach folgendem Programm im Thermocycler (Eppendorf):

30 s	94 °C	Denaturierung
30 s	55-61 °C	Anlagerung
45-60 s	72 °C	Elongation

Die Temperatur des Anlagerungsschrittes und die Dauer der Elongation wurden für jede DNA-Sequenz und die sequenzspezifischen Primer optimiert. Nach Beendigung des letzten Zyklus schloss sich ein finaler Elongationsschritt von 10 min bei 72 °C an. Zur Analyse der amplifizierten PCR-Produkte wurden 10 µl des Ansatzes mit 5 µl DNA-Ladepuffer versetzt, auf ein 1 %-iges Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt (2.12.4.1).

2.12.9 cDNA-Synthese mittels Reverser Transkriptase (RT)

Bei der reversen Transkriptase (RT) handelt es sich um eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die von einer einzelsträngigen RNA-Matrize einen doppelsträngigen DNA-

Strang erstellt, der nachfolgend für die RT-PCR (2.12.10) und die quantitative *real-time* PCR (2.12.11) eingesetzt werden kann. Für die Umschreibung der mRNA aus eukaryontischen Zellen und Geweben (2.12.2) wurde die MMLV-RT (Invitrogen, Darmstadt) verwendet. Da genomische DNA teilweise von den in der RT-PCR und *real-time* PCR verwendeten Primer erkannt wird und somit die Ergebnisse der PCR verfälschen kann, wurde die RNA-Präparation zunächst einem DNaseI-Verdau unterzogen, um eine Kontamination der cDNA mit genomischer DNA auszuschließen. Hierzu wurden 0,3-1,25 µg RNA, 1,25 µl 10× DNaseI-Puffer, 2,5 µl DNaseI (1 U/µl) und DEPC-Wasser in einem Ansatz von 12,5 µl zusammengegeben und bei 37 °C für 30 min inkubiert. Die DNaseI wurde durch Zugabe von 1,25 µl 25 mM EDTA und Inkubation bei 65 °C für 10 min inaktiviert. Zur cDNA-Synthese wurden 10 µl des DNaseI-Verdau mit 1 µl Random Hexamers (500 µg/ml) bei 65 °C für 5 min denaturiert und anschließend mit 4 µl 5× *First Strand Buffer*, 2 µl 100 mM DTT, 1 µl 20 mM dNTPs, 1 µl RNasin RNase Inhibitor (30 U/µl) und 1 µl MMLV-RT (200 U/µl) bei 37 °C für 1 h inkubiert. Im Anschluss wurde die cDNA bei -20 °C gelagert. Der Erfolg des DNaseI-Verdau sowie der cDNA-Synthese wurde in einer PCR (2.12.8) bestätigt.

2.12.10 Semi-quantitative RT-PCR

Die semi-quantitative RT-PCR ermöglicht den Nachweis von cDNAs durch die Kombination von Standard-PCR und Agarosegelelektrophorese. Die Mitführung eines internen Expressionsstandard (z. B. β-Aktin) ermöglicht relative Aussagen über die Quantität einzelner Transkripte in RNA-Präparationen. Unter Verwendung von 50 ng cDNA und spezifischen Primern wurde mittels PCR (2.12.8) das gesuchte Transkript und in einem zweiten Ansatz β-Aktin amplifiziert. Die PCR-Produkte werden anschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert (2.12.4.1).

2.12.11 Quantitative *real-time* PCR mittels TaqMan

Die Quantifizierung verschiedener mRNAs erfolgte mittels *real-time* PCR unter Verwendung spezifischer Primer und fluoreszenzmarkierter Sonden (TaqMan Gene Expression Assays, Applied Biosystems, USA) im Mastercycler[®]ep *realplex* Gradient S (Eppendorf, Hamburg). Zur Quantifizierung der Transkripte wurden 2-50 ng kardiale cDNA pro Ansatz eingesetzt, so dass der C_T-Wert der Messung zwischen 20 und 35 lag. In einem Gesamtvolumen von 10 µl wurden 5 µl TaqMan Universal Master Mix UNG, 0,5 µl der spezifischen Primer-Sonde-Kombination und 4,5 µl cDNA eingesetzt und nach dem Standardprotokoll der Firma Applied Biosystems, Darmstadt, amplifiziert. In einem initialen Temperaturschritt (50 °C für 2 min) wird die Uracil N-Glykosylase (UNG) aktiviert,

um Übertragungskontaminationen zu vermeiden. Darauf folgt die Deaktivierung der UNG und die Denaturierung der DNA-Stränge (95 °C für 10 min) und 40 Zyklen der Amplifizierung und Messung der Emission (95 °C 15 s, 60 °C 1 min). Zur relativen Quantifizierung wurde HPRT (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase 1) als interner Expressionsstandard mitgeführt, um Variationen in der Menge der eingesetzten RNA auszugleichen. Zudem wurde jede Probe dreifach bestimmt und der Mittelwert der C_T -Werte (Zyklus, an dem die Fluoreszenz der Sonde erstmals über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt) errechnet und für die relative Quantifizierung verwendet. Zur quantitativen Auswertung wurde der Mittelwert der C_T -Werte des zu bestimmenden Gens mit dem C_T -Wert von HPRT derselben Probe ins Verhältnis gesetzt ($\Delta C_T = C_{T(\text{Gen})} - C_{T(\text{HPRT})}$). Der sich ergebene ΔC_T -Wert einer unbehandelte Probe (ΔC_{T1}) konnte nun mit den ΔC_T -Werten einer behandelten Probe (ΔC_{T2}) verglichen werden und man erhält den sogenannten $\Delta \Delta C_T$ -Wert (= $\Delta C_{T2} - \Delta C_{T1}$). Der relative Expressionsunterschied zwischen Probe 1 und Probe 2 berechnete sich dann nach der Formel: R (relative Quantität) = $2^{-(\Delta C_{T2} - \Delta C_{T1})}$. Die Darstellung in dieser Arbeit erfolgt als R in % zur angegebenen Referenzprobe. Für neue Assays wurde mittels einer Verdünnungsreihe die optimale cDNA-Menge titriert, so dass die Amplifizierung im nicht gesättigten, linearen Bereich lag. Zur qualitativen Auswertung wurden 10 μl des PCR-Ansatzes auf einem 2 %-igen Agarosegel analysiert (2.12.4.1) und anhand der Größe sowie der Menge der PCR-Produkte die Spezifität der Assays überprüft.

2.12.12 Präamplifizierung

Einige Transkripte, z. B. IFN β , werden nur sehr gering exprimiert, so dass sie unter Verwendung einer praktikablen Menge an cDNA nicht mehr hinreichend amplifiziert und mittels *real-time* PCR quantifiziert werden können. Um dennoch Informationen zur Expression zu erhalten, wurden die entsprechenden Transkripte vor der quantitativen *real-time* PCR präamplifiziert und so die Transkriptmenge selektiv erhöht und eine Verringerung des C_T -Werts um 5,45 Zyklen erreicht. Dabei muss vor allem auf eine gleichmäßige Amplifizierung dieser Transkripte wie auch des mitgeführten Expressionsstandards geachtet werden. Zunächst wird aus den TaqMan Gene Expression Assays der zu untersuchenden Transkripte, einschließlich HPRT, ein Primer-Mix (jeweils 10 μl jedes TaqMan Gene Expression Assays, ad 1 ml TE-Puffer) hergestellt, der anschließend aliquotiert und bei -20 °C gelagert werden kann. Zur Präamplifizierung werden 5 μl des Primer-Mix, 10 μl TaqMan Universal MasterMix UNG und 100 ng cDNA in 20 μl Gesamtvolumen gemischt. Nach initialer Denaturierung (95 °C, 10 min) wurden die Proben über 10 Zyklen amplifiziert (15 s 95 °C, 4 min 60 °C) und anschließend bei -20 °C gelagert. Für die *real-time* PCR wurden die präamplifizierten Proben 1:5 in TE-

Puffer verdünnt und davon 2,5 µl pro PCR-Ansatz eingesetzt. Die *real-time* PCR erfolgte dann wie in Kapitel 2.12.11 beschrieben. Einmalig wurde den Angaben des Herstellers entsprechend überprüft, ob die spezifische Präamplifizierung der mRNAs einer Probe für alle verwendeten Assays gleichmäßig war, um die Vergleichbarkeit der Expression verschiedener Cytokine sowie des internen Expressionsstandards zu überprüfen. Die hierbei erhaltenen Werte befanden sich deutlich innerhalb der vorgegebenen Grenzwerte.

2.12.13 Sequenzierung

Die Sequenzierung des integrierten α MHC-ANT1-Konstrukts zur Überprüfung der Sequenzintegrität wurde durch die Firma SeqLab, Göttingen, durchgeführt. Unter Verwendung von 100 ng kardialer DNA transgener Mäuse (2.12.1.2) wurde das Konstrukt mit den Primerkombinationen (I) MK10 BANT und ANT1_ex2.3 und (II) ANT1_ex2.5 und hGHPolyA3 sowie 3 µl Platinum *High-Fidelity Taq* Polymerase (Invitrogen, Darmstadt) und 3 µl 25 mM MgCl₂ in 75 µl Gesamtvolumen in einer PCR amplifiziert (2.12.8). Die PCR-Produkte wurden mit dem High Pure PCR Cleanup Micro Kit (Roche, Mannheim) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt und anschließend mit jeweils beiden Primern von beiden Seiten durch die Firma SeqLab, Göttingen, sequenziert. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte unter Verwendung des Programms Chromas Lite 2.01 und der Datenbank GenBank.

2.13 **Proteinbiochemische Arbeitsmethoden**

2.13.1 Proteinextraktion

2.13.1.1 *Isolierung von Gesamtzellextrakt aus Herzgewebe*

Zur Isolierung von Gesamtzellextrakt aus Herzgewebe wurde das Gewebe zunächst gewogen und in dem 10-fachen Volumen Lysispuffer mit Protease-Inhibitor (1:100) aufgenommen. Die grobe Zerkleinerung des Gewebes im Eppendorf-Gefäß erfolgte mit einer feinen Schere, die Homogenisierung anschließend in einem Glas-Homogenisator. Zur Abtrennung der Zellreste vom Proteinextrakt wurde die Suspension bei 12 400 × g für 20 min und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt und die Proteinkonzentration bestimmt (2.13.2).

2.13.1.2 *Isolierung von Mitochondrien und Cytosol aus Herzgewebe*

Die Isolierung von Mitochondrien aus Herzgewebe erfolgt mittels subzellulärer Fraktionierung durch stufenweise, aufeinander folgende Zentrifugationsschritte (nach ³²³). Alle Schritte wurden auf Eis bzw. bei 4 °C durchgeführt, um die Degradation der Proteine

zu verhindern. Das Gewebe wurde zunächst gewogen und mit dem 10-fachen Volumen Mitochondrien-Puffer mit Protease-Inhibitor (1:100) versetzt. Mit einer feinen Schere wurde das Gewebe grob zerkleinert und der Ansatz in einen vorgekühlten Glas-Homogenisator überführt. Durch vorsichtige Dreh-, Auf- und Abbewegungen mit dem Pistill wurden die Gewebestückchen im Puffer zu einer feinen Suspension verarbeitet. Hierbei ist darauf zu achten, dass das Glasgefäß möglichst durchgängig gekühlt bleibt und keine Luftblasen in der Suspension entstehen. Nach Abschluss der Homogenisierung wurde die Suspension mit einer abgeschnittenen 1 ml-Pipettenspitze wieder in das Eppendorf-Gefäß zurücktransferiert und auf Eis gestellt, bis nacheinander alle Proben homogenisiert waren. Daraufhin wurden die Homogenate bei $1000 \times g$ für 10 min in einer vorgekühlten Tischzentrifuge zentrifugiert, so dass ein Pellet erhalten wurde, das überwiegend aus Membranbestandteilen und genomischer DNA zusammengesetzt war. Der Überstand, ein Gemisch aus Cytosol und Zellorganellen, wurde abgenommen und bei $12\,000 \times g$ für 30 min zentrifugiert. Der cytosolhaltige Überstand wurde in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt und nochmals bei $13\,200 \times g$ für 30 min zentrifugiert, um möglichst wenig Kontamination mit Zellorganellen zu haben. Das mitochondrienhaltige Pellet wurde mit 200 μ l Mitochondrien-Puffer gewaschen und erneut für bei $12\,000 \times g$ 30 min pelletiert. In Abhängigkeit von der Größe des Mitochondrien-Pellets wurden 50-100 μ l Mitochondrien-Puffer mit Protease-Inhibitor zugegeben und die Mitochondrien sehr vorsichtig mit einem Kunststoff-Stößel gelöst werden. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration (2.13.2) wurden die verschiedenen Proteinfractionen (Membranfraktion, Kombi-Fraktion, Cytosol und Mitochondrien) bei -20°C gelagert.

2.13.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen erfolgte mit dem BCA Protein Assay Kit der Firma Roche, Mannheim, nach Anleitung des Herstellers. In Kürze, mit einem BSA-Standard (2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) wurde eine Verdünnungsreihe (0, 100, 200, 400, 600, 800 und 1000 $\text{ng}/\mu\text{l}$ in jeweils 25 μl) hergestellt. In doppelter Ausführung wurden jeweils 3 μl der Probe in ebenfalls 25 μl Gesamtvolumen mit H_2O bidest. verdünnt. Die Reaktionslösung aus Puffer und Substrat wurde in einem Gesamtansatz für alle Proben angesetzt, jeweils 500 μl zu den vorbereiteten Proben hinzupipettiert und im Wasserbad bei 37°C für 30 min inkubiert. Der Nachweis basiert auf der Reduktion zweiwertiger Kupferionen durch Proteine zu einwertigen Kupferionen. Diese bilden mit der Bicinchoninsäure (BCA) einen intensiv violetten Komplex mit einem Absorptionsmaximum bei 562 nm. Die konzentrationsabhängige Intensität der Färbung wurde im Spektrophotometer bestimmt und die Proteinkonzentration der Probe über die parallel erstellte Standardkurve errechnet.

2.13.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli ²¹³ wurde zur gelelektrophoretischen Auftrennung von Proteinen durchgeführt. Dabei wurden kommerzielle NuPAGE Novex Bis-Tris Gele der Firma Invitrogen, Darmstadt, mit einem kontinuierlichen Acrylamidgradienten von 4-12 % verwendet. Bei der Gelelektrophorese erfolgt zunächst die Konzentration der aufgetragenen Proteine am Übergang zwischen dem Sammelgel und dem Trenngel. Dieser Effekt ist auf die unterschiedlichen Laufeigenschaften der in den Puffern enthaltenden Ionen aufgrund des niedrigeren pH-Werts des Sammelgels zurückzuführen. Die eigentliche Auftrennung vollzieht sich anschließend im Trenngel. Nachdem sich das Natriumdodecylsulfat (SDS) mit seinem langen Dodecylschwanz aufgrund von aliphatischen Wechselwirkungen an die Proteine angelagert und diese denaturiert hat, sorgen die negativ geladenen Sulfatgruppen für eine gleichmäßige, negative Oberflächenladung. Das Proteingemisch wandert deshalb im elektrischen Feld zur Anode und trennt sich ausschließlich aufgrund des durch die Proteingröße erzeugten Laufwiderstandes und nicht aufgrund der im Vergleich zur SDS-Wirkung kleinen Eigenladung der Proteine auf.

1-5 µg der Mitochondrienfraktion bzw. 20-40 µg der Cytosol- oder Kombifraktion (2.13.1.2) wurden in einem maximalen Gesamtvolumen von 20 µl mit ¼ Vol NuPAGE LDS *Sample Buffer* (4x) und 10 % 1 M DTT bei 95 °C für 5 min denaturiert und anschließend entweder bei -20 °C gelagert oder direkt auf das Gel aufgetragen. Als Laufpuffer wurde 1x NuPAGE MES SDS *Running Buffer* verwendet und parallel 7 µl *SeeBluePlusII* Proteinstandard mitgeführt. Die Auftrennung erfolgte bei 80-120 V bis die gewünschte Laufweite erreicht war.

2.13.4 Elektrotransfer von Proteinen (Western Blot)

Im Anschluss an die gelelektrophoretische Auftrennung wurden die Proteine auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran (Immun-Blot PVDF, Bio-RAD) transferiert, um anschließend mit spezifischen Antikörpern Proteine nachzuweisen (2.13.5). Für den Transfer der Proteine auf die Membran wurde der Blot in folgender Reihenfolge aufgebaut: auf die kathodische Seite der Western Blot-Klammer wurde zunächst ein Schwämmchen, ein Whatman-Papier und das Gel gestapelt. Auf das Gel wurde die zugeschnittene Membran luftblasenfrei aufgelegt, so dass der Transfer der Proteine nicht behindert wurde. Den Abschluss bildeten wiederum ein Whatman-Papier, ein zweites Schwämmchen und die anionische Seite der Klammer. Vor dem Aufbau des Blots wurden die Schwämmchen und Whatman-Papiere gut in Transferpuffer getränkt, damit Gel und Membran nicht austrocknen. Die PVDF-Membran muss 10 s in Methanol aktiviert werden und wurde anschließend 2 min mit H₂O bidest. gespült. Der Transfer erfolgte in gekühltem

Transferpuffer bei 200 mA für 1,5 h. Beim Abbau des Blots wurde die Membran zügig in Blockpuffer überführt, um ein Austrocknen der Membran zu vermeiden.

2.13.5 Detektion von Proteinen auf PVDF-Membranen

Die Membran (2.13.4) wurde zunächst in 5 % Blockpuffer für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzudecken. Anschließend wurde der primäre Antikörper in der optimalen Konzentration im Blockpuffer verdünnt und die Membran für 1-2 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBST (jeweils 10 – 20 min) folgte die Inkubation mit einem HRP (*horse radish peroxidase*)-konjugiertem, sekundären Antikörper (in 5 % Blockpuffer) für 45 min bei RT. Im Anschluss an die Inkubation mit dem sekundären Antikörper wurde die Membran wiederum dreimal für 10 – 20 min in TBST gewaschen. Die spezifisch gebundenen Antikörper wurden mit dem ECL Plus-Reagenz (Amersham, München) nachgewiesen. Dabei wird das Substrat Luminogen durch die am sekundären Antikörper gekoppelte Peroxidase unter Emission von Licht (Chemilumineszenz) oxidiert. Ein Hyperfilm™ ECL (GE Healthcare, München) wurde belichtet und die Intensität des Signals mittels ScionImage quantifiziert. Die Quantifizierung erfolgte in Relation zum aufgetragenen Protein, das mittels Coomassie Blue gefärbt wurde. Mindestens zwei unterschiedliche Banden wurden zur Auswertung herangezogen und anschließend der Mittelwert gebildet. Die Ergebnisse der Quantifizierung sind in dieser Arbeit als Verhältnis zur angegebenen Referenzgruppe dargestellt.

2.13.6 Massenspektrometrische Analyse

Die massenspektrometrische Analyse der mitochondrialen Proteine wurde durch Dr. Elke Hammer, Interfakultäres Institut für Genetik und Funktionelle Genomforschung, Ernst-Moritz-Arndt Universität Greifswald, durchgeführt. Dazu wurden jeweils 2 µg der mitochondrialen Proteine (2.13.1.2) einzelner Mäuse (n=4 pro Gruppe) mit Trypsin im Verhältnis zum Protein 1:25 proteolytisch verdaut. Niedermolekulare Kontaminationen in den resultierenden Peptidextrakten wurden durch Reinigung an C18-Material abgetrennt²¹⁴. Die Analyse der Peptidgemische erfolgte mittels LC-ESI-MS/MS nach chromatographischer Trennung auf einer nanoAquity UPLC Säule (BEH130C18, 1,7 µm, 100 µm × 100 mm, Waters, Cambridge, UK) in einem nicht linearen 265 min-Gradienten von 1-25 % Acetonitril in 0,1 % Essigsäure in einem LTQ-Orbitrap Massenspektrometer (Thermo Scientific, Bremen). Die Identifizierung der Proteine erfolgte mittels Sequest-Algorithmus auf einer Sorcerer-Plattform (Sage-N Research Inc., San Jose, USA) durch Vergleich zur SwissProt Datenbank (Stand 03/09) mit der Einschränkung auf das Taxon

Mus musculus. Der relative Vergleich der Proteinmengen wurde mittels labelfreier Quantifizierung auf Basis der Peak-Intensitäten der Peptide mit der Software Rosetta Elucidator Version 3.3.0.1.39 (www.rosettatabio.com/products/elucidator; Rosetta Bio-Software, USA) durchgeführt. Unterschiede in der Proteinmenge zwischen den Gruppen wurden als signifikant betrachtet, wenn die statistische Analyse der Daten mittels Student t-Test einen p-Wert <0,05 ergab.

2.13.7 Enzymaktivität

2.13.7.1 *Aktivität der Atmungskettenkomplexe*

Die Aktivität der isolierten Komplexe der Atmungskette bei 25 °C wurde spektrophotometrisch bestimmt. Die Messung erfolgte unmittelbar im Anschluss an die Aufreinigung der Mitochondrien (2.13.1.2), um einen Aktivitätsverlust durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben zu vermeiden. Mindestens eine Probe pro Gruppe wurde an jedem Messtag mitgeführt, um Schwankungen zwischen einzelnen Messtagen gleichmäßig zu verteilen. Frisch isolierte Mitochondrien wurden in der Verdünnung 1:10 bis 1:20 (in 0,3 M Sucrose, 10 mM KH₂PO₄ pH 6.5, 1 mg/ml BSA) verwendet, um eine lineare Atmungsgeschwindigkeit zu gewährleisten. Die Messung erfolgt in Einmal-Küvetten (Plastibrand) mit einer Wanddicke von 10 mm. Alle Messungen wurden zwei- ggf. dreifach durchgeführt und der Mittelwert aus den Aktivitätswerten gebildet. Die Aktivität bezogen auf den Gesamtproteingehalt im Reaktionsansatz errechnet sich nach folgender Formel:

$$\text{nmol/min mg mit. Protein} = \frac{\Delta E/\text{min} \times V_{\text{ges}} [\text{ml}] \times d [\text{cm}]}{\epsilon [\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}] \times V_{\text{mit}} [\text{ml}] \times c [\text{mg/ml}]}$$

$\Delta E/\text{min}$: Extinktionsänderung pro Minute

V_{ges} : Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes [ml]

d : Schichtdicke der Küvette = 1 cm

ϵ : spezifischer Extinktionskoeffizient [$\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$]

V_{mit} : Volumen der eingesetzten Mitochondriensuspension [ml]

c : Proteinkonzentration der eingesetzten Mitochondriensuspension [mg/ml]

2.13.7.1.1 *NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase*

Die Aktivität des Komplex I wurde über die Reduktion von oxidiertem Decylubichinon ermittelt, die bei einer Wellenlänge von $\lambda=340$ nm gemessen werden kann. In einer kleinvolumigen Reaktionsküvette wurden 200 μl Komplex I-Puffer vorgelegt. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von 4 μg Mitochondriensuspension gestartet. Die Messung

erfolgt über 3 min mit einem Messabstand von jeweils 10 s. Der Extinktionskoeffizient für oxidiertes Decylubichinon beträgt $\epsilon=6,2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

2.13.7.1.2 Succinat:Ubichinon-Oxidoreduktase

Die Enzymaktivität des Komplexes II wird mit Hilfe des künstlichen Elektronenakzeptors Dichlorophenolindolphenol (DCPIP) gemessen. Die Extinktionsabnahme des verbrauchten DCPIP kann spektrophotometrisch bei $\lambda=600 \text{ nm}$ verfolgt werden. 200 μl Komplex II-Puffer werden vorgelegt und die Reaktion mit 2 μg Mitochondriensuspension gestartet. Nach 2 min Vorinkubationszeit wird anschließend für 3 min alle 10 s ein Messwert aufgenommen. Der Extinktionskoeffizient beträgt $\epsilon=20,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

2.13.7.1.3 Ubihydrochinon:Cytochrom c-Oxidoreduktase

Die Enzymaktivität des Komplexes III wird mit Hilfe des künstlichen Substrats Decylubichinon- H_2 gemessen. Komplex III oxidiert Decylubichinon unter Reduktion von Cytochrom c. Die Extinktionszunahme des oxidierten Cytochrom c kann bei $\lambda=550 \text{ nm}$ bestimmt werden. In die Reaktionsküvette werden zunächst 225 μl Desoxycholatl-Wasser und 5 μg Mitochondrien pipettiert und die Mitochondrien für 1 min lysiert. Anschließend werden 25 μl Komplex III-Puffer und 1 μl reduziertes Decylubichinon hinzugegeben. Die Messung erfolgt über einen Zeitraum vom 2 min im Abstand von jeweils 5 s. Der Extinktionskoeffizient beträgt $\epsilon=19,2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

2.13.7.1.4 Cytochrom c: O_2 -Oxidoreduktase

Zur Messung der Aktivität des Komplexes IV lässt man reduziertes Ferro-Cytochrom c durch die Cytochrom c-Oxidase oxidieren und verfolgt die Extinktionsabnahme bei $\lambda=550 \text{ nm}$. Die Reaktion findet in 200 μl Komplex IV-Puffer mit 1 μg Mitochondrienprotein statt. Der Verlauf der Reaktion wird für 2 min alle 5 s gemessen. Der Extinktionskoeffizient beträgt $\epsilon=18,5 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

2.13.7.2 Aktivität der Creatinkinase

Die Aktivität die CK wurde mit dem CK (NAC) Granutest 2.5 Kit der Firma Beckman Coulter (Fullerton, USA) nach Anleitung des Herstellers bestimmt. Die Messung erfolgte entweder mit der cytosolischen Fraktion oder mit isolierten Mitochondrien (2.13.1.2), um die Aktivität sowohl der cytosolischen als auch die mitochondrialen CK zu erhalten ²¹⁵.

2.13.8 Bestimmung der Lipidperoxidation

Zur Bestimmung der myokardialen Lipidperoxidation (LPO), ein Indikator des zellulären, oxidativen Stresses, wurde das LPO 586 Kit verwendet (Oxis International, Portland, Oregon, USA), mit dem das Vorhandensein von Malondialdehyd (MDA) und 4-Hydroxyalkenalen (HAE) spektrophotometrisch (586 nm) nachgewiesen und quantifiziert werden kann. Dazu wurde Gewebe in einem 10-fachen Volumen des Gewichts in 10 % PBS (20 mM, pH 7,4, 4 °C) und 5 mM butyliertem Hydroxytoluol, ein Antioxidans, mittels eines Glas-Homogenisators homogenisiert. Das Homogenat wurde bei 3000 × g für 10 min und bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde nach Angaben des Herstellers zur Quantifizierung der LPO verwendet.

2.14 Zellbiologische Arbeitsmethoden

2.14.1 Isolierung primärer embryonaler Kardiomyozyten der Maus (PECM)

Zur Präparation des Uterus der Maus wird die tragende Maus (E13-14) mittels Genickbruch getötet, auf den Rücken gelegt und die Bauchseite sorgfältig mit 70 %-igen Ethanol benetzt. Mit einer Pinzette wird die Haut über dem unteren Bauchraum angehoben, mit einer Schere ein horizontaler Schnitt durchgeführt und der Bauchraum durch seitliche Einschnitte freigelegt. Anschließend wird der Uterus an einem Ende aus dem Bauchraum herausgeholt, nacheinander die einzelnen Embryonen abgeschnitten und in eine Petrischale mit eisgekühltem PBS transferiert. Die Präparation der Embryonen aus dem Uterus erfolgt unter dem Binokular. Jeder Embryo wird einzeln in einer mit frischem PBS gefüllten Petrischale präpariert, wobei abgetrennte Teile sofort aus der Schale entfernt werden sollen, um Kontaminationen zu vermeiden. Mit feinen Pinzetten (Dumont #5) wird die Hülle um den Embryo vorsichtig zerrissen und der Embryo mit der Fruchtblase freigelegt. Die Fruchtblase und der Dottersack werden ebenfalls durch vorsichtiges Reißen abgetrennt. Nach der Dekapitation des Embryos mit einem Skalpell, wird zur Präparation des Herzens der Embryo mit einer zwischen den Armen platzierten Pinzette auf dem Rücken fixiert, das zwischen den Armen sitzende Herz mit einer zweiten Pinzette vorsichtig herausgenommen und in ein Eppendorf-Gefäß mit 30 µl eisgekühltem Trypsin/EDTA (PAA, Pasching/A) überführt. Das Herz muss vollständig bedeckt sein und wird anschließend bei 4 °C über Nacht verdaut. Um die Kardiomyozyten zu vereinzeln wird nach ca. 20 h das Trypsin/EDTA-Herz-Gemisch für 15 min bei 37 °C und 300 rpm auf einem Thermomixer inkubiert. Pro Well einer 12-Well-Platte sollen die Zellen von 1,5 Herzen ausplattiert werden, so dass in Abhängigkeit von der Anzahl der isolierten Herzen und der Menge der benötigten Wells entsprechend Medium (DMEM, 10 % FBS, 1 % Penicillin/Streptomycin, ohne L-Glutamin) in die Eppendorf-Gefäße pipettiert wird.

Durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren wird das Gewebe weitestgehend homogenisiert und alle Kardiomyozyten eines Genotyps in einer unbeschichteten T75-Flasche zusammengeführt, um die Fibroblasten zu entfernen. Nach 1 h unter Kulturbedingungen (37 °C, 5 % CO₂) sind die Fibroblasten adhärent geworden. Der die Kardiomyozyten enthaltende Überstand wird in einem Schwung abgenommen und das vorher berechnete Volumen in die Wells einer Fibronectin-beschichteten (mind. 2 h) 12-Well-Platte überführt. Nach 16 h wird das Medium erstmals gewechselt und nach weiteren 48 h dem Medium 0,1 mmol/l BrdU zugesetzt, um die Vermehrung der verbliebenen Fibroblasten zu hemmen. Am Tag 6 nach dem Aussäen der Zellen wurden die Infektionsversuche durchgeführt (2.16.1).

2.14.2 Isolierung primärer neonataler Kardiomyozyten der Ratte (PNCM)

Primäre Kardiomyozyten aus neonatalen Ratten wurden von Frau Inga Vogelpohl isoliert und zur Verfügung gestellt. In Kürze, neonatale Sprague-Dawley (SD)-Ratten (1-3 Tage) wurden zur Desinfektion vollständig in 70 %-igen Ethanol eingetaucht und mit einer groben, sterilen Schere durch Dekapitation getötet. Ohne Verletzung des Bauchraumes wurde mit Hilfe einer feinen, sterilen Schere der Brustkorb geöffnet, das Herz entnommen und in eine mit HBSS gefüllte Petrischale auf Eis gelegt. Nach Entnahme der Herzen aller verfügbaren Tiere wurden mit Hilfe zweier Skalpelle zunächst die Vorhöfe abgetrennt und anschließend die Herzen grob zerkleinert und in 15 ml-Zentrifugenröhrchen mit Trypsinlösung (GIBCO, Darmstadt) überführt. Der Verdau des Herzgewebes erfolgte über Nacht, jedoch für mindestens 18 h, bei 4 °C und geringer Rotationsbewegung (ca. 1 U/min). Am nächsten Tag werden die Herzen mittels Collagenase-Verdau endgültig aufgelöst, die groben Gewebereste über sterile Mullkompressen abgetrennt und die Zellen pelletiert (1200 U/min, 5 min, RT). Die Zellen wurden in Medium aufgenommen und für 90 min bei 37 °C inkubiert, um die Fibroblasten abzutrennen. Der Kardiomyozytenhaltige Überstand wurde abgenommen, die Kardiomyozyten nochmals pelletiert und in substituiertem DMEM-Medium (1 % Penicillin/Streptomycin, 2 µM FUDR, ohne FBS) ausplattiert. Nach Zählung der Kardiomyozyten in einer Neubauer-Zählkammer (2.14.2.1) wurde diese auf FBS-beschichteten 12-Well-Platten (4 % FBS Gold, PAA, Pasching/A) ausplattiert. Nach dem Absetzen der Zellen, das nach etwa 3 h unter Kulturbedingungen bei 37 °C und 5 % CO₂ größtenteils geschehen ist, wurden die Cytokin-Experimente gestartet (2.14.2.2).

2.14.2.1 Zellzahlbestimmung

Um die Zellzahl zu bestimmen, wurden die Zellen in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop gezählt. Es wurden jeweils vier Großquadrate (Q) ausgezählt und die Zellzahl dann nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellzahl (Zellen/ml)} = [(Q1+Q2+Q3+Q4)/4] \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

2.14.2.2 Inkubation von Kardiomyozyten mit Cytokinen

In FBS-beschichteten 12-Well-Platten wurden 7×10^5 PNCM-Zellen pro Well in Medium ohne FBS-Zusatz ausplattiert (2.14.2) und bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach dem Absetzen der Zellen (nach ca. 3 h) wurden die Cytokine (IL-1 β : 30 ng/ml Medium, TNF α : 30 ng/ml, TGF β : 1 ng/ml, IFN β : 30 ng/ml) zum vorhandenen Medium zugegeben und die Zellen für 24 h unter Kulturbedingungen inkubiert. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurde das Medium abgenommen, die Zellen einmal mit eisgekühltem PBS gewaschen, mit TRIzol[®] von der Platte abgelöst und bis zu Isolierung der RNA (2.12.2) bei -80 °C gelagert.

2.15 Tiermodelle

Versuchstiere wurden unter Beachtung der deutschen Tierschutzverordnung in der Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin (FEM) in Berlin gehalten. Die Haltung erfolgte in einem zwölfstündigen Tag-Nacht-Rhythmus. Nahrung und Wasser standen den Tieren *ad libitum* zur Verfügung. Urstamm für alle verwendeten Stämme war der C57BL/6-Stamm, in dessen Hintergrund zum einen die ANT1-transgenen Linien (α MHC-ANT1-C57BL/6, 2.15.1) generiert wurden. Zum anderen wurden über sechs Generationen A.SW/SnJ-Mäuse (2.15.2) eingekreuzt und ein Stamm mit chronischer Disposition erhalten (A.SW). Behördliche Genehmigungen für die Durchführung der CVB3-(G0060/05, G0213/03) und STZ-Experimente (G0258/05) lagen bei Versuchsbeginn vor.

2.15.1 ANT1-transgenes Mausmodell

Die Herstellung des ANT1-transgenen Mausmodells erfolgte durch die Firma RCC Ltd. (Füllinsdorf, Schweiz). Die kodierende Sequenz des murinen ANT1 (NM_007450.4) wurde unter Verwendung kardialer cDNA mittels PCR amplifiziert. Das *SalI/HindIII*-Fragment (Abbildung 3.10) wurde in einen Vektor, der den murinen Promotor der alpha-Myosin Schwereketten (α MHC) und das Polyadenylierungssignal des humanen Wachstumshormons (hGHpA) enthielt, kloniert. Durch den kommerziellen Anbieter wurde das linearisierte

Konstrukt in die Vorkerne befruchteter Oozyten nach einem Standardprotokoll mikroinjiziert³²⁴ und ANT1-transgene Mäuse im C57BL/6-Hintergrund herangezogen.

Die hämodynamische Charakterisierung der ANT1-transgenen Mäuse im Vergleich zum C57BL/6-Wildtyp wurde von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Carsten Tschöpe durchgeführt. Die Tiere wurden initial mit Thiopental (125 µg/g Körpergewicht, i. p.) narkotisiert und während der Messung beatmet. Ein 1.4 F Mikro-Konduktanz-Katheter (Millar-Instruments, Houston, Texas, USA) wurde zur kontinuierlichen Aufnahme der linksventrikulären Druck-Volumen-Kurve im linken Ventrikel positioniert. Die systolische Funktion wurde durch den linksventrikulären endsystolischen Druck (ESP, in mmHg) quantifiziert, während dP/dt_{max} (mmHg/s) als Index der linksventrikulären Kontraktilität verwendet wurde. Die diastolische Funktion wurde durch den linksventrikulären enddiastolischen Druck (LVEDP, in mmHg), dP/dt_{min} (mmHg/s) und die isovolumetrische Relaxation Tau (ms) gemessen. Die allgemeine kardiale Funktion wurde durch das endsystolische und enddiastolische Volumen (µl), das Schlagvolumen (µl), die Ejektionsfraktion (%) und die Herzrate (Schläge/min) quantifiziert²¹⁶.

2.15.2 Mausmodell der CVB3-Myokarditis

Zur Induktion der CVB3-Myokarditis wurden Männchen des C57BL/6- und A.SW-Wildtyps sowie des ANT1-transgenen Stamms im Alter von sechs Wochen intraperitoneal (i. p.) mit 5×10^5 pfu CVB3 in 200 µl PBS infiziert (Durchführung Dr. rer. nat. Andrea Dörner und Linda Ebermann). In der nicht infizierten Kontrollgruppe wurden jeweils gleichaltrigen Männchen 200 µl PBS i. p. injiziert.

Während des Inkubationszeitraumes wurden in regelmäßigen Abständen Aussehen, Gewicht und Verhalten der Mäuse untersucht, um eine Aussage über den Krankheitsverlauf treffen zu können. Zum angesetzten Versuchsende (Tag 4, 8, 28 bzw. 90 nach der Infektion, s. Abbildungen 3.1 und 3.18) wurden die Mäuse euthanasiert und Organe (Herz, Pankreas, Leber, Milz) sowie Blut entnommen. Vom Herz wurden zunächst die Vorhöfe entfernt, der Ventrikel transversal geschnitten, der basale Teil nochmals geteilt und in flüssigem Stickstoff eingefroren, so dass Gewebeproben für Plaque-Assay (2.16.2), RNA- (2.12.2) und Proteinisolierung (2.13.1.2) erhalten wurden. Der apikale Teil wurde in 4 %-iges Formalin überführt und für die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (2.17) verwendet. Von den anderen Organen wurde ebenfalls jeweils eine Probe in Stickstoff eingefroren und ein Teil in Formalin fixiert.

2.15.3 Mausmodell des Streptozotocin (STZ)-Diabetes

In 5-6 Monate alten Männchen der ANT1-transgenen Linie und gleichaltriger C57BL/6-Wildtypen wurde Diabetes mellitus durch die tägliche Injektion von STZ (50 mg STZ/kg Körpergewicht in 0,1 M Citratpuffer, pH 4,5) an fünf aufeinander folgenden Tagen induziert. Nach einer und nach sechs Wochen wurde die Blutglukosekonzentration mittels Glucometer (Accu-Chek, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) bestimmt. Sechs Wochen nach der Induktion wurden die Tiere zunächst hämodynamisch untersucht und anschließend getötet und Gewebeproben entnommen.

Die hämodynamische Untersuchung der diabetischen Mäuse und der nicht diabetischen Kontrollen wurde durch Dr. Yong Wang übernommen. Narkose wurde durch 4 % Isofluran induziert, die narkotisierten Mäuse intubiert und mit einer Mischung aus 70 % Raumluft, 30 % Sauerstoff und 2 % Isofluran künstlich beatmet²¹⁷. Ein 1.4 F Micro Tip Katheter (Millar Instruments, Houston, Texas, USA) wurde über die rechte *Arteria carotis* in den linken Ventrikel eingeführt, um den arteriellen und linksventrikulären Druck zu messen. Darauffolgend wurden Messungen des systolischen Blutdrucks (SBP, in mmHg), des linksventrikulären systolischen Druckes (LVSP, mmHg), der linksventrikuläre Kontraktionsparameter dP/dt_{max} (in mmHg/s) und der Relaxationsparameter dP/dt_{min} (in mmHg/s) unternommen. Im Anschluss an die Messungen wurde die narkotisierten Mäuse durch Entfernung des Herzens getötet. Herz, Lunge und Nieren wurden gewogen und in flüssigem Stickstoff bis zur weiteren Analyse eingefroren.

2.16 **Virologische Methoden**

2.16.1 Infektion von Zellkulturen mit Coxsackieviren

Die Infektion von Zellen in Kultur mit Coxsackievirus B3 erfolgte stets in serumfreiem Medium. Das Virusaliquot wurde unmittelbar vor der Infektion aus dem -80 °C Gefrierschrank entnommen und schnell bei 37 °C aufgetaut. Je nach Konzentration des Virus (Plaque-bildende Einheiten pro ml [pfu/ml]) und der eingesetzten *multiplicity of infection* (MOI) wurde das Virus mit Medium ohne Zusatz von FBS verdünnt, das Zellkulturmedium von den Zellen abgenommen und das verdünnte Virus vorsichtig auf die Zellen pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 37 °C wurde der Virusüberstand abgesaugt und die Zellen mit frischem Medium (5 % FBS) für 24 h bei 37 °C kultiviert. Die MOI berechnet sich aus der Zellzahl und der Konzentration des verwendeten Virus. Dabei bedeutet, dass bei einer MOI 1 ein Viruspartikel pro Zelle auf die Zellkultur gegeben wird; MOI 0,1 entspricht 1 infektiöses Virus auf 10 Zellen und so

weiter. Die Infektionsversuche in der Zellkultur wurden freundlicherweise von Dr. rer. nat. Sandra Pinkert und Alice Weithäuser durchgeführt.

2.16.2 Bestimmung der Coxsackievirus-Konzentration durch Plaque-Assay

Um die Anzahl der infektiösen Viruspartikel in einer Probe zu ermitteln, wurde das Homogenat dieser Probe mittels Plaque-Assay auf HeLa-Zellen ausstitriert. Dafür wurden am Vortag HeLa-Zellen so ausgesät, dass sie am nächsten Tag einen konfluenten Monolayer bildeten (6-Well-Platte = $1,2 \times 10^6$ Zellen/Well). Am nächsten Tag wurde von der zu bestimmenden Virusprobe eine logarithmische Verdünnungsreihe mit serumfreiem Medium hergestellt. Nach der Abnahme des Mediums von den konfluenten HeLa-Zellen erfolgte die Inokulation mit 1 ml (6-Well-Platte) Virusverdünnung für 30 min bei 37 °C im Brutschrank. Bereits vor der Inokulation des Virus wurde der aus zwei Lösungen zusammengesetzte Agar-Overlay vorbereitet. In Lösung A wurde 0,32 g Agar mit 10 ml H₂O bidest. gemischt und anschließend in einem Topf mit Wasser über einen Bunsenbrenner für 15 min gekocht bis sich der gesamte Agar aufgelöst hatte. Für Lösung B wurden 30 ml Eagle-Overlay mit 4 ml FBS vermischt und im Wasserbad auf 41,5 °C erwärmt. Nach 15-minütigem Kochen der Lösung A, wurde die Lösung B zur Lösung A hinzugegeben, gut durchmischt und im Wasserbad bei 41,5 °C mindestens 30 min temperiert. Im Anschluss an die 30-minütige Inokulation der Virusverdünnungen wurden diese vorsichtig abgesaugt und die Zellen mit 2 ml (6-Well-Platte) Agar-Overlay überschichtet. Nach Erkalten und Aushärten des Overlays wurden die Zellen für 72 h im Brutschrank bei 37 °C inkubiert, anschließend die Plaques angefärbt und ausgezählt. Zum Anfärben wurde 0,02 g Neutralrot in 50 ml PBS gelöst, filtriert und jeweils 2 ml (6-Well-Platte) auf den Agar-Overlay pipettiert. Nach einer weiteren Inkubation für 2,5 bis 4 h bei 37 °C im Brutschrank wurde die Färbelösung ohne den Agar zu beschädigen abgesaugt und anschließend die Plaques ausgezählt. Die Anzahl der infektiösen Viruspartikel wird in Plaque-bildenden Einheiten (pfu, *plaque forming units*) pro ml Kulturmedium angegeben.

Wurde als Ausgangsmaterial eine Gewebeprobe für ein Plaque-Assay verwendet, wurde diese in 2 ml serumfreien DMEM-Medium aufgenommen, mit Hilfe eines Häckslers zerkleinert, dreimal eingefroren und wieder aufgetaut. Anschließend wurden die zerkleinerten Gewebestückchen bei 5 000 rpm für 3 min abzentrifugiert und der Überstand wie oben angegeben für den Plaque-Assay verdünnt. Im Anschluss werden die Plaque-bildenden Einheiten pro Gramm Gewebe (pfu/g) berechnet. Die Durchführung der Plaque-Assays wurde freundlicherweise von Dr. rer. nat. Andrea Dörner übernommen.

2.16.3 Nachweis der CVB3-RNA mittels *in situ* Hybridisierung

Um CVB3-infizierte Zellen im Herzen nachzuweisen, wurde das RNA-Genom des CVB3 mit radioaktiven einzelsträngigen RNA-Sonden hybridisiert. Die ³⁵S-markierten Sonden wurden mit Hilfe des Plasmids pCVB3-R1 hergestellt. Kontroll-RNA-Proben wurden vom Vektor pSPT18 gewonnen ²⁸. Die *in situ* Hybridisierung wurde im Labor von Dr. Karin Klingel, Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Tübingen, durchgeführt und ausgewertet.

2.17 **Hämatoxylin-Eosin-Färbung von Paraffin-Schnitten**

Hämatoxylin-Eosin (HE) ist ein Farbstoffgemisch, das Zellen rot und Zellkerne blau anfärbt, so dass die Infiltration von Immunzellen in Gewebeschnitten überprüft werden kann. Die in den Tierexperimenten entnommenen Organe wurden nach Entnahme in 4 % Formalinlösung eingelegt und über mindestens 24 h fixiert. Anschließend wurden die Gewebe in Paraffin eingebettet, mit einem Mikrotom Schnitte mit einer Dicke von 4 µm hergestellt und diese auf Glas-Objektträger übertragen. Die Entparaffinierung und die Anfärbung der Schnitte wurden automatisiert durchgeführt (Institut für kardiale Diagnostik und Therapie, Berlin) und die gefärbten Gewebeschnitte anschließend mit Entellan® eingebettet und unter dem Mikroskop ausgewertet. Für die Quantifizierung der Infiltration wurde eine Skala von 0 - 4 festgelegt: 0 = keine Infiltrate; 1 = kleine fokale Ansammlung von infiltrierenden Zellen zwischen Myozyten; 2 = größere Foki > 100 infiltrierende Zellen; 3 = < 10% des Gewebeschnittes von infiltrierender Zellen betroffen; 4 = 10 - 30% des Gewebeschnittes von Infiltration betroffen ²¹⁸, wobei der gesamte Querschnitt begutachtet wurde. Die Auswertung erfolgte durch 2-3 Personen in unabhängiger Begutachtung.

2.18 **Datenbanken**

Nukleotid- und Proteinsequenzen wurden mit den Sequenzdatenbanken GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) und Expasy (www.expasy.ch) mittels des BLAST-Programms ²¹⁹ analysiert.

2.19 **Programme**

Sequenzanalysen wurden mit den Anwendungen Chromas Lite 2.01 (Technelysium Pty Ltd., www.technelysium.com.au) und NEBcutter (New England Biolabs, <http://tools.neb.com/NEBcutter2/>) durchgeführt. Für die quantitativen Auswertungen wurde das Programm ScionImage for Windows (Scion Corporation, www.scioncorp.com) verwendet. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms GraphPad Prism 4 (GraphPad Software Inc.).

2.20 Statistische Evaluierung

Beim Vergleich zweier Gruppen wurde der ungepaarte Student t-Test angewandt, der bei einzelnen, stark abweichenden Werten (ungleiche Varianzen) um die Welch-Korrektur erweitert wurde. Lag den Messdaten keine Gauß-Verteilung zugrunde bzw. gab es nur eine kleine Probenzahl wurde stattdessen der Mann-Whitney U Test durchgeführt. Wurden mehr als zwei Gruppen miteinander verglichen, wurde der einfaktorielle ANOVA bzw. der Kruskal-Wallis Test mit Bonferroni Post-Test angewandt. Korrelationsanalysen wurden nach Pearson durchgeführt. Statistische Signifikanz wurde bei p-Werten, die kleiner als 0,05 waren, angenommen. Alle Angaben erfolgen als Mittelwert \pm SEM.

3 ERGEBNISSE

3.1 Charakterisierung der resistenten und permissiven Tiermodelle

Die Verfügbarkeit unterschiedlicher Mausmodelle ermöglicht vergleichende Untersuchungen zur Myokarditis zwischen resistenten Stämmen mit einem ausheilenden Verlauf und permissiven Stämmen mit einem chronischen Verlauf. Im Rahmen dieser Arbeit wurden als Vertreter eines resistenten Stamms C57BL/6-Mäuse gewählt. Diese entwickeln nach Infektion mit CVB3 eine akute Myokarditis, die nach Eliminierung der Viren vollständig ausheilt^{25, 220}. Demgegenüber stehen permissive A.SW-Mäuse, die im Anschluss an die akute Phase eine chronische Myokarditis entwickeln, die begleitet wird von der Produktion struktur- und funktionsschädigender, herzspezifischer Autoantikörper^{86, 90, 195}.

Die Induktion der Myokarditis in C57BL/6- und A.SW-Mäusen erfolgte durch Injektion von CVB3 in den Bauchraum der Tiere (2.15.2). Die infizierten Tiere und gleichaltrige, nicht infizierte Kontrolltiere wurden, wie im Infektionsschema in Abbildung 3.1 dargestellt, zu einem gemeinsamen akuten Zeitpunkt, 8 Tage nach der Infektion, getötet. Dieser Zeitpunkt diente der Identifizierung signifikanter Unterschiede zwischen den Tiermodellen im akuten Stadium der Erkrankung, um so möglicherweise prognostische Faktoren für den weiteren Verlauf der Erkrankung zu erschließen. Der spätere Zeitpunkt der Tötung wurde für beide Tiermodelle unterschiedlich gewählt. Da C57BL/6-Mäuse nach Ablauf der akuten Phase schnell und vollständig ausheilen, war eine Beendigung des Versuchs am Tag 28 nach der Infektion sinnvoll. In A.SW-Tieren hingegen beginnt nach dem akuten Stadium eine zweite, progressive Erkrankungsphase. Um eine umfassende Entwicklung des chronischen Krankheitsbilds zu gewährleisten, wurde die Infektion der permissiven Tiere bis zum Tag 90 nach der Infektion fortgesetzt.

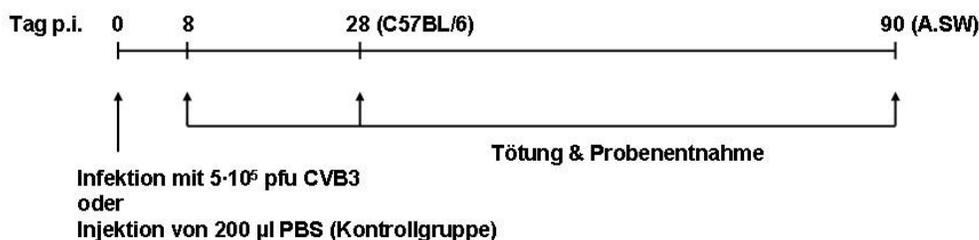


Abbildung 3.1: Infektionsschema der CVB3-Infektion. Sechs Wochen alte Männchen der Stämme C57BL/6 und A.SW wurden am Tag 0 mit $5 \cdot 10^5$ pfu CVB3 i. p. infiziert. Die Tiere wurden in Gruppen eingeteilt ($n \geq 6$), welche am Tag 8, 28 oder 90 nach der Infektion zur Organentnahme getötet wurden. Gleichaltrigen Kontrolltieren wurden 200 µl PBS i. p. injiziert. p. i.: *post infectionem*

3.1.1 CVB3-Myokarditis im resistenten und permissiven Tiermodell

Nach der Infektion mit CVB3 zeigten alle Tiere deutliche Krankheitssymptome wie Apathie, struppiges Fell und starken Gewichtsverlust bis 10 % des Ausgangsgewichts. Sowohl bei den resistenten C57BL/6- als auch den permissiven A.SW-Mäusen überlebten über 95 % der infizierten Tiere bis zum angesetzten Ende des Versuchs.

Im Herzgewebe der infizierten Tiere wurde zunächst die Infektion evaluiert. Dazu wurde der kardiale Virustiter mittels Plaque-Assay bestimmt (2.16.2), die virale Infektion mittels *in situ* Hybridisierung (2.16.3) beschrieben und die Infiltration des Herzgewebes mit Immunzellen in Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Gewebeschnitten (2.17) untersucht.

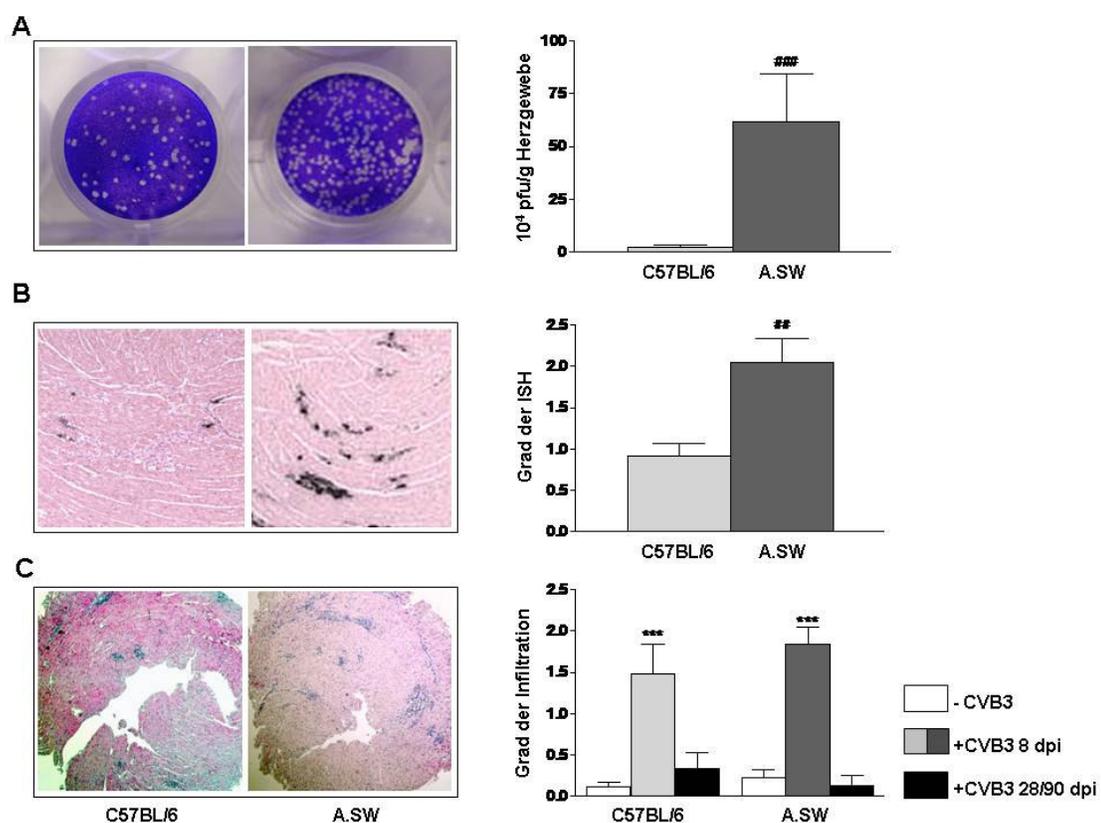


Abbildung 3.2: Evaluierung der CVB3-Infektion im Herzen. Bestimmung des Virustiters in CVB3-infizierten Herzen am Tag 8 nach der Infektion mittels (A) Plaque-Assay und (B) *in situ* Hybridisierung. Vergrößerung $\times 10$. (C) In Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Formalinschnitten wurde der Grad der Entzündung durch Infiltration mit Immunzellen und Cytolyse von Kardiomyozyten quantifiziert. Vergrößerung $\times 4$. Die Beurteilung erfolgte nach folgenden Kriterien: 0-keine, 1-geringe, 2-mittlere, 3-hohe und 4-massive Infiltration. *** $p < 0,001$ vs. -CVB3; ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ vs. C57BL/6 +CVB3 8 dpi; $n \geq 6$. dpi: Tage *post infectionem*.

Am Tag 8 nach der Infektion betrug die kardiale Viruslast in resistenten C57BL/6-Mäusen durchschnittlich $2,49 \pm 0,96 \cdot 10^4$ pfu/g Herzgewebe (Abbildung 3.2A). Demgegenüber ließ

sich für permissive A.SW-Mäuse zum gleichen Zeitpunkt ein deutlich höherer Mittelwert von $61,9 \pm 22,6 \cdot 10^4$ pfu/g Herzgewebe ($p < 0,001$) ermitteln. Dieser Unterschied in der Virusreplikation konnte mittels *in situ* Hybridisierung bestätigt werden ($0,92 \pm 0,15$ vs. $2,05 \pm 0,29$, $p < 0,01$), wobei sich die Foki in A.SW-Herzen durchschnittlich sowohl in der Anzahl als auch in der Stärke der Signale von denen in C57BL/6-Herzen unterschieden (Abbildung 3.2B).

Gleichzeitig konnte am Tag 8 nach der Infektion eine Zunahme der zellulären Infiltrate beobachtet werden (Abbildung 3.2C). Trotz des 25-fach höheren Virustiters in A.SW-Herzen im Vergleich zu C57BL/6 war das Ausmaß der Infiltration des Herzens in beiden Tiermodellen am Tag 8 nach der Infektion vergleichbar ($1,83 \pm 0,21$ vs. $1,49 \pm 0,36$, $p > 0,05$). Zum Zeitpunkt der zweiten Messung waren sowohl in C57BL/6- (Tag 28) als auch in A.SW-Herzen (Tag 90) histologisch keine inflammatorischen Infiltrate mehr nachweisbar. Somit war in beiden Stämmen die Infektion mit CVB3 erfolgreich, so dass sich diese Tiermodelle für die weitere Analyse der mitochondrialen Funktion in CVB3-infizierten Herzen eigneten.

3.1.2 Der mitochondriale Energiestoffwechsel in der CVB3-Myokarditis

Die Beeinflussung des mitochondrialen Energiestoffwechsels durch die Virusinfektion und die immunologische Antwort des Wirts im resistenten und permissiven Mausmodell wurde an drei verschiedenen Punkten untersucht. Die Energieproduktion wurde über die Aktivität der Atmungskettenkomplexe I, II, III und IV betrachtet (3.1.2.1). Der Energietransfer aus dem Mitochondrium wurde durch Quantifizierung der ANT-Expression (3.1.2.2) und durch Expressions- und Aktivitätsanalyse des CK-Systems überprüft (3.1.2.3).

3.1.2.1 *Die Aktivität der Atmungskettenenzyme in der CVB3-Myokarditis*

Die Aktivität der Atmungskettenenzyme wurde in Präparationen kardialer Mitochondrien aus infizierten Tieren und nicht infizierten Kontrollen gemessen (2.13.1.2, 2.13.7.1).

In nicht infizierten C57BL/6- und A.SW-Mäusen wurden in der Aktivität der Atmungskettenenzyme keine Unterschiede zwischen den beiden Stämmen festgestellt. Zudem war die Aktivität nicht vom Alter der untersuchten Tiere abhängig (nicht abgebildet).

Die Infektion mit CVB3 führte zu Aktivitätsveränderungen, die sich zwischen resistenten und permissiven Mausstämmen deutlich unterschieden (Abbildung 3.3). In infizierten C57BL/6-Mäusen (Abbildung 3.3A) wurde am Tag 8 nach der Infektion für Komplex I und Komplex III eine signifikante Zunahme der Aktivität um 22 % bzw. 45 % gemessen, wohingegen die Aktivität des Komplexes II geringfügig abnahm und die Aktivität des Komplexes IV am Tag 8 nach der Infektion unverändert war. Am Tag 28 nach der

Infektion unterschieden sich die Aktivitäten aller vier Komplexe der Atmungskette nicht mehr von denen der nicht infizierten Kontrolltiere. Demgegenüber wurde im A.SW-Hintergrund (Abbildung 3.3B) am Tag 8 nach der Infektion eine signifikante ca. 20 %-ige Reduktion der Aktivitäten aller vier Atmungskettenkomplexe in infizierten Tieren im Vergleich zur nicht infizierten Kontrollgruppe nachgewiesen. Während sich die Aktivität der Komplexe II, III und IV bis Tag 90 nach der Infektion wieder normalisierte, war die Aktivität des Komplexes I auch zu diesem späten Zeitpunkt noch reduziert.

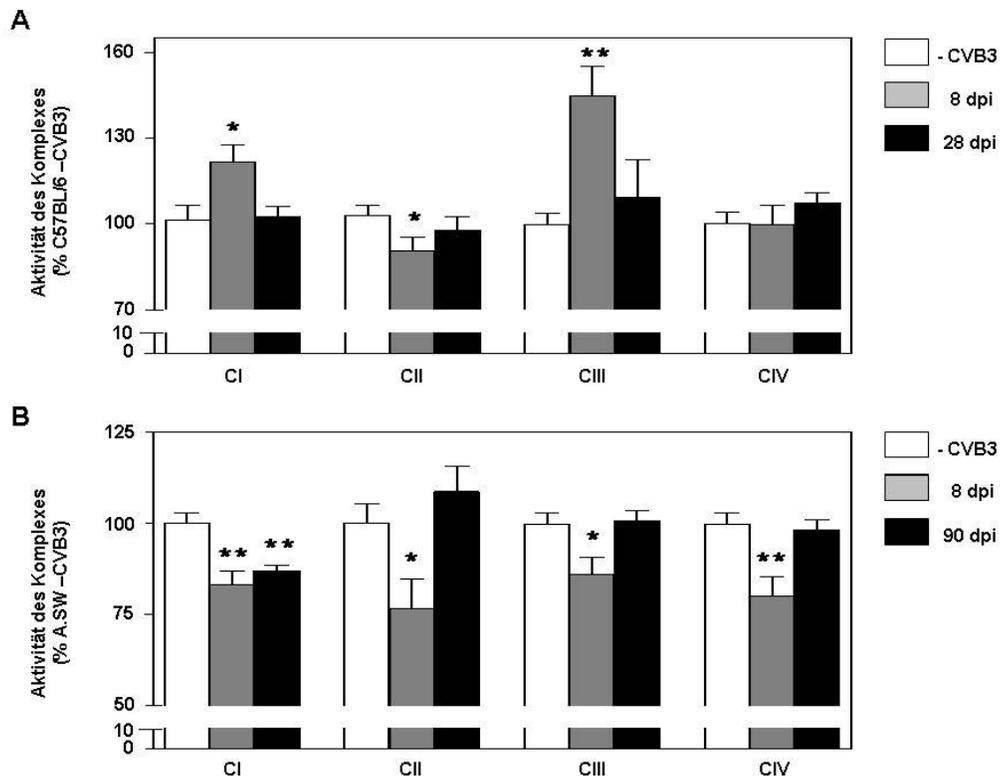


Abbildung 3.3: Aktivität der Atmungskettenkomplexe in CVB3-infizierten Mäusen. Die Aktivität der Komponenten der Atmungskette wurde in Präparationen kardialer Mitochondrien aus nicht infizierten und infizierten (A) C57BL/6- und (B) A.SW-Tieren mittels Aktivitätsassays bestimmt. Die Aktivitäten sind als prozentualer Wert bezogen auf die nicht infizierte Kontrollgruppe (-CVB3) wiedergegeben. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs. -CVB3; $n \geq 6$. CI-Komplex I, CII-Komplex II, CIII-Komplex III, CIV-Komplex IV, dpi: Tage *post infectionem*.

Um zu überprüfen, inwiefern die Änderungen in der Atmungskette auf die Proteinexpression ihrer Komponenten zurückzuführen sind, wurden mitochondriale Präparationen aus CVB3-infizierten Mäusen (8 Tage p.i.) massenspektrometrisch analysiert (2.13.6) und die Expression in C57BL/6- im Verhältnis zu A.SW-Tieren in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Expressionsanalyse der Atmungskettenenzyme am Tag 8 nach der Infektion.

Mittels Massenspektrometrie wurde die Expression der Komponenten der Atmungskette in CVB3-infizierten C57BL/6- und A.SW-Mäusen analysiert. Angegeben ist das Verhältnis der Expression in C57BL/6 zu A.SW. n=4. DH: Dehydrogenase, Ref.nr.: Referenznummer der Datenbank UniProtKB.

Name	Ref.nr.	Ratio	p
Komplex I			
NADH DH [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 1 (NDUFA1)	O35683	1,858	<0.0001
NADH DH [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 2 (NDUFA2)	Q9CQ75	1,142	0.027
NADH DH [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 7 (NDUFA7)	Q9Z1P6	1,357	0.0005
NADH DH [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 4 (NDUFB4)	Q9CQC7	1,153	0.001
NADH DH [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 9 (NDUFB9)	Q9CQJ8	1,295	0.033
NADH DH [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 10 (NDUFB10)	Q9DCS9	1,130	0.002
NADH DH [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 11 (NDUFB11)	O09111	1,228	0.005
NADH DH [ubiquinone] iron-sulfur protein 4 (NDUFS4)	Q9CXZ1	1,324	0.022
NADH DH [ubiquinone] iron-sulfur protein 5 (NDUFS5)	Q99LY9	1,233	0.0002
NADH DH [ubiquinone] flavoprotein 3 (NDUFV3)	Q8BK30	1,221	0.01
NADH DH [ubiquinone] 1 alpha subcomplex assembly factor 2 (NDUFAF1)	Q59J78	3,238	0.0002
Komplex II			
Succinate DH cytochrome b560 subunit (SDHC)	Q9CZB0	-1,547	<0.0001
Komplex III			
Cytochrome b-c1 complex subunit 5 (UQCRFS1)	Q9CR68	-1,135	0.035
Cytochrome b-c1 complex subunit 9 (UQCR10)	Q8R111	-1,385	0.0004
Cytochrome c1, heme protein (CYC1)	Q9D0M3	-1,227	0.016
Komplex IV			
Cytochrome c oxidase subunit 7A-related protein (COX7A2L)	Q61387	-6,357	<0.0001
Cytochrome c oxidase polypeptide 7A1 (COX7A1)	P56392	-1,153	0.028

Die Expression von elf Untereinheiten des NADH-Dehydrogenase-Komplexes (I) war in C57BL/6- im Vergleich zu A.SW-Mäusen mit Myokarditis einheitlich höher. Die Expression von Untereinheiten der Komplexe II, III und IV lag in A.SW-Tieren über denen in C57BL/6-Tieren und steht im Gegensatz zur Enzymaktivität. Alle regulierten Untereinheiten sind kernkodiert und es wurden mittels massenspektrometrischer Analyse keine Expressionsveränderungen der mitochondrial kodierten Untereinheiten der Komplexe I, III und IV identifiziert.

3.1.2.2 Die Expression des ANT im murinen Myokarditis-Modell

Das über die oxidative Phosphorylierung produzierte ATP wird durch den ANT aus der mitochondrialen Matrix in den Intermembranraum transportiert, während gleichzeitig

cytosolisches ADP in die Mitochondrien gelangt, um dort der ATP-Synthase zur Re phosphorylierung zur Verfügung zu stehen. Da Änderungen des ADP/ATP-Austauschs sich auf den Energiehaushalt der Zelle auswirken können, wurden die kardiale mRNA-Expression der ANT-Isoformen und das mitochondriale ANT-Gesamtprotein in nicht infizierten und CVB3-infizierten resistenten und permissiven Mäusen zum frühen und späten Zeitpunkt nach der Infektion quantifiziert. Zur quantitativen Bestimmung der ANT1-Überexpression auf RNA-Ebene wurden *real-time* PCRs (2.12.11) mit spezifischen TaqMan Gene Expression Assays der Firma Invitrogen, Darmstadt, durchgeführt.

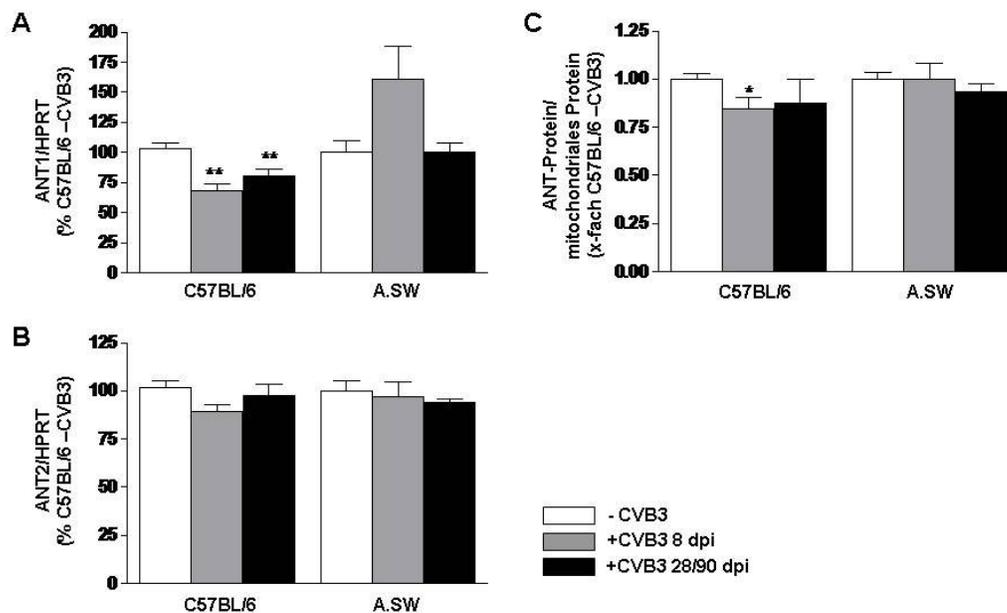


Abbildung 3.4: Expression des ANT in CVB3-induzierter Myokarditis. Die Expression der (A) ANT1- und (B) ANT2-mRNA wurde mittels *real-time* PCR in Präparationen kardialer cDNA von CVB3-infizierten und nicht infizierten C57BL/6- und A.SW-Mäusen quantifiziert. Als interner Expressionsstandard wurde HPRT verwendet. (C) Western Blot Analyse der Proteinexpression des ANT in Mitochondrien aus CVB3-infizierten Herzen und Kontrollen. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs. C57BL/6 -CVB3; $n \geq 4$. dpi: Tage *post infectionem*.

In resistenten C57BL/6-Mäusen führte die CVB3-Infektion zu einer deutlichen Herunterregulation der mRNA der ANT1-Isoform um 30 %, die sowohl am Tag 8 als auch am Tag 28 nach der Infektion bestand (Abbildung 3.4A). Dahingegen war für die Expression der ANT2-Isoform lediglich eine tendenzielle Abnahme am Tag 8 nach der Infektion zu beobachten (-16 %, $p = 0,064$) (Abbildung 3.4B). Die Verringerung der ANT1-Transkripte in CVB3-infizierten Herzen geht einher mit einer signifikanten Abnahme des ANT-Gesamtproteins in den Mitochondrien (Abbildung 3.4C).

Im Unterschied dazu sind in permissiven A.SW-Mäusen mit Myokarditis weder in der Menge des ANT-Proteins noch der Transkripte der beiden Isoformen Änderungen zu verzeichnen. Erwähnenswert ist dennoch die nicht signifikante Zunahme der ANT1-mRNA am Tag 8 nach der Infektion ($100,0 \pm 10,3$ % vs. $161,1 \pm 27,5$ %, $p=0,083$, $n=8$), da in früheren Infektionsexperimenten unserer Arbeitsgruppe mit ebenfalls permissiven SWR-Mäusen eine signifikante Erhöhung der ANT1-Expression sowohl des Transkripts (289 %, $p<0,05$) als auch des mitochondrialen Proteins (164 %, $p<0,01$) nachgewiesen wurde (unveröffentlichte Daten). Somit liegt in CVB3-infizierten, permissiven Stämmen zumindest eine im Vergleich zu infizierten, resistenten Mäusen höhere ANT1-Expression vor.

3.1.2.3 Das Creatinkinase-System in der CVB3-Myokarditis

Die mitochondriale CK, die im Intermembranraum direkt mit dem ANT interagiert ²²¹, bildet am Mitochondrium aus ATP und Creatin Creatinphosphat, das als zelluläres Energiereservoir dient. Creatinphosphat steht dann an den Orten erhöhten Energiebedarfs in der Zelle, wie die Ca^{2+} -ATPasen des Sarkoplasmatischen Retikulums und die Na^{+} - K^{+} -ATPasen der Zellmembran, der cytosolischen CK zur Transphosphorylierung von ADP zu ATP zur Verfügung. Dadurch kann die lokale ATP-Konzentration in Mikrokompartimenten mit hohem Energieverbrauch aufrechterhalten werden und ATP in cytosolischen, energieverbrauchenden Reaktionen genutzt werden ^{222, 223}.

Die CK besitzt insgesamt vier Isoformen: die drei cytosolischen *brain-type* (BB-CK), *muscle-type* (MM-CK) und die heterodimere MB-CK ²²⁴. Die vierte Isoform ist die mitochondriale CK ²²⁵.

Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte über eine spektrophotometrische Messung (2.13.7.2) unter Verwendung der mitochondrialen bzw. cytosolischen Proteinfraction. Die Expression der CK-MM- und CK-BB-Isoformen der cytosolischen CK wurde in Western Blot Analysen (2.13.3-2.13.5) mit spezifischen Antikörpern bestimmt.

Die Infektion mit CVB3 führte vorübergehend zu einer massiven Abnahme der Aktivität der mitochondrialen CK in den Herzen sowohl von C57BL/6- als auch A.SW-Mäusen (Abbildung 3.5A). Die Aktivität sinkt am Tag 8 nach der Infektion in C57BL/6-Tieren und in A.SW-Tieren um jeweils 41 %. Gleichfalls war in beiden Stämmen eine Normalisierung der Aktivität bis zum Tag 28 bzw. 90 nach der Infektion zu beobachten. In A.SW-Tieren war zudem die Aktivität der cytosolischen CK (Abbildung 3.5B) am Tag 8 nach der Infektion um 19 % signifikant reduziert, hingegen konnte in CVB3-infizierten C57BL/6-Tieren weder am Tag 8 noch am Tag 28 nach der Infektion ein signifikanter Unterschied in der Aktivität der cytosolischen CK im Vergleich zu nicht infizierten Kontrollen gemessen werden.

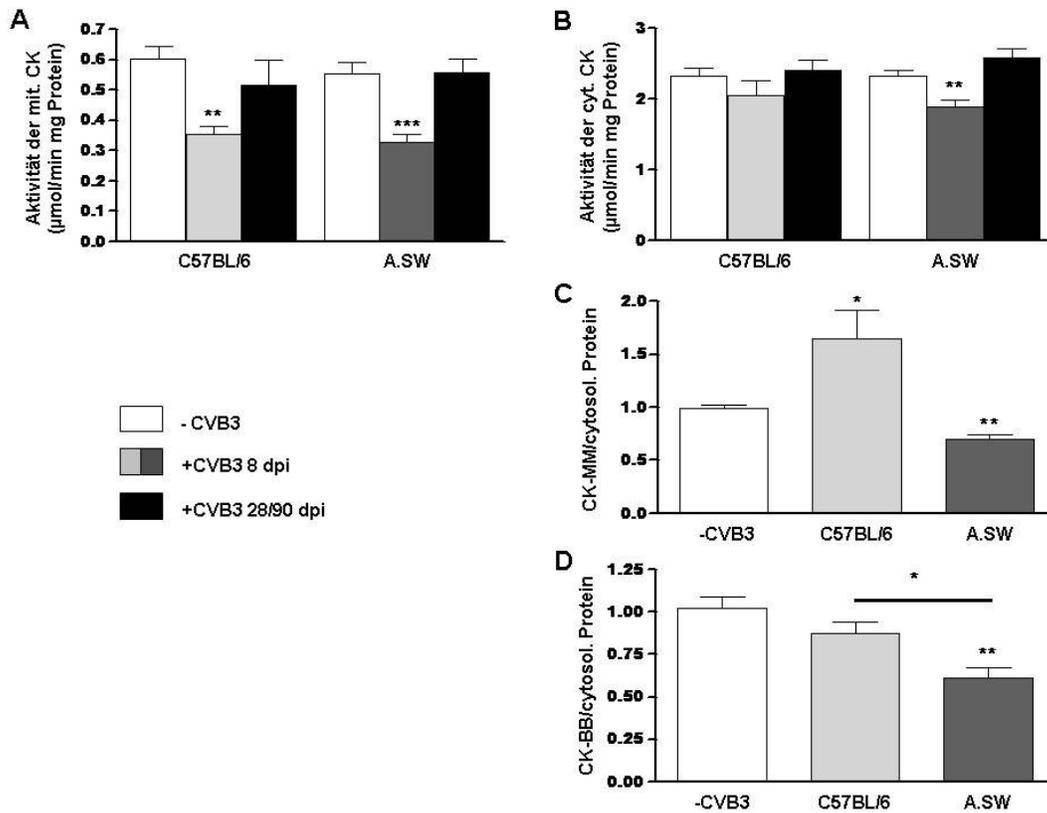


Abbildung 3.5: Expression und Aktivität der mitochondrialen und cytosolischen CK in CVB3-induzierter Myokarditis. Die Aktivität der CK wurde in (A) mitochondrialer und (B) cytosolischer Proteinfraction spektrophotometrisch bestimmt. Mittels Western Blot Analyse wurde die Expression der Isoformen (C) CK-MM und (D) CK-BB der cytosolischen CK ermittelt. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. -CVB3; $n \geq 5$. dpi: Tage *post infectionem*.

Die Expressionsanalyse der Isoformen der cytosolischen CK ergab, dass in CVB3-infizierten A.S.W-Tieren sowohl die CK-MM (Abbildung 3.5C) als auch die CK-BB (Abbildung 3.5D) am Tag 8 nach der Infektion um 30-40 % herunterreguliert wurden. In C57BL/6-Mäusen hingegen war zum gleichen Zeitpunkt die Expression der CK-MM um 65 % erhöht, während die der CK-BB nicht signifikant verändert war. Ungeachtet der stark unterschiedlichen Regulation des CK-Systems im resistenten und permissiven Myokarditis-Modell wurden die Veränderungen in beiden Stämmen nach Abklingen der akuten Infektion normalisiert.

3.1.3 Die mitochondriale Apoptose in der CVB3-Myokarditis

Ein Ungleichgewicht in der Atmungskette kann sowohl direkt als auch indirekt über die Erhöhung des zellulären oxidativen Stresses zur Induktion von Apoptose führen. Apoptose kann aber auch durch das Virus selbst und/oder durch den infizierten Wirt als Teil der Immunantwort ausgelöst werden. Wichtige mitochondriale Apoptose-Marker sind

die Expressionslevel von pro- und antiapoptotischen Proteinen wie Bax und Bcl-2 und die Hochregulierung und Aktivierung der Effektor-Caspase Caspase-3. Um zu erschließen inwiefern die Infektion mit CVB3 zu einer Induktion der Apoptose in Kardiomyozyten führt, wurde im murinen Myokarditis-Modell die Expression dieser Marker auf mRNA- oder Proteinebene analysiert (Abbildung 3.6).

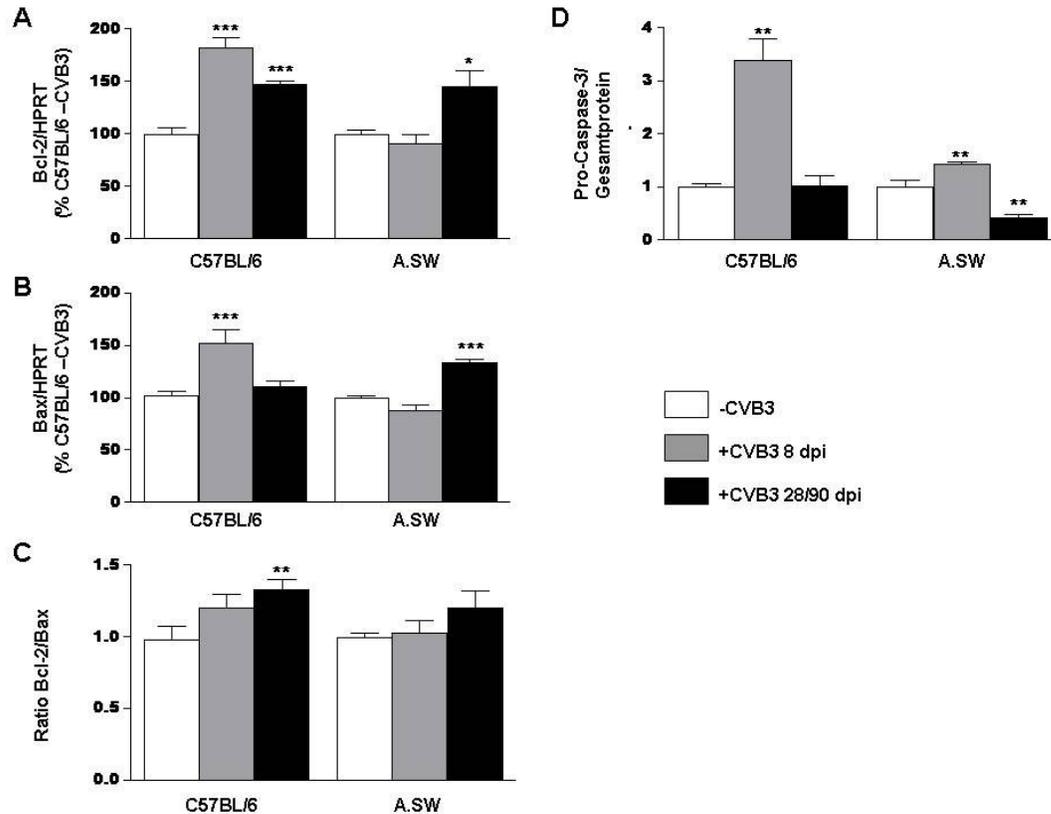


Abbildung 3.6: Apoptose-Marker im resistenten und permissiven Myokarditis-Modell. Die mRNA-Expression von (A) Bcl-2 und (B) Bax wurde mittels *real-time* PCR unter Verwendung kommerzieller Genexpressions-Assays quantifiziert und (C) das Verhältnis von Bcl-2 zu Bax berechnet. Als interne Expressionskontrolle diente HPRT. (D) Die Proteinexpression der Pro-Caspase-3 wurde sowohl mittels *real-time* PCR (nicht abgebildet) und im Western Blot analysiert. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 vs. -CVB3; n≥5. dpi: Tage *post infectionem*.

Die Transkripte von Bcl-2 und Bax wurden mittels *real-time* PCR in Relation zum internen Expressionsstandard HPRT quantifiziert. Für jede Probe wurden beide Marker im selben Lauf gemessen, um eine möglichst fehlerfreie Berechnung des Bcl-2/Bax-Verhältnisses zuzulassen. Die Proteinexpression von Bcl-2 und Bax wurde stichprobenartig im Western Blot überprüft und zeigte ein übereinstimmendes Bild mit der mRNA-Expression. Die Expression und Aktivierung der (Pro-)Caspase-3 wurde sowohl auf mRNA-Ebene mittels *real-time* PCR als auch auf Proteinebene mittels Western Blot bestimmt und auch hier war die mRNA- mit der Proteinexpression vergleichbar. Des Weiteren konnte die Expression

der Pro-Caspase-3 (34 kDa) mit der des aktiven Enzyms (17 kDa) positiv korreliert werden und entspricht Berichten, die eine gleichzeitige Erhöhung der Pro-Caspase-3 sowohl auf transkriptioneller als auch translationaler Ebene sowie der aktiven Form durch enzymatische Spaltung beschreiben ²²⁶.

In resistenten C57BL/6-Tieren war am Tag 8 nach der Infektion eine Induktion des apoptotischen Prozesses klar zu beobachten. Die Expression der proapoptotischen Marker Bax (Abbildung 3.6B) und Pro-Caspase-3 (Abbildung 3.6D) war zu diesem Zeitpunkt massiv erhöht und betrug das 1,5- bzw. 3-fache der nicht infizierten Kontrollgruppe. Zwar ist auch eine Zunahme in der Expression des antiapoptotischen Bcl-2 zu verzeichnen (Abbildung 3.6A), jedoch reichte diese nicht aus, um das zelluläre Bcl-2/Bax-Verhältnis (Abbildung 3.6C) zugunsten von Bcl-2 zu verändern. Da die Expression von Bcl-2 bis mindestens Tag 28 nach der Infektion deutlich erhöht blieb, wohingegen sich die Expression von Bax sowie der Pro-Caspase-3 normalisierte, konnte zu diesem Zeitpunkt eine antiapoptotisch wirkende Zunahme des Bcl-2/Bax-Quotienten von $1,00 \pm 0,09$ auf $1,32 \pm 0,07$ ($p < 0,01$) beobachtet werden.

Im Gegensatz dazu war in permissiven A.SW-Tieren am Tag 8 nach der Infektion keine Veränderung in der Bax- oder Bcl-2-Expression und ein im Vergleich zu C57BL/6-Tieren deutlich geringerer Expressionsanstieg der Pro-Caspase-3 um 42 % zu beobachten. Allerdings setzte in diesem Tiermodell der apoptotische Prozess offensichtlich zu einem späteren Zeitpunkt ein, so dass am Tag 90 nach der Infektion sowohl Bax als auch Bcl-2 in infizierten Tieren signifikant höher als in nicht infizierten Kontrollen exprimiert wurden. Gleichfalls unterlag die Expression der Pro-Caspase-3 am Tag 90 nach der Infektion Veränderungen, die durch eine deutliche Abnahme charakterisiert war.

3.1.4 Das antioxidative Stress-System in der CVB3-Myokarditis

Inwiefern die Apoptoseinduktion möglicherweise auf eine Erhöhung des oxidativen Stresses in der Zelle zurückzuführen ist, wurde durch Untersuchung von zwei entscheidenden Markerproteinen des antioxidativen Stress-Systems ermittelt. Zum einen ist dies die mitochondriale Superoxid-Dismutase (MnSOD2), ein Enzym, das hochreaktive und zerstörerische Superoxidanionen abfängt und Wasserstoffperoxid bildet, und zum anderen die Catalase, die wiederum Wasserstoffperoxid unter Bildung von molekularem Wasser eliminiert. Die Expression dieser beiden Enzyme im resistenten und permissiven Myokarditis-Modell wurde mittels Western Blot (2.13.3-5) quantifiziert. Die Schädigung der Zelle durch oxidativen Stress wurde zudem durch Quantifizierung der Lipidperoxidation (2.13.8) analysiert (Abbildung 3.7).

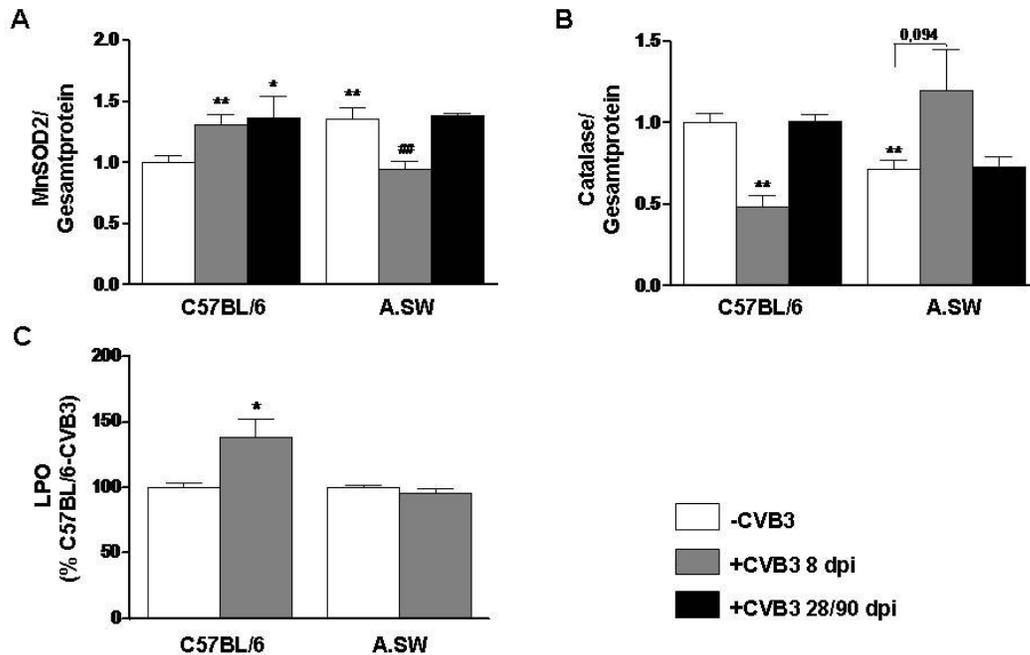


Abbildung 3.7: Marker des antioxidativen Stress-Systems in der CVB3-induzierten Myokarditis. Die Expression von (A) MnSOD2 und (B) Catalase wurde mittels Western Blot analysiert. Die Quantifizierung erfolgte in Relation zum aufgetragenen Gesamtprotein durch Anfärbung mit Coomassie Blue. (C) Die Lipidperoxidation (LPO) in den Mitochondrien wurde am Tag 8 nach der Infektion mittels eines kommerziellen Kits nach Anleitung des Herstellers bestimmt. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs. C57BL/6–CVB3, ## $p < 0,01$ vs. A.SW–CVB3. $n \geq 5$. dpi: Tage *post infectionem*.

Das Ergebnis dieser Analyse führte zu einem heterogenen Bild des antioxidativen Systems. Einerseits konnte in CVB3-infizierten C57BL/6-Tieren eine Erhöhung der Expression der MnSOD2 (Abbildung 3.7A) am Tag 8 nach der Infektion um 31 % und auch noch am Tag 28 nach der Infektion um 36 % gemessen werden. Andererseits wurde zum gleichen Zeitpunkt eine Abnahme der Expression der Catalase um 51 % (Abbildung 3.7B) verzeichnet. In A.SW-Mäusen hingegen sahen wir ein umgekehrtes Bild. Hier wurde am Tag 8 nach der Infektion die MnSOD2 um 30 % geringer als in nicht infizierten Kontrollen exprimiert, während die Expression der Catalase um 68 % zunahm. Dieses Ungleichgewicht in der Regulation des antioxidativen Systems resultierte in C57BL/6-Herzen in einer erhöhten oxidativen Schädigung der zellulären Lipide, wohingegen in A.SW-Herzen zum gleichen Zeitpunkt der Infektion keine Zunahme der Lipidperoxidation im Vergleich zur nicht infizierten Kontrollgruppe stattfand.

Zusätzliche Unterschiede zwischen den beiden Stämmen gab es bereits in den Kontrollgruppen. In nicht infizierten A.SW-Mäusen wurde signifikant mehr MnSOD2 ($1,00 \pm 0,05$ in C57BL/6 vs. $1,36 \pm 0,09$ in A.SW, $p < 0,001$) und weniger Catalase ($1,00 \pm 0,06$ in C57BL/6

vs. $0,72 \pm 0,05$ in A.SW, $p < 0,01$) als in nicht infizierten C57BL/6-Mäusen exprimiert, ein Ergebnis, das nochmals die gegenläufige Regulation dieser beiden Marker bestätigte.

3.1.5 Einfluss auf die kardiale Viruslast

Um zu überprüfen, ob ein Zusammenhang besteht zwischen der kardialen Viruslast in CVB3-infizierten C57BL/6- und A.SW-Herzen und der stammabhängigen Regulation der mitochondrialen Atmungskette, des antioxidativen Stress-Systems und der zellulären Apoptose, wurden Korrelationsanalysen durchgeführt, deren Resultate in Abbildung 3.8 dargestellt sind. Hierbei konnte eine sehr deutliche Korrelation zwischen einer geringen kardialen Viruslast und einer hohen Aktivität der ROS-produzierenden Komplexe I und III, einer niedrigen Expression des antioxidativen Enzyms Catalase sowie einer erhöhten Expression der Pro-Caspase-3 beobachtet werden.

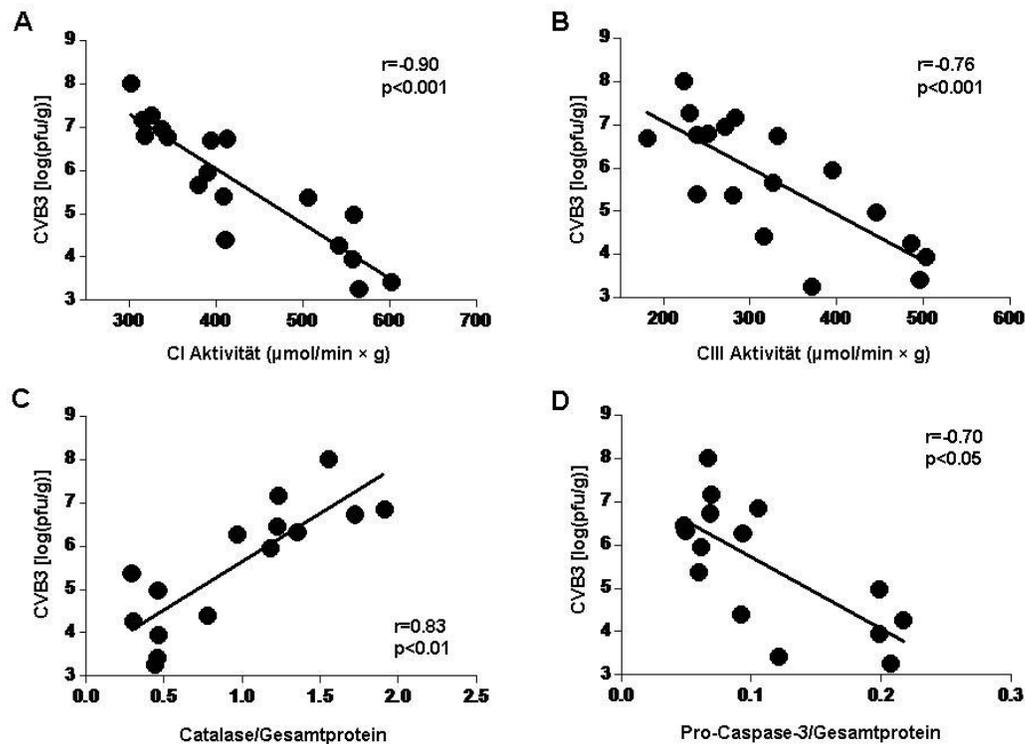


Abbildung 3.8: Zusammenhang zwischen der Viruslast und der stammabhängigen Regulation ausgewählter zellulärer Prozesse im CVB3-infizierten Herzen. Unter Verwendung der Auswertungssoftware GraphPad Prism[®] 4 wurde mittels Korrelationsanalyse eine Assoziation zwischen dem kardialen Virustiter (Plaque-Assay) und verschiedenen Komponenten des mitochondrialen Energiestoffwechsels [absolute Aktivität des (A) Komplex I und (B) Komplex III], des antioxidativen Systems [(C) Proteinexpression der Catalase] und der Apoptose [(D) Proteinexpression der Pro-Caspase-3] überprüft. Angegeben ist der Korrelationskoeffizient r (nach Pearson) und dessen Signifikanz. $n = 15-18$.

3.1.6 Der Einfluss der Cytokine auf die mitochondriale Funktion

Die durch das Eindringen des Virus ausgelöste Immunantwort kann durch Analyse der Cytokinexpression verfolgt und charakterisiert werden. Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Cytokine wurden aufgrund ihres in der Literatur beschriebenen Einflusses auf den mitochondrialen Energiestoffwechsel und die Apoptose ausgewählt. Wichtige proinflammatorische Cytokine sind IL-1 β und TNF α . TGF β löst sowohl antiinflammatorische als auch proapoptotische Prozesse aus, während IFN β vor allem aufgrund seiner antiviralen Wirkung von Bedeutung ist.

Die Transkriptmenge dieser Cytokine in Präparationen kardialer cDNA wurde mittels quantitativer *real-time* PCR (2.12.11) unter Verwendung spezifischer Genexpressions-Assays bestimmt und ist in Abbildung 3.9 als prozentuales Verhältnis zur nicht infizierten C57BL/6-Kontrollgruppe wiedergegeben.

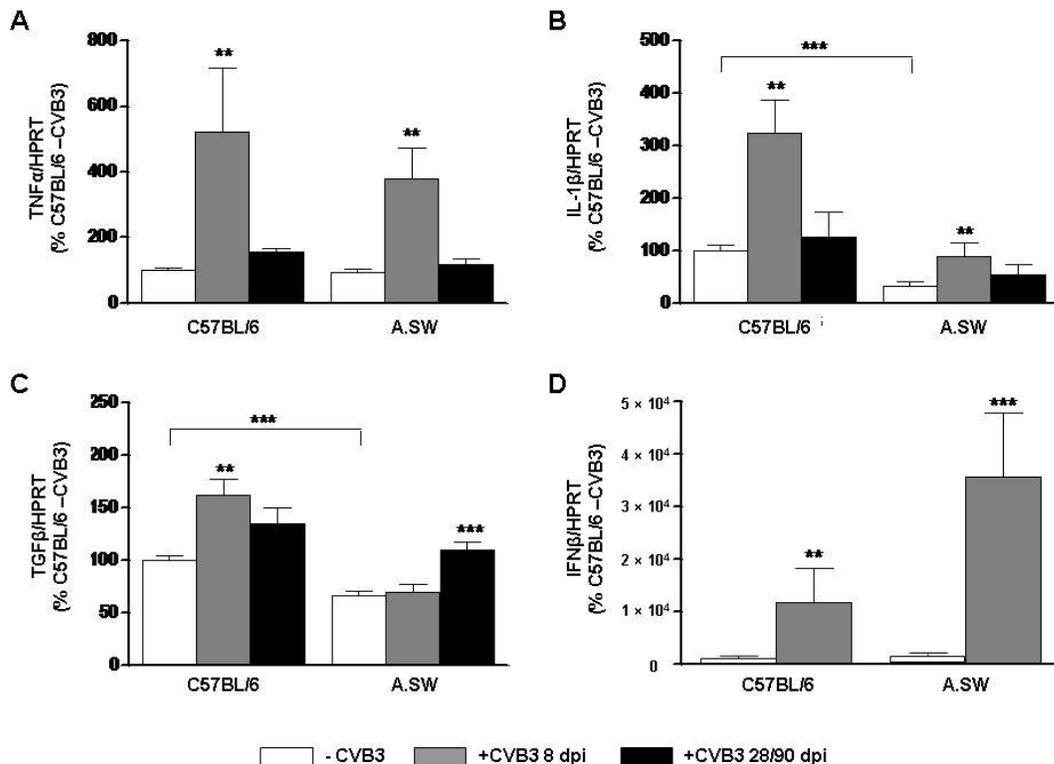


Abbildung 3.9: Cytokinmuster in CVB3-infizierten Herzen resistenter und permissiver Mausstämmen. In kardialer cDNA aus nicht infizierten und CVB3-infizierten C57BL/6- und A.SW-Mäusen wurde mittels *real-time* PCR unter Verwendung kommerzieller Genexpressions-Assays die Expression von (A) TNF α , (B) IL-1 β , (C) TGF β und (D) IFN β quantifiziert. Als interner Expressionsstandard wurde HPRT verwendet. Die Werte sind als prozentuales Verhältnis zur nicht infizierten C57BL/6-Kontrollgruppe angegeben. **p<0,01, ***p<0,001 vs. -CVB3; n \geq 4.

Sowohl im C57BL/6- als auch im A.SW-Hintergrund löste die Infektion mit CVB3 eine massive Cytokinantwort aus, die durch eine verstärkte Expression proinflammatorischer und antiviraler Cytokine in der akuten Phase der Myokarditis charakterisiert war. In CVB3-infizierten C57BL/6-Mäusen war am Tag 8 nach der Infektion ein signifikanter Anstieg von TNF α (524 ± 195 %, $p=0,004$), IL-1 β ($325 \pm 61,7$ %, $p=0,004$), TGF β ($163 \pm 14,6$ %, $p=0,008$) und IFN β (11820 ± 6528 %, $p=0,009$) im Herzen zu verzeichnen (Abbildung 3.9). Auch in CVB3-infizierten A.SW-Mäusen war im Vergleich zu nicht infizierten A.SW-Kontrollen die Expression von TNF α ($398 \pm 96,7$ %, $p=0,0002$), IL-1 β ($274 \pm 75,5$ %, $p=0,006$) und IFN β ($35\,742 \pm 12\,127$ %, $p=0,0001$) deutlich erhöht. Im Unterschied zum resistenten Mausstamm wurde in permissiven Tieren jedoch keine Änderung in der TGF β -Expression am Tag 8 nach der Infektion gemessen. Es ist allerdings zu beachten, dass zwischen den nicht infizierten Kontrollgruppen der C57BL/6- und A.SW-Tiere bemerkenswerte Unterschiede in der Cytokinexpression existierten. Um in den C57BL/6-Kontrollen eine bereits bestehende, unspezifische Infektion mit einhergehender Aktivierung des Immunsystems auszuschließen, wurden mehrere, unabhängige Sets von C57BL/6- und A.SW-Tieren in Bezug auf ihre Cytokinexpression untersucht. Es bestätigte sich dabei, der hier dargestellte Unterschied zwischen den beiden Stämmen. So liegt die basale Expression von IL-1 β in A.SW-Mäusen bei einem Drittel der Expression in C57BL/6-Mäusen und für TGF β bei zwei Dritteln. Aus diesen Daten wurde errechnet, dass CVB3-infizierte A.SW-Mäuse am Tag 8 nach der Infektion signifikant weniger IL-1 β ($-72,2$ %, $p=0,008$) und TGF β ($-57,1$ %, $p=0,004$) exprimierten als C57BL/6-Mäuse.

Nach Abklingen der akuten Phase normalisierte sich in beiden Stämmen die Ausschüttung proinflammatorischer Cytokine wie TNF α und IL-1 β . Lediglich TGF β war in A.SW-Mäusen am Tag 90 nach der Infektion um 65 % hochreguliert.

Über Korrelationsanalysen wurde der Zusammenhang zwischen dem kardialen Expressionsmuster der Cytokine und der Regulation des mitochondrialen Energiestoffwechsels in der CVB3-induzierten Myokarditis untersucht.

Wie in Tabelle 2 zusammengefasst gezeigt, wurden immunmodulatorische Faktoren mit einer Vielzahl regulatorischer Prozesse assoziiert. Einige der untersuchten Cytokine konnten spezifisch und mit geringer Redundanz mit der Expression einzelner Atmungskettenkomplexe korreliert werden. So besteht ein statistischer Zusammenhang zwischen der kardialen Expression von IL-1 β und der Aktivitätszunahme von Komplex I. Auch für Komplex II und TNF α , Komplex III und TGF β sowie Komplex IV und TNF α wurden Zusammenhänge zwischen der Aktivität einzelner Atmungskettenkomplexe und der Cytokinexpression gefunden. IFN β korreliert mit der Herunterregulation der Aktivität nahezu der gesamten Atmungskette, ausgenommen Komplex III. Neben den Atmungs-

kettenkomplexen sind auch andere, im direkten Zusammenhang mit dem mitochondrialen Energiestoffwechsel stehende Komponenten mit der Expression von stoffwechselrelevanten Cytokinen assoziiert, wie die ANT1-Expression über IL-1 β und die Aktivität der mitochondrialen CK über TNF α .

Tabelle 2: Korrelation der kardialen Cytokinexpression mit Markern des mitochondrialen Energiestoffwechsels. Unter Verwendung der Auswertungssoftware GraphPad Prism[®] 4 wurde eine Assoziation zwischen den Daten der Cytokinexpression und den Expressionsdaten verschiedener Marker des mitochondrialen Energiestoffwechsels überprüft. Angegeben ist der Korrelationskoeffizient r (nach Pearson) und dessen Signifikanz: *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, n=19-48.

	TNF α	IL-1 β	TGF β	IFN β
Komplex I Aktivität	-	0,48***	-	-0,62**
Komplex II Aktivität	-0,38*	-	-	-0,58*
Komplex III Aktivität	-	-	0,39**	-
Komplex IV Aktivität	-0,42**	-	-	-0,59**
ANT1-mRNA	-	-0,33*	-	-
mitCK Aktivität	-0,63***	-	-	-

In vivo konnten wir Assoziationen zwischen stoffwechselrelevanten Cytokinen und den Komponenten des mitochondrialen Energiestoffwechsel aufzeigen, die *in vitro* anhand der Analyse der Regulation der ANT1-Expression durch verschiedene Cytokine bestätigt werden sollten. Zu diesem Zweck wurden primäre neonatale Rattenkardiomyozyten (PNCM) isoliert (2.14.2), mit stoffwechselrelevanten Cytokinen behandelt (2.14.2.2) und die Expression von ANT1 mittels *real-time* PCR quantifiziert (2.12.11). In zwei unabhängigen Versuchen konnte eine Herunterregulation der ANT1-Expression durch IL-1 β um 41 % (p<0,001, n=8) gezeigt werden (Abbildung 3.10). Die Cytokine TNF α , TGF β und IFN β hatten keinen Einfluss auf die ANT1-Expression.

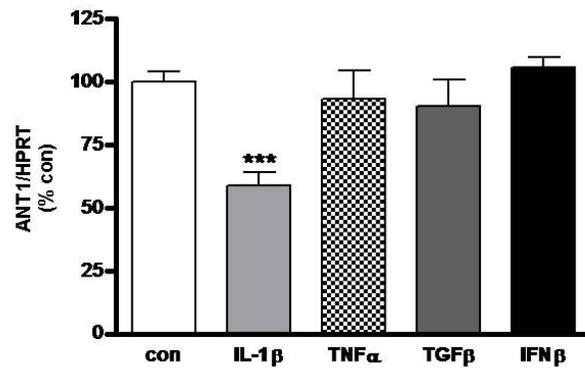


Abbildung 3.10: Stimulation der ANT1-Expression durch Cytokine. Primäre neonatale Rattenkardiomyozyten (PNCM) wurden isoliert und in serumfreiem Medium ausplattiert. Nach dem Absetzen der Zellen wurde eines der Cytokine IL-1 β (30 ng/ml), TNF α (40 ng/ml), TGF β (10 ng/ml) oder IFN β (30 ng/ml) zugegeben und für 24 h unter Standardbedingungen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit TRIzol[®] lysiert und die zelluläre RNA isoliert. Die ANT1- und HPRT-Expression wurde mittels *real-time* PCR quantifiziert. Zwei unabhängige Experimente wurden durchgeführt und zusammengefasst. *** $p < 0,001$ vs. con (unbehandelt), $n = 4-8$.

Insgesamt konnten wir zeigen, dass sich resistente C57BL/6-Mäuse und permissive A.SW-Mäuse unter der CVB3-Infektion in der Regulation sowohl des mitochondrialen Energiestoffwechsels als auch der Induktion der Apoptose und des oxidativen Stresses unterschieden. Diese Unterschiede gingen einher mit einer niedrigeren kardialen Viruslast in resistenten Tieren und standen in Zusammenhang mit der immunologischen Reaktion des Wirts auf die Virusinfektion.

3.2 Einfluss der ANT1-Expression auf kardiale Erkrankungen

3.2.1 Charakterisierung des transgenen Mausstamms mit herzspezifischer ANT1-Überexpression

Von der Firma RCC Ltd. (Füllinsdorf, Schweiz) wurde uns ein herzspezifisch ANT1-transgener Mausstamm im C57BL/6-Hintergrund zur Verfügung gestellt, der im Rahmen dieser Arbeit basal charakterisiert wurde und anschließend im Mausmodell der inflammatorischen und diabetischen Kardiomyopathie verwendet wurde.

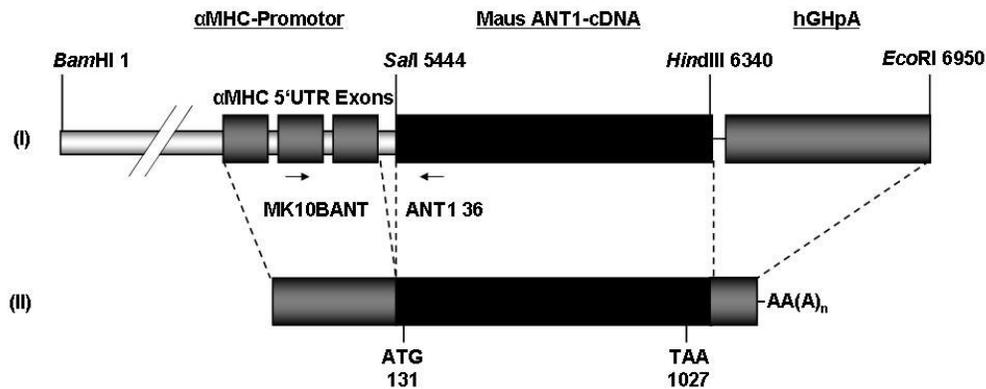


Abbildung 3.11: Schematische Darstellung des Transgenkonstrukts: (I) DNA-Konstrukt, (II) mRNA-Transkript. Zur besseren Übersicht ist die Sequenz des α MHC-Promotors nicht maßstabsgerecht dargestellt. Die Lage der wesentlichen Schnittstellen der verwendeten Restriktionsendonukleasen (*Bam*HI, *Sal*I, *Hind*III, *Eco*RI) und der Genotypisierungsprimer (MK10BANT, ANT1 36) sind eingezeichnet. Alle Angaben in Basenpaaren (bp). α MHC: *alpha myosin heavy chain*, hGHpA: *human growth hormone* Polyadenylierungssequenz, 5'-UTR: 5' nicht translatierte Region, ATG: Startcodon, TAA: Stopcodon.

Das DNA-Konstrukt zur Generierung der ANT1-transgenen Maus ist in Abbildung 3.11 schematisch dargestellt. Um eine spezifische Expression im Herzen zu erzielen, wurde der murine α -Myosin Schwereketten-Promotor (α MHC, GenBank: U71441, 5443 bp) verwendet, der die Expression der vollständigen cDNA des murinen ANT1 (GenBank: mRNA NM_007450.4, 896 bp; Protein NP_031476.4, 298 aa) steuerte. Um eine Unterscheidung vom endogenen ANT1-Transkript zu ermöglichen, ersetzten ca. 600 bp des humanen Wachstumshormons die ursprüngliche Polyadenylierungssequenz (hGHpA). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Integrität der Nukleinsäuresequenz nochmals mittels Sequenzierung überprüft und bestätigt. Transgene Tiere wurden nach Standardprotokoll im C57BL/6-Hintergrund erzeugt. Zwei erfolgreiche Ansätze wurden ausgewählt, um homozygote, transgene Linien zu züchten (Linie 17 und 20).

3.2.1.1 Analyse der Transgenintegration

Die uns verfügbaren ANT1-transgenen Linien 17 und 20 wurden in Bezug auf die Integrationshäufigkeit des DNA-Konstrukts untersucht. Die Bestimmung der Kopienzahl des integrierten Transgens mittels Southern Blot wurde mit genomischer DNA (2.12.1.2) aus Herzgewebe von Wildtyp- und transgenen Tieren durchgeführt (2.12.5).

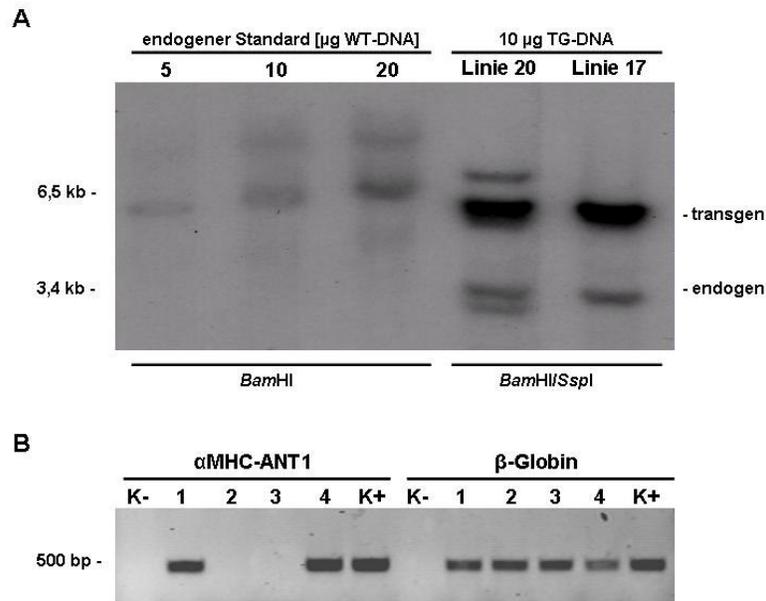


Abbildung 3.12: Identifizierung ANT1-transgener Tiere. (A) Bestimmung der Kopienzahl des Transgens in den Linien 17 und 20. Zur Erstellung eines endogenen Standards wurden 5, 10 und 20 μg genomischer DNA aus Wildtyp-Tieren (WT-DNA) mit *Bam*HI verdaut und zusammen mit 10 μg *Bam*HI/*Ssp*I-verdauter Transgen-DNA (TG-DNA) im Southern Blot analysiert. Die spezifische Detektion der ANT1-Sequenzen erfolgte mittels einer radioaktiv-markierten Sonde, die gegen das Exon 2 des ANT1-Gens gerichtet war. (B) Repräsentative Darstellung der gelelektrophoretischen Analyse der Genotypisierungs-PCR. Aus Schwanzspitzenbiopsien isolierte genomische DNA wurde unter Verwendung der Primer MK10BANT und ANT1 36 in einer PCR amplifiziert. Das Transgen erzeugte eine spezifische Bande von 491 bp, die im Wildtyp nicht auftrat. Die Qualität der isolierten DNA wurde durch Verwendung der Primer für β -Globin (5' β -Globin und 3' β -Globin) kontrolliert. K-: Kontaminationskontrolle ohne DNA, K+: Positivkontrolle mit Transgenkonstrukt.

Der Verdau der Wildtyp-DNA mit *Bam*HI erzeugte ein ANT1-Fragment (ANT1) von 6,3 kb, während der Doppelverdau mit *Bam*HI/*Ssp*I der aus transgenen Tieren isolierten DNA zwei ANT1-Fragmente erzeugte (Abbildung 3.12A): zum einen vom transgenen Insert (6,5 kb) und zum anderen vom endogenen ANT1 (3,4 kb). Der Standard von 5, 10 und 20 μg *Bam*HI-verdauter Wildtyp-DNA wurde mit einer Anzahl von 1, 2 bzw. 4 Kopien des endogenen ANT1-Gens gleichgesetzt. Die Auswertung der Intensität der spezifischen

ANT1-Bande mit Hilfe der Quantifizierungssoftware ScionImage ergab, dass in den Linien 17 und 20 ca. 10 bzw. 12 Kopien des Transgenkonstrukts integriert wurden. Das Vorhandensein zusätzlicher Fragmente bei Linie 20, nicht aber bei Linie 17, basierte auf Unterschieden im Integrationsort des Transgens zwischen den beiden Linien. Daraus möglicherweise entstehende Positionseffekte wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht betrachtet.

Zur routinemäßigen Identifizierung transgener Tiere in der Zucht wurden Genotypisierungs-PCRs an Schwanzspitzenbiopsien durchgeführt. Hieraus isolierte DNA (2.12.1.1) wurde mittels PCR unter Verwendung der Primer MK10BANT und ANT1 36 amplifiziert (2.12.8) und anschließend gelelektrophoretisch analysiert (2.12.4.1). In Abbildung 3.12B ist beispielhaft das Ergebnis einer Genotypisierung gegeben.

Mit DNA aus ANT1-transgenen Tieren wurde ein spezifisches PCR-Produkt von 491 bp erhalten, während bei Verwendung von Wildtyp-DNA kein Amplifikat detektiert werden konnte. In Abbildung 3.12B beobachtet man bei den Tieren 1 und 4 eine entsprechende Bande, die mit der Positivkontrolle (K+) übereinstimmt, während für die Tiere 2 und 3 kein PCR-Produkt nachgewiesen werden kann. Um die PCR-Qualität der isolierten DNA zu kontrollieren, wurde unter Verwendung der Primer 5'β-Globin und 3'β-Globin eine PCR zur Amplifizierung des ubiquitär exprimierten β-Globin-Transkripts durchgeführt. Bei hinreichend guter DNA-Qualität wurde, wie im oben angegebenen Beispiel, für alle Tiere eine Bande von 469 bp detektiert.

3.2.1.2 Analyse der Transgenexpression

3.2.1.2.1 Nachweis der Transgenexpression

Um zu untersuchen, ob die integrierte Transgen-DNA zu einer Erhöhung der ANT1-mRNA beiträgt, wurde Gesamt-RNA aus Herzgewebe von Wildtyp- und transgenen Tieren isoliert (2.12.2) und die Expression spezifischer Transkripte mittels Northern Blot (2.12.6) und RT-PCR (2.12.10) analysiert. Im Northern Blot wurde die spezifische Detektion der auf das eingebrachte Konstrukt zurückgehenden ANT1-mRNA unter Verwendung einer gegen die 5'-UTR des αMHC-Promotors gerichteten Sonde (123 bp) erreicht, welche durch eine PCR mit dem Primerpaar MHCp_ex2.5 und MHCp_ex2.3 erzeugt wurde.

Die Sonde gegen das αMHC-ANT1-Transkript hybridisierte, wie erwartet, nicht mit RNA aus Wildtyp-Herzgewebe (WT, Abbildung 3.13A), wohingegen in ANT1-transgenen Tieren (TG) ein Transkript von 1,6 kb (II) detektiert wurde, dessen Größe mit der vorangegangenen Berechnung gut übereinstimmte. Zusätzlich wurde ein etwa 2,7 kb großes Transkript (I) detektiert, das als eine der Spleißvarianten der 5'-UTR des αMHC-Promotors, wie sie auch in der Literatur beschrieben sind²²⁷, interpretiert wurde.

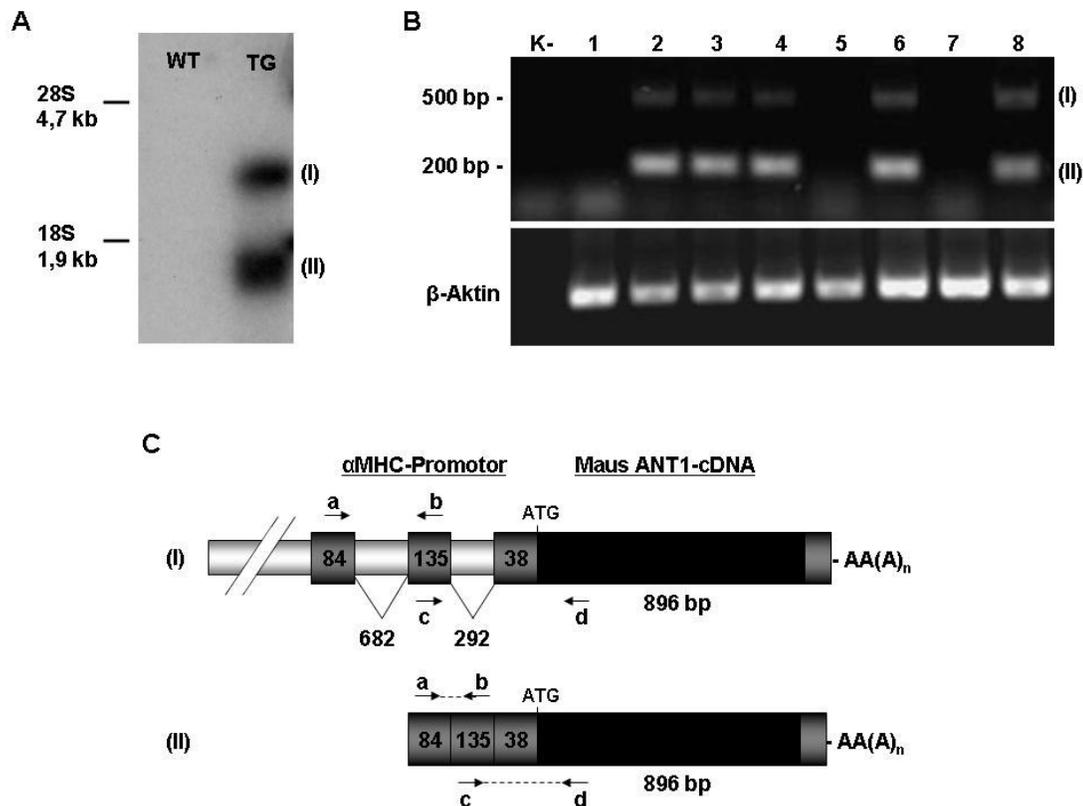


Abbildung 3.13: Expression verschiedener Spleißvarianten des Transgens. (A) Northern Blot Analyse mit 5 μ g Gesamt-RNA aus Herzgewebe unter Verwendung einer spezifischen Sonde gegen die α MHC-ANT1-mRNA. WT: Wildtyp, TG: Transgen, 28S und 18S: ribosomale RNA. (B) RT-PCR zur Detektion des α MHC-ANT1-Transkripts in kardialer cDNA. Als interner Expressionsstandard wurde β -Aktin amplifiziert. K-: Kontaminationskontrolle ohne cDNA. (C) Schematische Darstellung der Spleißvarianten des α MHC-ANT1-Transkripts: (I) ungespleißtes und (II) gespleißtes Transkript. Die Verwendung spezifischer Primerkombinationen ermöglichte die Identifizierung der Spleißvarianten des α MHC-ANT1-Transkripts mittels RT-PCR und anschließender gelelektrophoretischer Analyse der verschiedenen PCR-Produkte (nicht abgebildet). \rightarrow forward-Primer, \leftarrow reverse-Primer, a: α MHCex1, b: α MHCex2, c: MK10BANT, d: ANT1 36.

Die Analyse der α MHC-ANT1-Transkripte mittels RT-PCR, in Abbildung 3.13B dargestellt, bestätigte, dass in Wildtyp-Tieren (Spur 1, 5 und 7) keine entsprechenden Transkripte detektiert werden können, wohingegen in ANT1-transgenen Tieren (Spur 2, 3, 4, 6 und 8) das integrierte Transgen Transkriptionsprodukte bildete. Übereinstimmend mit dem Ergebnis der Northern Blot Analyse wurden auch mittels RT-PCR unter Verwendung der Primer MK10BANT und ANT1 36 zwei verschiedene Transkriptionsprodukte von 522 bp (I) und 175 bp (II) detektiert (s. auch Abbildung 3.13C). Weitere PCR-Analysen mit Intron-überspannenden Primerpaaren, die in Abhängigkeit vom Vorhandensein des Introns Amplifikate unterschiedlicher Länge erzeugen (Abbildung 3.13C), wurden durchgeführt,

um den Spleiß-Status der 5'-UTR der transgenen mRNA zu bestimmen. Der Nachweis spezifischer, spleißabhängiger PCR-Produkte (nicht abgebildet) bestätigte, dass ein Teil (ca. 30 %) der auf dem Konstrukt basierenden Transkriptionsprodukte nicht vollständig gespleißt wird, so dass die später mittels *real-time* PCR gewonnenen Expressionsdaten rechnerisch entsprechend angepasst werden mussten.

3.2.1.2.2 Quantifizierung der Transgenexpression

Die Quantifizierung der ANT1-Überexpression im Herzen transgener Mäuse erfolgte mittels *real-time* PCR in Relation zum internen Expressionsstandard HPRT, für den keine Veränderungen des C_T -Werts zwischen Wildtyp- und transgenen Tieren festgestellt wurden.

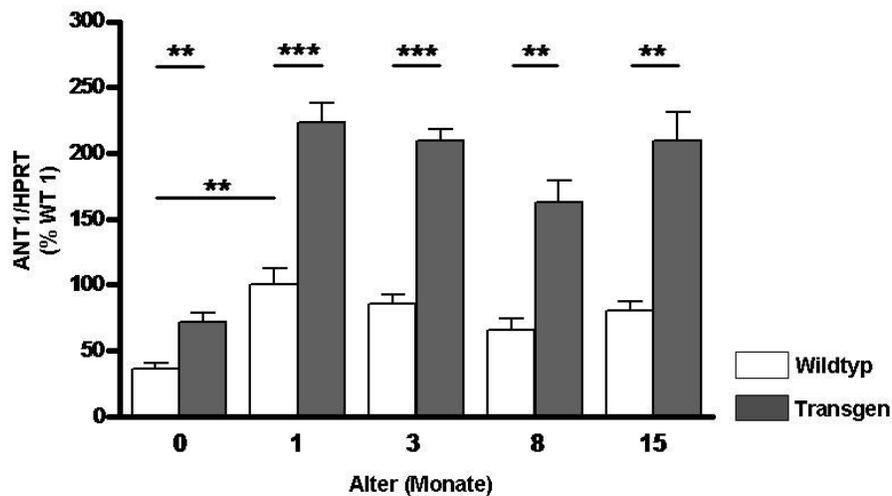


Abbildung 3.14: Quantifizierung der ANT1-Expression in Abhängigkeit vom Alter. Kardiale cDNA aus Wildtyp- und ANT1-transgenen Mäusen verschiedenen Alters wurde zur Quantifizierung der ANT1- und HPRT-mRNA mittels *real-time* PCR eingesetzt. Aufgrund der ontogenetischen Regulation, durch die die adulte ANT1-Expression erst durch postnatale Reifung erreicht wird, wurde die Expression im adulten Tier (Wildtyp 1 Monat) mit 100 % gleichgesetzt. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; $n = 4$.

Zu allen untersuchten Zeitpunkten zwischen 0 und 15 Monaten exprimierten transgene Tiere im Vergleich zum Wildtyp deutlich mehr ANT1 im Herzen (Abbildung 3.14). Bereits bei neonatalen Tieren (0 Monate) ließ sich eine Verdopplung der ANT1-Expression beobachten. Im Alter von 1, 3, 8 und 15 Monaten lag die Zunahme nach rechnerischer Anpassung (s. Kapitel 3.2.1.2.1) zwischen 201 und 260 %, im Mittel bei $237 \pm 19,4$ % ($p < 0,01$). Des Weiteren war ein postnataler Anstieg der endogenen ANT1-Expression zu beobachten, wie er bereits in der Literatur beschrieben worden ist (s. Kapitel 1.3.4.2). In

den ersten vier Lebenswochen stieg die Expression um das 2,5-fache der neonatalen Expression an.

Der Frage, ob die Überexpression des ANT1 die Expression der ANT2-Isoform beeinflussen würde, wurde ebenfalls mittels *real-time* PCR unter Verwendung eines ANT2-spezifischen Genexpressions-Assays nachgegangen.

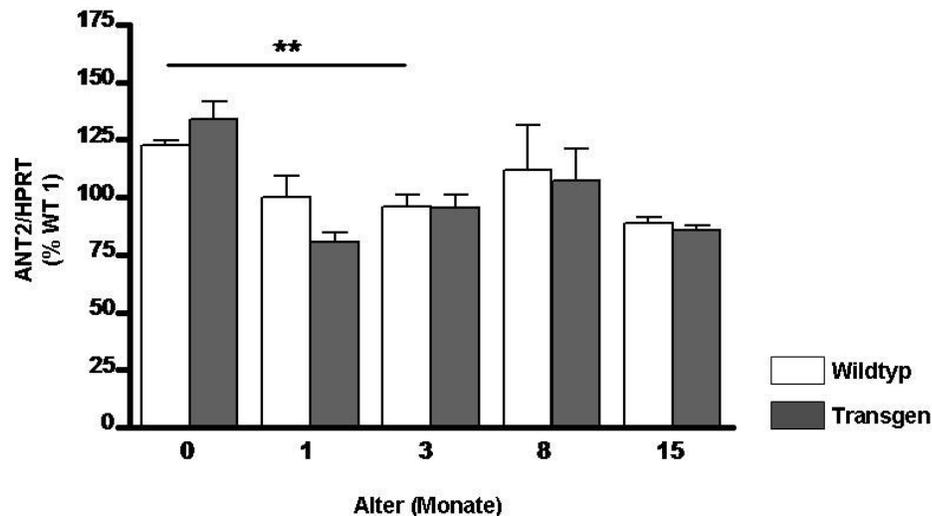


Abbildung 3.15: Quantifizierung der ANT2-Expression in ANT1-transgenen Mäusen. Die ANT2-Expression im Herzen von Wildtyp- und ANT1-transgenen Mäusen wurde mittels *real-time* PCR analysiert. Die Quantifizierung erfolgte relativ zur Expression des internen Expressionsstandards HPRT. Analog zur ANT1-Expression wurde auch hier die Expression im adulten Tier (Wildtyp 1 Monat) mit 100 % gleichgesetzt. ** $p < 0,01$; $n = 4$.

Bei der in Abbildung 3.15 dargestellten Quantifizierung der ANT2-Expression wurde zu keinem der untersuchten Zeitpunkte zwischen 0 und 15 Monaten signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp- und ANT1-transgenen Tieren festgestellt, so dass eine Beeinflussung der ANT2-Expression durch die Überexpression von ANT1 ausgeschlossen werden konnte. Gleichfalls war für diese Isoform eine postnatale Abnahme der endogenen ANT2-Expression um 27 % beim Vergleich von neonatalen und drei Monate alten Tieren zu verzeichnen, die ebenfalls in der Literatur beschrieben wurde (s. Kapitel 1.3.4.2).

Da sich die beiden Linien 17 und 20 weder im Wildtyp ($100,0 \pm 6,7$ % bzw. $90,1 \pm 7,1$ %, $p > 0,05$) noch in den entsprechenden homozygot ANT1-transgenen Tieren ($299,8 \pm 34,3$ % bzw. $271,6 \pm 16,3$ %) in der ANT1- und ANT2-Expression unterschieden, wurden für weitere Versuche ausschließlich Tiere der Linie 20 verwendet.

3.2.1.2.3 Quantifizierung des ANT1-Proteins

Entscheidend für die Validität des ANT1-transgenen Tiermodells war der Nachweis der tatsächlich erhöhten Proteinmenge in den Mitochondrien. Dazu wurden aus Herzgewebe Mitochondrien isoliert (2.13.1.2) und die ANT-Expression mittels Western Blot (2.13.3-2.13.5) unter Verwendung eines ANT-spezifischen Antikörpers analysiert.

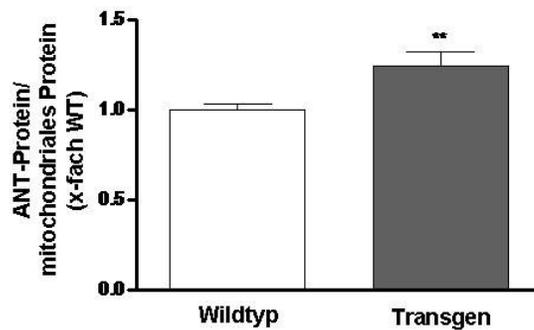


Abbildung 3.16: Western Blot Analyse der ANT-Überexpression. Mitochondrien-Präparationen aus Herzgewebe von Wildtyp- und ANT1-transgenen Mäusen wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und der ANT unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers detektiert. Die Quantifizierung erfolgte relativ zur aufgetragenen Proteinmenge, die mittels Coomassie Blue-Färbung ermittelt wurde. ** $p < 0,01$ vs. Wildtyp; $n = 16$.

In Abbildung 3.16 ist das Ergebnis mehrerer Western Blots zur Untersuchung des ANT-Proteins in den Mitochondrien transgener Tiere zusammengefasst. Es konnte eine signifikante Erhöhung des mitochondrialen ANT-Proteins um 25 % in transgenen Tieren im Vergleich zum Wildtyp ermittelt werden, die, basierend auf den mRNA-Expressionsanalysen, auf die erhöhte Expression der ANT1-Isoform zurückzuführen war.

3.2.1.2.4 Quantifizierung der mtDNA in ANT1-überexprimierenden Herzen

Um zu überprüfen, ob die erhöhte ANT1-Expression mit einer Zunahme der Mitochondrienzahl in der Zelle oder einer Zunahme des ANT-Proteins pro Mitochondrium einhergeht, wurde mittels *real-time* PCR die Kopienzahl des mitochondrialen DNA-Genoms (mtDNA) pro Zelle bestimmt. Dazu wurde unter Verwendung spezifischer Oligonukleotide die Anzahl der Genkopien von Cytochrom B und der 18S rRNA in Präparationen kardialer DNA quantifiziert wurden. Das Gen für Cytochrom B befindet sich auf der mitochondrialen DNA und eignet sich zur Quantifizierung der Mitochondrien²⁰⁴. Das Gen für die 18S rRNA ist nukleär kodiert und dient der Quantifizierung der genomischen DNA und damit der Zellen. Aus dem Verhältnis der Quantifizierung von

Cytochrom B und der 18S rRNA lassen sich Rückschlüsse auf die Menge der Mitochondrien pro Zelle ableiten.

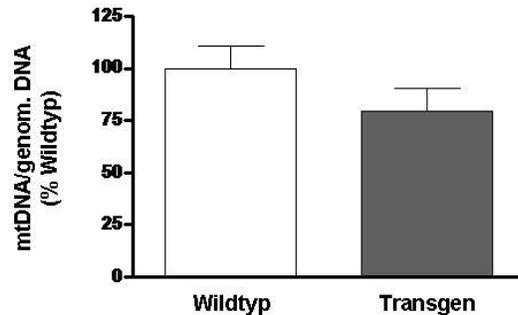


Abbildung 3.17: Bestimmung der mtDNA in ANT1-überexprimierenden Herzen. DNA aus Herzgewebe wurde isoliert und unter Verwendung spezifischer Primer die Gensequenzen für mitochondriales Cytochrom B und nukleärer 18S rRNA mittels *real-time* PCR quantifiziert. Das Verhältnis zwischen Cytochrom B und 18S rRNA entspricht der Anzahl an Mitochondrien pro Zelle, die hier als prozentuales Verhältnis zum Wildtyp wiedergegeben ist. n=10-15.

Die Analyse ergab, dass das Verhältnis von mitochondrialem Cytochrom B und nukleärer 18S rRNA in Wildtyp (WT)- und transgenen (TG) Tieren ($100,0 \pm 11,0$ % vs. $79,8 \pm 10,7$ %, $p > 0,05$) nicht signifikant verschieden war (Abbildung 3.17), so dass davon auszugehen war, dass die Überexpression von ANT1 in kardialen Mitochondrien tatsächlich zu einer höheren ANT-Dichte in der inneren mitochondrialen Membran führte.

3.2.1.2.5 Gewebespezifität der Transgenexpression

Eine entscheidende Voraussetzung für die nachfolgenden Infektionsversuche unter Verwendung der ANT1-transgenen Mäuse war, dass die Transgenexpression auf das Herz beschränkt wurde. Eine Überexpression des ANT1 in Geweben wie Leber und Pankreas, welche das CVB3-Virus ebenfalls passiert, hätte die Effekte der myokardialen ANT1-Überexpression verfälschen können. Zudem ist in der Literatur beschrieben, dass die Überexpression von ANT1 in nicht kardialen Zellen Apoptose auslöst (s. Kapitel 1.3.4.2) und deswegen vermieden werden muss. Daher wurde cDNA aus verschiedenen Geweben der Maus generiert (2.12.9) und das α MHC-ANT1-Transkript mittels RT-PCR detektiert (2.12.10).

Wie in Abbildung 3.18 gezeigt, beschränkt sich die Expression des α MHC-ANT1-Transkripts (II) auf das Herzgewebe ANT1-transgener Tiere (TG Herz), wohingegen weder in Wildtyp-Hezen (WT Herz) noch in einem anderen Organ der transgenen Tiere das Transkript nachgewiesen werden konnte.

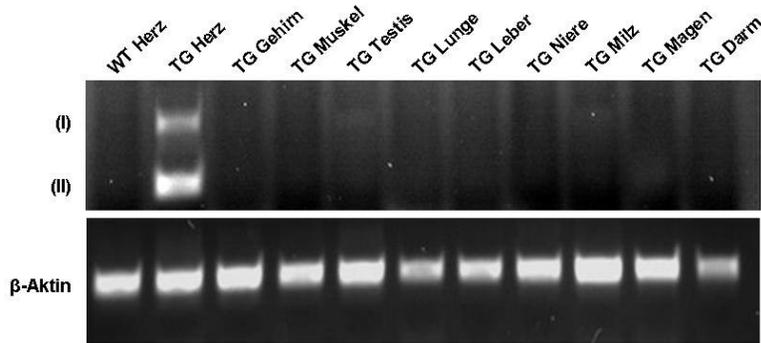


Abbildung 3.18: RT-PCR zum Nachweis der Gewebespezifität der Transgenexpression. cDNA aus verschiedenen Geweben wurde unter Verwendung α MHC-ANT1-spezifischer Primer analysiert. β -Aktin diente als ubiquitärer Expressionsstandard. WT: Wildtyp, TG: ANT1-transgen, I: ungespleißtes Transkript, II: gespleißtes Transkript.

3.2.1.2.6 Beschreibung des Phänotyps ANT1-transgener Mäuse

Die transgenen Tiere zeigten weder in der physischen Begutachtung noch im Verhalten phänotypische Unterschiede im Vergleich zu gleichaltrigen Wildtyp-Mäusen. Fruchtbarkeit, Anzahl der Nachkommen, Mortalität und Lebensdauer waren bei beiden Stämmen vergleichbar.

Die Auswirkungen der herzspezifischen ANT1-Überexpression auf die Herzfunktion wurde mittels Konduktanzkatheder-Messung bei 8 Monate alten ANT1-transgenen Tieren und gleichaltrigen Wildtyp-Kontrollen untersucht (2.15.1). Die gemessenen Parameter der Herzfunktion sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Herzfrequenz, endsystolischer Druck und enddiastolisches Volumen der ANT1-transgenen Tiere unterschieden sich nicht signifikant von Wildtyp-Tieren. Ebenso verhielt es sich mit der Kontraktilität, auch dP/dt_{max} , d. h. die Druckzunahme pro Sekunde und der Relaxation, auch dP/dt_{min} , ein Maß für die Druckabnahme pro Sekunde. Signifikante Unterschiede konnten jedoch für das Schlagvolumen, d. h. das pro Schlag ausgestoßene Blutvolumen ($28,7 \pm 6,9$ vs. $40,5 \pm 11,9$ μ l, $p < 0,05$), und, bei gleichem enddiastolischem Volumen, der Ejektionsfraktion, des prozentualen Anteils des Blutvolumens, ($39,1 \pm 7,4$ vs. $50,8 \pm 7,4$ %, $p < 0,01$) gemessen werden. Das erhöhte Schlagvolumen führte bei gleichbleibender Herzfrequenz zu einer Erhöhung des Cardiac Output, des Gesamtvolumens des ausgestoßenen Blutes pro Minute. Die Nachlast, ein Maß für den Gefäßwiderstand, war in ANT1-transgenen Tieren im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollen signifikant geringer ($3,1 \pm 0,6$ vs. $2,2 \pm 0,6$ mmHg/ μ l, $p < 0,01$).

Tabelle 3: Hämodynamische Parameter. Die Herzfunktion 8 Monate alter Wildtyp- und ANT1-transgener Tiere wurde mittels Konduktanzkatheter-Messung evaluiert. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$ vs. C57BL/6 Wildtyp, $n \geq 7$.

Parameter	C57BL/6-Wildtyp (WT)	ANT1-Transgen (TG)
Herzfrequenz (Schläge/min)	415 ± 39	400 ± 32
Endsystolischer Druck (mmHg)	86,1 ± 13,3	84,2 ± 9,3
Kontraktilität (mmHg/s)	7040 ± 1979	6335 ± 1377
Relaxation (mmHg/s)	-6731 ± 1909	-6036 ± 1401
Enddiastolisches Volumen (µl)	70,9 ± 14,8	83,5 ± 18,8
Schlagvolumen (µl)	28,7 ± 6,9	40,5 ± 11,9*
Ejektionsfraktion (%)	39,1 ± 7,4	50,8 ± 7,4**
Ea Nachlast (mmHg/µl)	3,1 ± 0,6	2,2 ± 0,6**
Tau (ms)	9,3 ± 1,6	10,2 ± 1,6
Cardiac Output (ml/min)	11,7 ± 3,4	15,7 ± 4,6*

Weitere hämodynamische Messungen mit 16 Monate alten Tieren ergaben, dass sich mit zunehmendem Alter das Schlagvolumen und somit auch der Cardiac Output der ANT1-transgenen Tiere an den Wildtyp angleichen (nicht gezeigt), so dass in diesem Alter praktisch keine Unterschiede mehr zwischen den beiden Stämmen in der Herzfunktion vorlagen.

3.2.2 CVB3-Myokarditis im ANT1-transgenen Mausmodell

Der Vergleich resistenter und permissiver Mausstämmen nach CVB3-Infektion hatte deutliche Unterschiede in der Regulation des mitochondrialen Energiestoffwechsels und der Apoptose ergeben. Insbesondere für den ANT1, der in beide Prozesse involviert ist, wurde eine Cytokin-abhängige Regulation gezeigt, die in infizierten C57BL/6-Mäusen in einer massiven Abnahme der ANT1-Expression resultierte, wohingegen in zwei permissiven Mausstämmen eine tendenzielle bis signifikante Erhöhung der ANT1-Expression festgestellt wurde. Da auch bei einem Teil der Patienten mit Myokarditis und DCM ein krankheitsspezifischer Anstieg in der ANT1-Expression beschrieben wurde, sollte unter Verwendung des etablierten ANT1-transgenen Stamms der Frage nachgegangen werden, inwiefern einem Entgegenwirken der ANT1-Expressionsabnahme in resistenten Mäusen durch die transgene Überexpression des Proteins in den Herzen virusinfizierter C57BL/6-Mäuse die Myokarditis beeinflusst. Hierbei wurden wieder insbesondere der mitochondriale Energiestoffwechsel und die Apoptose untersucht, an deren Prozessen der ANT1 beteiligt ist.

Dazu wurden sechs Wochen alte Wildtyp- und ANT1-transgene Mäuse mit $5 \cdot 10^5$ pfu CVB3 i. p. infiziert (2.15.2). Die infizierten Tiere und gleichaltrige Tiere der nicht infizierten Kontrollgruppe (200 μ l PBS i. p.) wurden am Tag 4, 8 oder 28 nach der Infektion getötet und Gewebeproben zur weiteren Untersuchung entnommen (Abbildung 3.19). Der zusätzliche Zeitpunkt von 4 Tagen p. i. wurde eingefügt, um Prozesse, die bereits in der frühen, akuten Phase beginnen, zu erfassen.

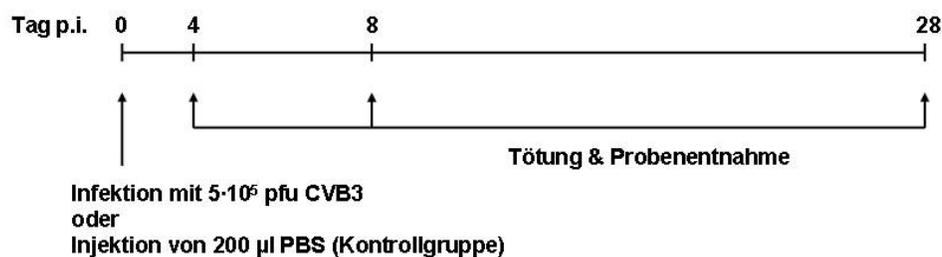


Abbildung 3.19: Infektionsschema. Sechs Wochen alte Männchen des C57BL/6-Wildtyps und der ANT1-transgenen Linie wurden mit $5 \cdot 10^5$ pfu CVB3 i. p. infiziert. In der nicht infizierten Kontrollgruppe wurde gleichaltrigen Tieren 200 μ l PBS i. p. injiziert. Nach 4 ($n \geq 4$), 8 oder 28 Tagen ($n \geq 6$) nach der Infektion (p. i.) wurden die Tiere mittels Genickbruch getötet und Gewebeproben zur weiteren Analyse entnommen.

3.2.2.1 Überexpression des ANT1 in der CVB3-induzierten Myokarditis

Die Untersuchung der ANT-Expression mittels *real-time* PCR und Western Blot ergab in C57BL/6-Wildtypen, dass die in Kapitel 3.1.2.2 beschriebene Abnahme des ANT1-

Transkripts (Abbildung 3.20A) und des ANT1-Proteins in den Mitochondrien (Abbildung 3.20C) ein sehr frühes Ereignis war, das bereits am Tag 4 nach Infektion deutlich ausgeprägt war und bis zum Tag 28 nach der Infektion bestehen blieb. Dabei wurde die ANT1-mRNA um bis zu 42 % und das ANT-Protein in den Mitochondrien um bis zu 24 % herunterreguliert.

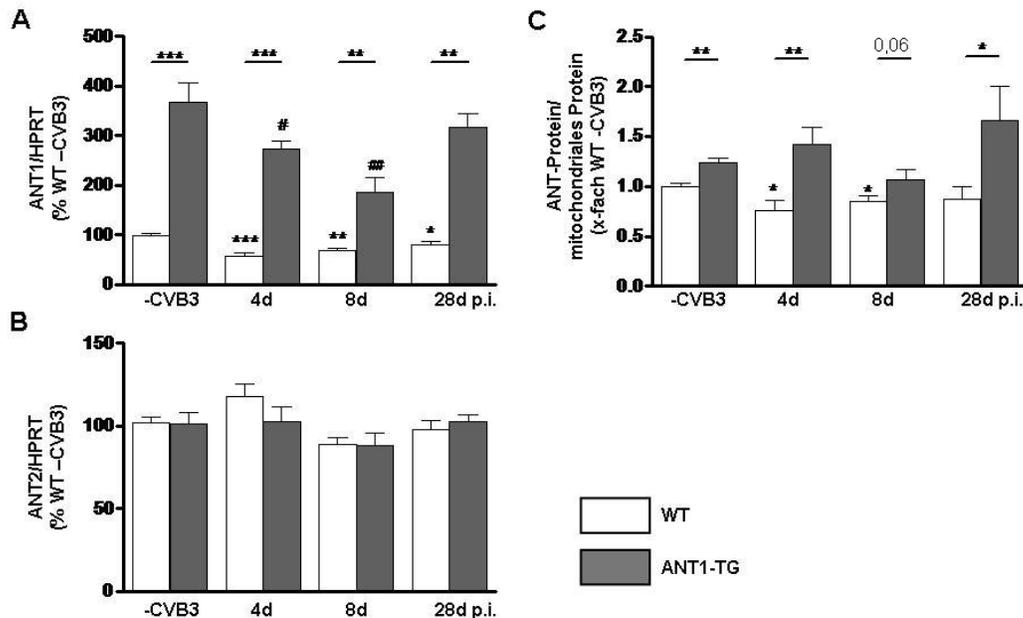


Abbildung 3.20: Kardiale Expression der ANT-Isoformen im transgenen Myokarditis-Modell.

Die Expression des (A) ANT1- und (B) ANT2-Transkripts in kardialer cDNA aus infizierten und nicht infizierten Herzen wurde mittels *real-time* PCR quantifiziert. Als interner Expressionsstandard wurde HPRT verwendet und die relative Expression von ANT1 und ANT2 zu HPRT als prozentuales Verhältnis zum nicht infizierten Wildtyp (WT -CVB3) dargestellt. (C) Mitochondriales ANT-Protein wurde mittels Western Blot unter Verwendung der Mitochondrien-Fraktion und eines ANT-spezifischen Antikörpers quantifiziert. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 vs. WT -CVB3, #vs. ANT1-TG +CVB3, n≥4. WT: Wildtyp, TG: Transgen, d p. i.: Tage post infectionem.

Auch in ANT1-transgenen Mäusen war eine Herunterregulation der ANT1-Transkription zu verzeichnen, deren Maximum von 50 % um den Tag 8 nach der Infektion erreicht wurde. Jedoch war die ANT1-Expression in transgenen Tieren zu jedem der gemessenen Zeitpunkte signifikant höher als in Wildtyp-Tieren zum gleichen Zeitpunkt. Auch auf Proteinebene war der Unterschied in der mitochondrialen ANT1-Expression zwischen Wildtyp- und ANT1-transgenen Tieren nachweisbar (Abbildung 3.20C). Im Gegensatz zum Wildtyp blieb die ANT-Proteinexpression während des gesamten Infektionsdauer stabil.

Nahezu unverändert blieb auch die Expression der ANT2-Isoform (Abbildung 3.20B) in beiden Genotypen. Sie wurde weder durch eine veränderte Expression des ANT1 noch durch die Virusinfektion bzw. Inflammation beeinflusst.

Zusammengefasst konnten wir bestätigen, dass in CVB3-infizierten ANT1-transgenen Herzen der ANT1 im Vergleich zum Wildtyp stabil exprimiert blieb.

3.2.2.2 CVB3-Myokarditis in infizierten ANT1-transgenen C57BL/6-Tieren

Infizierte Wildtyp- und ANT1-transgene Tiere zeigten die typischen Krankheitssymptome wie sie bereits in Kapitel 3.1.1 beschrieben wurden. Gemessen am Erscheinungsbild und der Mortalität der infizierten Tiere konnten in der Schwere der akuten Erkrankung keine Unterschiede zwischen den beiden Stämmen beobachtet werden und 95 % der infizierten Tiere überlebten bis zum angesetzten Ende des Experiments.

Mittels Plaque-Assay (2.16.2) und Hämatoxylin-Eosin-Färbung (2.17) wurden der kardiale Virustiter und das Ausmaß der immunologischen Infiltration in Wildtyp- und ANT1-transgenen Mäusen analysiert.

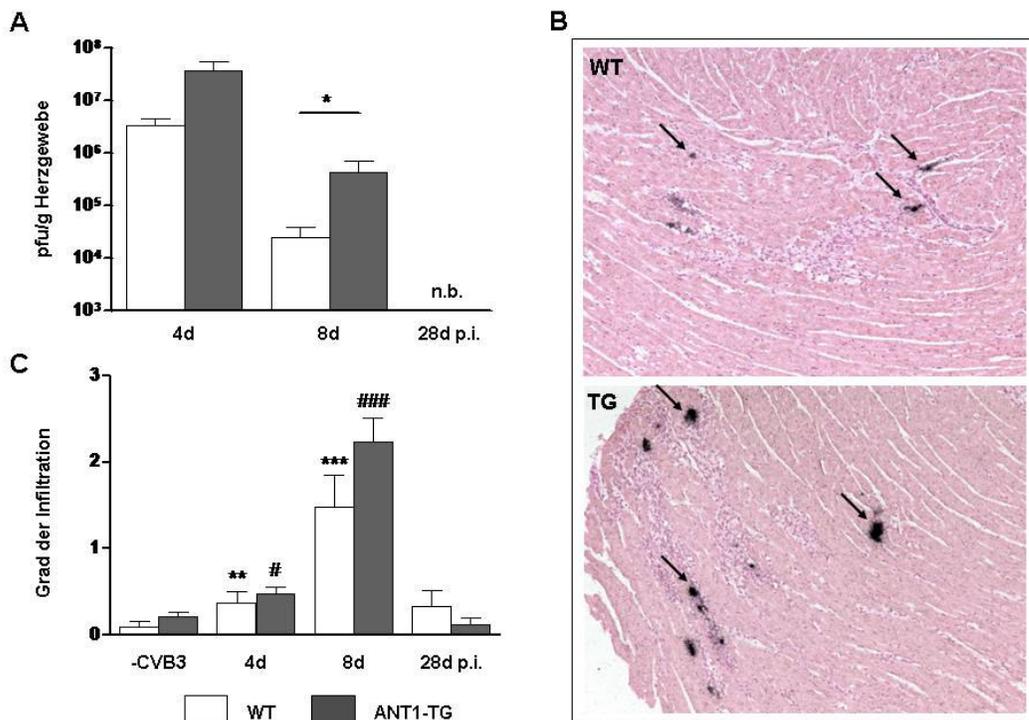


Abbildung 3.21: CVB3-induzierte Myokarditis in ANT1-überexprimierenden Mäusen. (A) Der kardiale Virustiter am Tag 4 und 8 nach der Infektion wurde mittels Plaque-Assay quantifiziert. (B) CVB3-spezifische RNA (Pfeile) in infizierten Herzen am Tag 8 nach der Infektion wurde mittels *in situ* Hybridisierung detektiert. Vergrößerung ×10. (C) Zur Evaluierung der Infiltration des Herzens mit Immunzellen wurden Hämatoxylin-Eosin-gefärbte Formalinschnitte ausgewertet. *p<0,05,

p<0,01, *p<0,001 vs. WT –CVB3, #vs. ANT1-TG –CVB3; n≥4. n. b.: nicht bestimmt, d p. i.: Tage *post infectionem*.

Die höchste Viruslast in CVB3-infizierten Herzen wurde am Tag 4 nach der Infektion gemessen (Abbildung 3.21A). Zu diesem Zeitpunkt ließen sich in Wildtyp-Hezen $3,39 \pm 1,19 \cdot 10^6$ pfu/g Herzgewebe nachweisen, wohingegen in ANT1-transgenen Tieren in etwa das Zehnfache ($3,78 \pm 1,76 \cdot 10^7$ pfu/g Herzgewebe, p=0,11, n=4-6) vorlag. Am Tag 8 nach der Infektion war dieser Unterschied zwischen den beiden Stämmen noch deutlicher ausgeprägt, so dass in ANT1-transgenen Herzen ein signifikant höherer Virustiter als im Wildtyp gemessen wurde ($2,49 \pm 1,42 \cdot 10^4$ pfu/g Herzgewebe vs. $4,31 \pm 2,91 \cdot 10^5$ pfu/g Herzgewebe, p=0,040). Mittels *in situ* Hybridisierung (2.16.3) konnte eine verstärkte Akkumulation CVB3-spezifischer RNA in Herzen ANT1-transgener Mäuse im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen werden (Abbildung 3.21B).

Die Infiltration des Herzgewebes mit Immunzellen wurde in Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Formalinschnitten untersucht. In beiden Stämmen hatte die Einwanderung immunkompetenter Zellen bereits am Tag 4 nach der Infektion begonnen (Abbildung 3.21C) und nahm bis Tag 8 nach der Infektion weiter zu. Im Unterschied zur Viruslast konnte in Bezug auf die Infiltration jedoch kein eindeutig signifikanter Unterschied zwischen infizierten ANT1-transgenen und Wildtyp-Tieren festgestellt werden, jedoch zeigte die Korrelationsanalyse einen signifikanten Zusammenhang zwischen Viruslast und Infiltrationsgrad im einzelnen Tier ($r=0,86$, p<0,001). Am Tag 28 nach der Infektion war die Infiltration vollständig zurückgegangen.

Sowohl in diesem Kapitel als auch bei der Analyse des A.SW-Stamms (s. Kapitel 3.1) konnte eine erhöhte ANT1-Expression mit einem Anstieg der Virusreplikation in Verbindung gebracht werden. Es stellte sich die Frage, inwiefern die Höhe der Virusreplikation mit der ANT1-Expression zusammenhing oder ob die Virusreplikation vorrangig von den immunologischen Prozessen des Gesamtorganismus beeinflusst wurde. Um diesen Zusammenhang weiter zu überprüfen, wurden primäre, embryonale Kardiomyozyten (PECM) aus C57BL/6-Wildtypen und ANT1-transgenen Mäusen isoliert (2.14.1) und mit CVB3 infiziert (2.16.1). Anschließend wurden die infizierten Zellen in Bezug auf die Expression des ANT1-Transkripts und die virale Replikation analysiert. Zusätzlich wurde die Expression des Coxsackie-Adenovirus-Rezeptors (CAR) mittels *real-time* PCR quantifiziert (2.12.11).

In Abbildung 3.22 sind die Ergebnisse dieses Versuchs zusammengefasst.

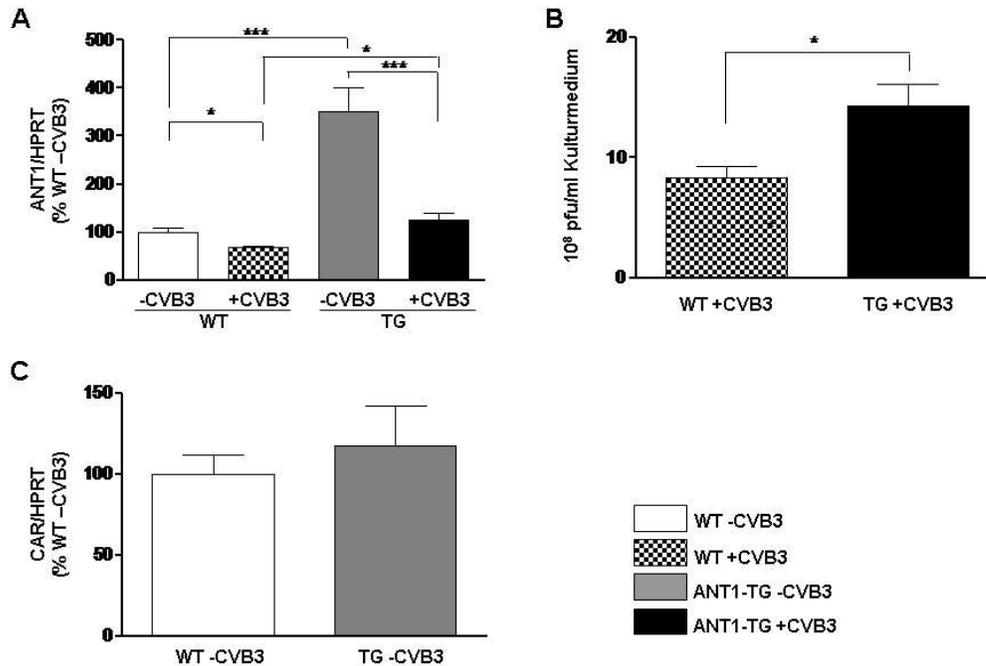


Abbildung 3.22: CVB3-Infektion primärer embryonaler Kardiomyozyten. Herzen aus Embryonen (E13.5) von Wildtyp- und ANT1-transgenen Mäusen wurden präpariert und Kardiomyozyten isoliert. Nach 48 h unter Standard-Kulturbedingungen wurden die Zellen mit CVB3 infiziert (MOI 1). 24 h nach der Infektion wurde ein Teil der Zellen mit TRIzol[®] lysiert, RNA isoliert und ANT1 (A), CAR (C) und HPRT als interner Expressionsstandard mittels *real-time* PCR quantifiziert. (B) Der andere Teil der infizierten Zellen wurde zur Bestimmung der Virusreplikation mittels Plaque-Assay verwendet. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, n=4-8. WT: Wildtyp, TG: Transgen, -CVB3: nicht infizierte Kontrolle, +CVB3: CVB3-infiziert.

In Übereinstimmung mit der Charakterisierung der ANT1-transgenen Mäuse wurde in primären embryonalen Kardiomyozyten dieses Stamms eine um das dreifache erhöhte ANT1-Expression im Vergleich zu Wildtyp-Kardiomyozyten nachgewiesen (Abbildung 3.22A). Ebenfalls übereinstimmend mit den in CVB3-infizierten Mäusen erhobenen Daten wurde nach der Infektion eine massive Abnahme der ANT1-Expression sowohl im Wildtyp als auch in transgenen Zellen beobachtet, jedoch sank die Transkriptmenge in infizierten, ANT1-transgenen Kardiomyozyten nicht unter das Niveau der nicht infizierten Wildtyp-Zellen. Die zwischen den beiden infizierten Gruppen bestehende Differenz in der Expression des ANT1 ging einher mit einer höheren Virusreplikation in ANT1-überexprimierenden Zellen im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 3.22B). Da bei der Untersuchung der Expression des CAR (Abbildung 3.22C) keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen ($100,0 \pm 11,9$ % vs. $117,8 \pm 24,4$ %, n=8) festgestellt wurden, kann die vermehrte virale Replikation nicht auf eine Erhöhung des CVB3-Internalisierungsrezeptors zurückgeführt werden.

3.2.2.3 Der Energiestoffwechsel in CVB3-infizierten ANT1-transgenen Tieren

Eine Erhöhung der ANT1-Expression in kardialen Mitochondrien transgener Mäuse ist ein Eingriff in die Stöchiometrie der Komponenten des mitochondrialen Energiestoffwechsels. Es stellte sich die Frage, welche Auswirkungen dies auf die Atmungskette und nachgeschaltete Prozesse sowohl in nicht infizierten Tieren als auch unter den Bedingungen einer CVB3-Infektion des Herzens hat. Mittels spektrophotometrischer Aktivitätsmessungen (2.13.7.1) wurde die Aktivität der Komplexe I, II, III und IV in infizierten Wildtyp- und ANT1-transgenen Tieren sowie nicht infizierten Kontrolltieren bestimmt. Bereits in Kapitel 3.1.2.1 wurde auf die Veränderungen der Atmungskettenaktivität in C57BL/6-Wildtypen mit akuter Myokarditis eingegangen.

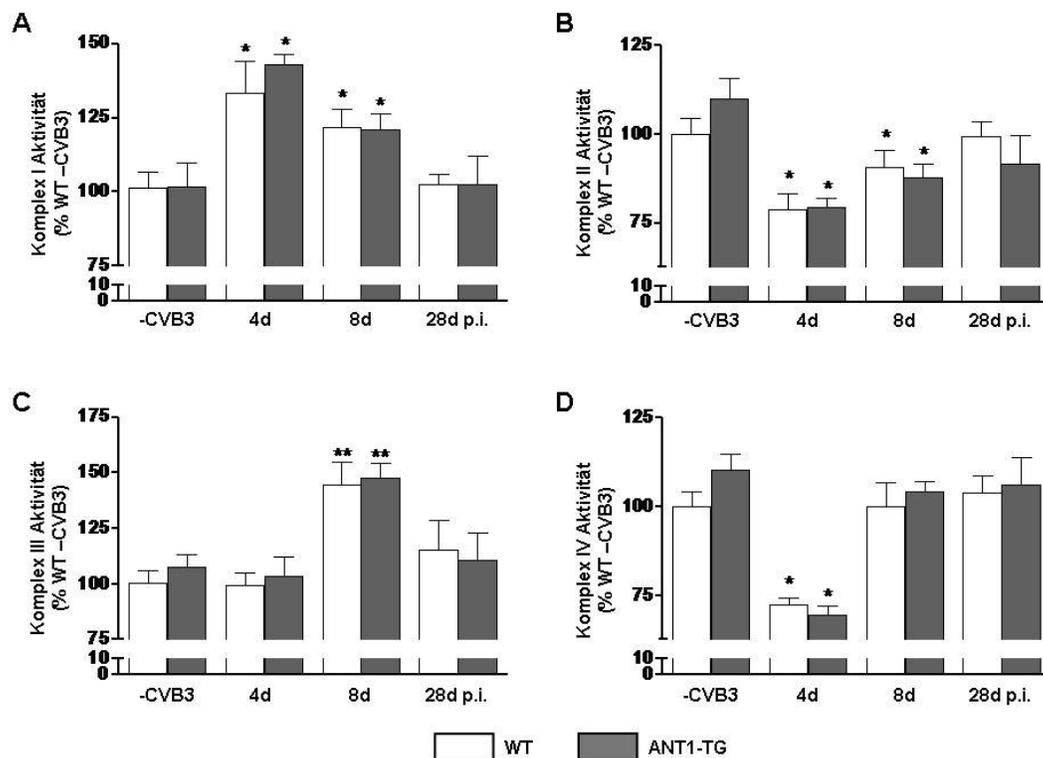


Abbildung 3.23: Aktivität der Atmungskettenkomplexe in ANT1-überexprimierenden, CVB3-infizierten Herzen. In Mitochondrienpräparationen aus CVB3-infizierten Herzen von Wildtyp- und ANT1-transgenen Mäusen wurde mittels spektrophotometrischer Verfahren die Aktivität der Komponenten der Atmungskette im Vergleich zu nicht infizierten Kontrolltieren ermittelt: (A) Komplex I, (B) Komplex II, (C) Komplex III und (D) Komplex IV. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs. -CVB3, $n \geq 5$. WT: Wildtyp, TG: Transgen, d p. i.: Tage *post infectionem*.

Zusammengefasst konnte für Komplex I und III eine Erhöhung der Aktivität in der akuten Phase der Infektion gemessen werden (auch Abbildung 3.23A und C), wohingegen am

Tag 8 nach der Infektion die Aktivität der Komplexe II und IV geringfügig abnahm bzw. unverändert blieb (Abbildung 3.23B und D). Die Aktivität aller vier Komplexe normalisierte sich bis Tag 28 nach der Infektion, so dass kein Unterschied zur nicht infizierten Kontrollgruppe bestand. Die Analyse am Tag 4 nach der Infektion ergab darüber hinaus, dass die Erhöhung der Komplex I-Aktivität in C57BL/6-Mäusen ein frühes Ereignis nach der CVB3-Infektion ist. Des Weiteren wurde eine frühzeitige, vorübergehende Herunterregulation der Aktivität der Komplexe II um 21 % und IV um 28 % festgestellt.

Die Überexpression von ANT1 in kardialen Mitochondrien transgener Mäuse wurde nicht begleitet von signifikanten Veränderungen in der Atmungskettenaktivität gegenüber dem nicht infizierten Wildtyp (Abbildung 3.23, vgl. WT –CVB3 vs. ANT1-TG –CVB3). Weiterführende Untersuchungen mit Mitochondrien aus 16 Monate alten Tieren bestätigten dieses Ergebnis (nicht abgebildet). Gleichfalls kann unter Infektionsbedingungen eine dem Wildtyp entsprechende Regulation beobachtet werden, wobei es zu keinem der untersuchten Zeitpunkte Unterschiede zwischen den infizierten Gruppen der beiden Genotypen gab.

Da die CK dem ANT unmittelbar nachgeschaltet ist und mit diesem auch interagiert, wurde die Aktivität der mitochondrialen und cytosolischen CK in CVB3-infizierten ANT1-transgenen Herzen im Vergleich zum Wildtyp analysiert (nicht abgebildet). In nicht infizierten Kontrollen wurde weder die mitochondriale noch die cytosolische CK-Aktivität durch die ANT1-Überexpression beeinflusst. Die Infektion transgener Tiere mit CVB3 verursachte eine dem Wildtyp entsprechende, vorübergehende Abnahme der Aktivität der mitochondrialen CK um etwa 40 % gegenüber den nicht infizierten Kontrollen, die in der akuten Phase der Myokarditis am Tag 4 und Tag 8 nach der Infektion beobachtet wurde. Die Aktivität der cytosolischen CK keine signifikanten Unterschiede war zu allen Zeitpunkten nahezu unverändert und unterschied sich nicht zwischen den beiden Genotypen (nicht abgebildet).

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass die ANT1-Überexpression die Virusreplikation unabhängig von den untersuchten Parametern des mitochondrialen Energiestoffwechsels beeinflusste.

3.2.2.4 Die Apoptose im CVB3-infizierten ANT1-transgenen Mausmodell

Neben dem mitochondrialen Energiestoffwechsel besitzt der ANT1 eine wichtige regulatorische Funktion im mPTP-abhängigen Zelltod. Aus diesem Grund wurde die Expression apoptoserelevanter Marker in CVB3-infizierten und nicht infizierten ANT1-transgenen Mäusen im Vergleich zum C57BL/6-Wildtypstamm analysiert. Analog zu den in Kapitel 3.1.3 beschriebenen Untersuchungen wurde mittels *real-time* PCR (2.12.11) die

Expression der Transkripte für Bcl-2 und Bax quantifiziert und mittels Western Blot Analysen (2.13.3-5) die Expression der Pro-Caspase-3 bestimmt.

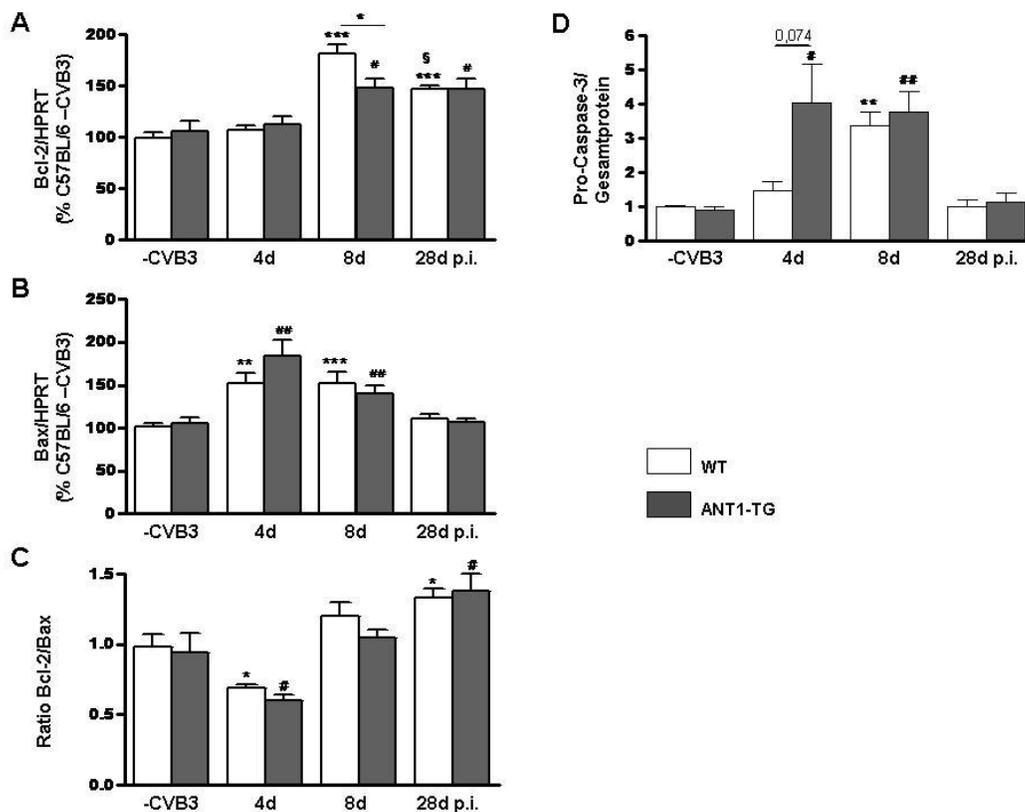


Abbildung 3.24: Apoptose-Marker in ANT1-überexprimierenden Tieren mit CVB3-Myokarditis. Die Expression von (A) Bcl-2 und (B) Bax wurde mittels *real-time* PCR unter Verwendung kommerzieller Genexpressions-Assays quantifiziert und (C) das Verhältnis aus Bcl-2 zu Bax rechnerisch ermittelt. (D) Die Expression der Pro-Caspase-3 wurde im Western Blot bestimmt. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. WT -CVB3, #vs. ANT1-TG -CVB3, §vs. WT 8 d p. i., $n \geq 4$. WT: C57BL/6-Wildtyp, TG: Transgen, d p. i.: Tage *post infectionem*.

Ergänzend zu den bereits in Kapitel 3.1.3 ausgeführten Beobachtungen konnte festgestellt werden, dass proapoptische Veränderungen ein frühes Ereignis in der CVB3-induzierten Myokarditis sind. Am Tag 4 nach der Infektion war in infizierten Wildtyp-Tieren die Expression von Bax um 53 % erhöht (Abbildung 3.24B), wohingegen sein antiapoptotischer Gegenspieler Bcl-2 unverändert exprimiert wurde (Abbildung 3.24A), so dass eine Verschiebung der Bcl-2/Bax-Ratio ($1,00 \pm 0,09$ vs. $0,69 \pm 0,03$) stattfand (Abbildung 3.24C). Auch im weiteren Verlauf der akuten Infektion blieb die Expression von Bax gleichbleibend erhöht und normalisierte sich mit dem Abklingen der Infektion bis Tag 28 nach der Infektion. Da jedoch die Expression von Bcl-2 bis Tag 8 nach der Infektion ebenfalls um 49 % hochreguliert wurde, wurde das Verhältnis Bcl-2/Bax wieder

ausgeglichen und durch eine fortgesetzte Hochregulation von Bcl-2 bei gleichzeitiger Normalisierung der Bax-Expression am Tag 28 nach der Infektion umgekehrt ($1,33 \pm 0,07$). In ANT1-überexprimierenden Tieren konnten in der nicht infizierten Kontrollgruppe keine Unterschiede in der Expression der Apoptose-Marker im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden (Abbildung 3.24A-D, vgl. WT –CVB3 vs. ANT1-TG –CVB3). Auch unter Infektionsbedingungen gab es lediglich geringe Unterschiede zwischen ANT1-transgenen und Wildtyp-Tieren. Zum einen war die Expression des antiapoptotischen Bcl-2 am Tag 8 nach der Infektion in infizierten transgenen Tieren höher als in der nicht infizierten Kontrollgruppe ($106,0 \pm 10,4$ % vs. $148,5 \pm 8,5$ %), blieb jedoch deutlich unter den Werten des infizierten Wildtyps ($181,9 \pm 8,9$). Trotz einer vergleichbaren Bax-Expression in den beiden Genotypen wirkte sich dieser Unterschied nicht entscheidend auf die Bcl-2/Bax-Ratio aus ($1,20 \pm 0,10$ vs. $1,05 \pm 0,06$, $p=0,16$). Zum anderen war nur in ANT1-transgenen Tieren bereits am Tag 4 nach der Infektion eine massive Zunahme in der Expression der Pro-Caspase-3 zu beobachten (Abbildung 3.24D), die sich möglicherweise aufgrund der niedrigen Probenzahl lediglich tendenziell vom Wildtyp unterschied ($p=0,074$, $n=4-6$). Am Tag 8 nach der Infektion war die Expression der Pro-Caspase-3 bei beiden Genotypen gleichermaßen um das 3-fache erhöht gegenüber den nicht infizierten Kontrollgruppen und normalisierte sich bis Tag 28 nach der Infektion.

Zusätzlich wurde die Aktivität des antioxidativen Stress-Systems über die Expression der MnSOD2 und der Catalase mittels Western Blot analysiert. Für beide Enzyme wurden keine Unterschiede in der Regulation zwischen ANT1-transgenen und den nicht infizierten Wildtyp-Kontrollen festgestellt. Gleichfalls wurden in den entsprechenden CVB3-infizierten Gruppen lediglich die für den C57BL/6-Wildtyp bereits in Kapitel 3.1.3 beschriebenen Veränderungen beobachtet (nicht abgebildet).

Zusammenfassend hat eine erhöhte ANT1-Expression im CVB3-infizierten Herzen nur geringe Auswirkungen auf die Expression der hier untersuchten Apoptose-Marker.

3.2.3 Das ANT1-transgene Tiermodell in der diabetischen Kardiomyopathie

Neben dem CVB3-Myokarditis-Modell wurde im Rahmen dieser Arbeit ein weiteres Krankheitsmodell untersucht, um die durch verschiedene Gruppen aufgestellte Hypothese eines kardioprotektiven Effekts der ANT1-Überexpression zu testen^{204, 206, 207}. Hierzu wurde das in der Literatur gut beschriebene Mausmodell des Streptozotocin (STZ)-induzierten Diabetes Typ I gewählt²²⁸, das im Unterschied zur viralen Myokarditis eine sekundäre Kardiomyopathie darstellt und vergleichbar ist mit dem zuvor durch unsere Arbeitsgruppe beschriebenen hypertonen Rattenmodell²⁰⁴. Mehrere Studien der vergangenen Jahre deuten darauf hin, dass die Ursache des bei diabetischen Erkrankungen auftretenden Herzversagens zumindest teilweise eine spezifische Form der Kardiomyopathie ist. Die diabetische Kardiomyopathie ist charakterisiert durch eine linksventrikuläre Dysfunktion, die unabhängig von Bluthochdruck, koronarer Herzkrankheit und anderen bekannten Herzerkrankungen ist. Obwohl die Pathogenese der diabetischen Kardiomyopathie bisher nicht aufgeklärt wurde, ist bekannt, dass eine Vielzahl von Mechanismen, einschließlich Mikroangiopathie, myokardiale Fibrose, Störungen des kardialen Energiestoffwechsels, oxidative Schädigung, Apoptose und Nekrose dazu beitragen²²⁹⁻²³². Ciapaite *et al.* konnten zeigen, dass die Hemmung des ANT durch langkettige Acyl-CoA-Ester über eine Erhöhung der reaktiven Sauerstoffspezies und des Adenosins zur zellulären Dysfunktion bei Adipositas und Diabetes Typ 2 beiträgt²³³. Zudem wurden Schäden in der Struktur und der Funktion der Mitochondrien in diabetischen Herzen beobachtet²³⁴. Mit dem uns zur Verfügung stehenden ANT1-transgenen Tiermodell sollte überprüft werden, inwiefern die herzspezifische ANT1-Überexpression den kardialen Phänotyp der diabetischen Kardiomyopathie beeinflusst.

3.2.3.1 *Induktion des Diabetes Typ I in ANT1-transgenen Mäusen*

Diabetes mellitus wurde in 5-6 Monate alten C57BL/6- und ANT1-transgenen Männchen durch tägliche Injektion von 50 mg STZ/kg Körpergewicht i. p. an fünf aufeinander folgenden Tagen induziert (2.15.3). Am Ende der ersten und nochmals nach sechs Wochen wurde die Blutzuckerkonzentration überprüft.

Im Verlauf der sechs Wochen nach STZ-Injektion entwickelten sowohl die Wildtyp- als auch die ANT1-transgenen Mäuse eine gleichermaßen ausgeprägte Hyperglykämie (Abbildung 3.25A) und eine vergleichbare Abnahme des Körpergewichts (Abbildung 3.25B). Die Zunahme des Verhältnisses Nieren- zu Körpergewicht (Abbildung 3.25C) wurde ebenfalls in Wildtyp- und ANT1-überexprimierenden Mäusen beobachtet, ohne dass signifikante Unterschiede zwischen den beiden Genotypen zutage traten. Grundsätzlich konnte somit eine vergleichbare Induktion des diabetischen Phänotyps in Wildtyp- und ANT1-transgenen Mäusen gezeigt werden.

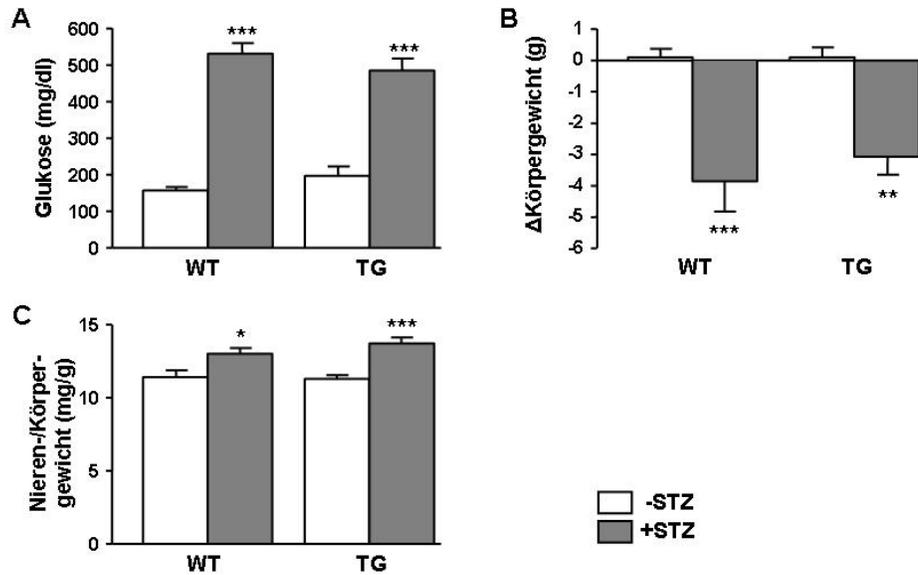


Abbildung 3.25: Basale Charakterisierung der diabetischen und nicht diabetischen Mäuse. (A) Hyperglykämie in Streptozotocin (STZ)-behandelten Wildtyp (WT) und ANT1-transgenen (TG) Mäusen wurde mittels Messung der Glukosekonzentration im Blut bestätigt. Sechs Wochen nach der Induktion des Diabetes wurden Veränderungen des Körpergewichts (B) und des Gewichts der Nieren (C), hier dargestellt im Verhältnis zum Körpergewicht, dokumentiert. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. -STZ; $n \geq 10$.

3.2.3.2 ANT-Expression in der diabetischen Kardiomyopathie

Zur weiteren Charakterisierung der ANT-Expression im STZ-induzierten Diabetes wurden sowohl ANT1- als auch ANT2-Transkripte mittels *real-time* PCR quantifiziert (2.12.11).

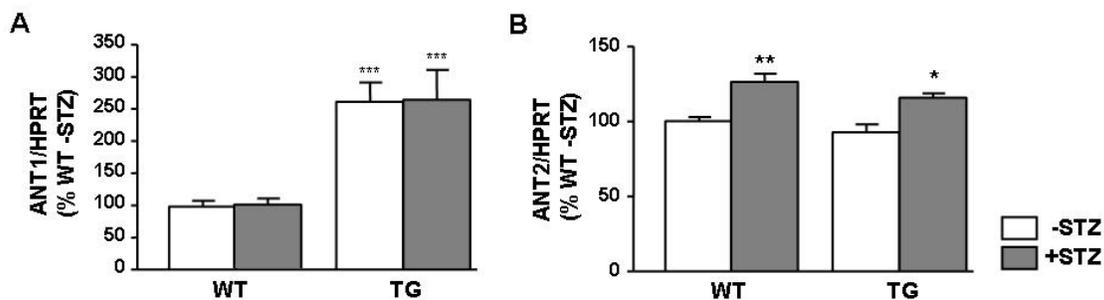


Abbildung 3.26: Expression der ANT-Isoformen in der diabetischen Kardiomyopathie. Die Quantifizierung von ANT1 (A) und ANT2 (B) mittels *real-time* PCR ist dargestellt als prozentuales Verhältnis zu den Wildtyp-Kontrollen. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. -STZ; $n \geq 6$. WT: Wildtyp, TG: ANT1-Transgen.

In transgenen Mäusen war die ANT1-mRNA erwartungsgemäß massiv erhöht (Abbildung 3.26A) und wurde durch die hyperglykämischen Bedingungen nicht beeinflusst. Hingegen

konnte sowohl in Wildtyp- als auch in transgenen Mäusen die Expression der ANT2-Isoform durch STZ induziert werden, wobei die Zunahme zwischen 16 und 26 % lag (Abbildung 3.26B).

3.2.3.3 Kardioprotektiver Effekt der ANT1-Überexpression bei diabetischer Kardiomyopathie

Zur Analyse der Auswirkung der erhöhten ANT1-Expression wurde die Herzfunktion in ANT1-transgenen und Wildtyp-Mäusen unter diabetischen Bedingungen mittels hämodynamischer Messungen sechs Wochen nach der Injektion von STZ bzw. Citratpuffer gemessen (2.15.3) sowie molekulare Marker der Herzinsuffizienz mittels *RNase-Protection-Assay* (2.12.6.6) untersucht.

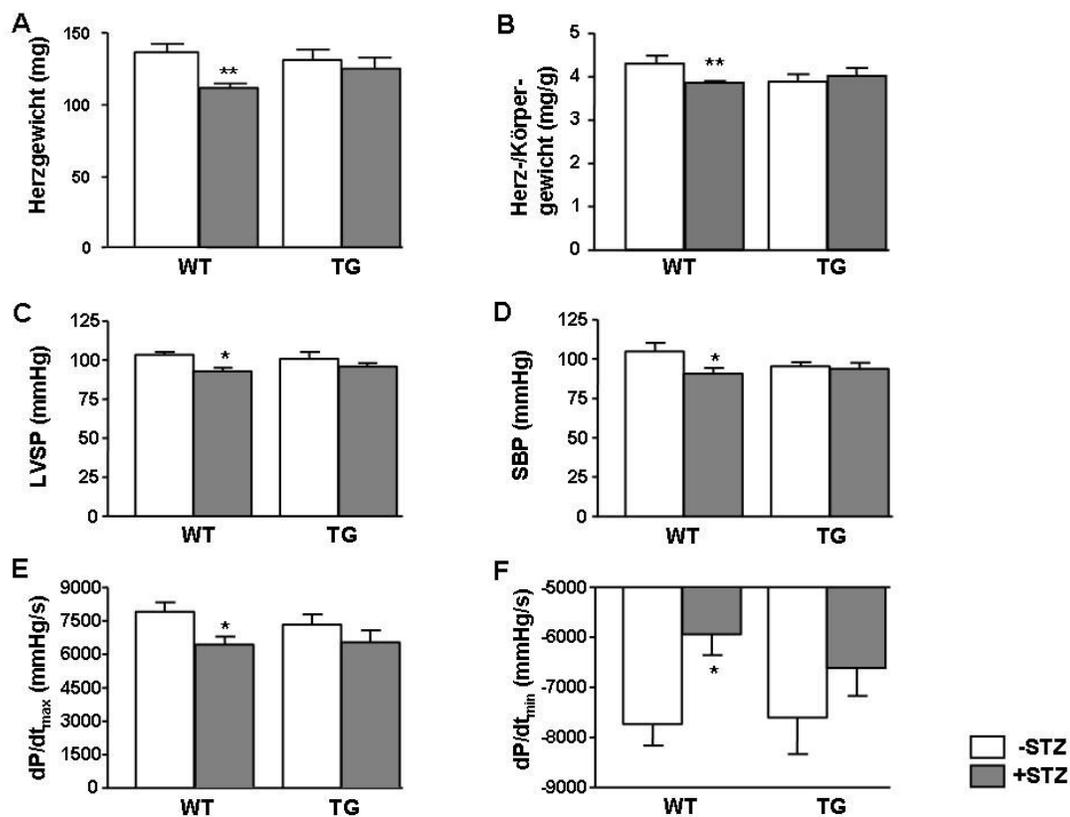


Abbildung 3.27: Herz-spezifische Parameter in diabetischen und nicht diabetischen Mäusen.

Sechs Wochen nach Injektion von Citratpuffer (-STZ) oder STZ (+STZ) wurde in Wildtyp (WT) und ANT1-transgenen (TG) Mäusen das Herzgewicht bestimmt (A) und das Verhältnis von Herz- zu Körpergewicht berechnet (B). Mittels hämodynamischer Messungen wurden der linksventrikuläre systolische Blutdruck (LVSP, C), der arterielle systolische Blutdruck (SBP, D) und die linksventrikuläre Kontraktilität dP/dt_{max} (E) und Relaxation dP/dt_{min} (F) gemessen. * $p < 0,05$ vs. WT - STZ, $n \geq 7$.

Das absolute Gewicht der Ventrikel war in diabetischen Wildtypen im Vergleich zur nicht diabetischen Kontrollgruppe reduziert (Abbildung 3.27A) und schlug sich in einer Verringerung des Herz:Körpergewicht-Quotienten nieder (Abbildung 3.27B). In diabetischen ANT1-überexprimierenden Mäusen hingegen konnte weder eine Abnahme des absoluten Herzgewichts noch eine Verringerung des Herz:Körpergewicht-Quotienten im Vergleich zur nicht diabetischen Kontrollgruppe festgestellt werden.

Obwohl die Konzentration des Blutzuckers in den diabetischen Tieren beider Genotypen vergleichbar war, war die durch die Hyperglykämie verursachte Einschränkung der Herzfunktion im Vergleich zur nicht diabetischen Kontrollgruppe verschieden (Abbildung 3.27). Der linksventrikuläre systolische Blutdruck (LVSP), ein Marker der Kontraktion des linken Ventrikels, war signifikant niedriger in diabetischen Wildtyp-Mäusen als in nicht diabetischen Wildtyp-Kontrollen, wohingegen die kardiale Überexpression von ANT1 diese Verschlechterung verhindern konnte. Gleiches konnte für den arteriellen systolischen Blutdruck (SBP) gemessen werden, der durch einen hohen Blutzuckerspiegel in Wildtyp-Mäusen signifikant abnahm, sich in hyperglykämischen ANT1-transgenen Tieren jedoch nicht von der Kontrollgruppe unterschied. Der Kontraktilitätsparameter des linken Ventrikels dP/dt_{max} und der Relaxationsparameter dP/dt_{min} waren in diabetischen Wildtyp-Mäusen ebenfalls eingeschränkt, während es keine signifikanten Veränderungen in ANT1-überexprimierenden Tieren im Vergleich zu ihren normoglykämischen Kontrollen gab. Die Überexpression von ANT1 konnte demnach eine Verschlechterung der kardialen Funktion unter hyperglykämischen Bedingungen verhindern.

In Übereinstimmung mit den hämodynamischen Parametern war in Wildtyp-Mäusen die Expression der mRNA des ANP (*atrial natriuretic peptide*), ein molekularer Marker der diabetischen Kardiomyopathie²³⁵, sechs Wochen nach der Induktion des Diabetes massiv erhöht, wohingegen in ANT1-transgenen Mäusen keine signifikanten Veränderungen detektiert wurden (Abbildung 3.28).

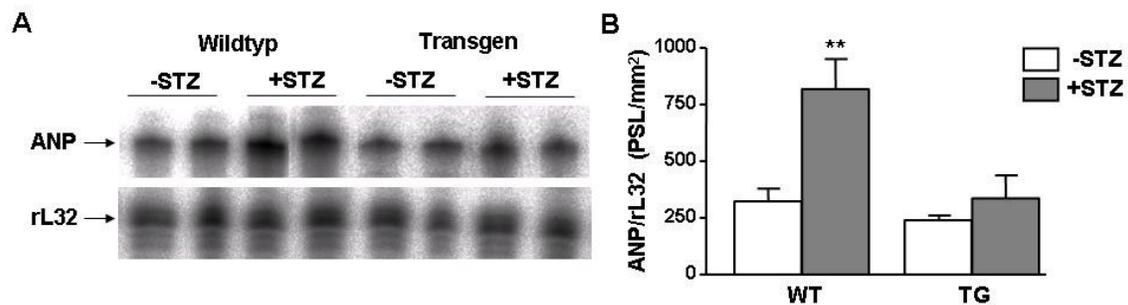


Abbildung 3.28: Molekulare Analyse der diabetischen Kardiomyopathie. (A) RNase protection Assay der ANP (*atrial natriuretic peptide*)-Expression in den Ventrikeln von Wildtyp- (WT) und

ANT1-transgenen (TG) Mäuse sechs Wochen nach der Injektion von STZ (+STZ) oder Citratpuffer (-STZ). (B) Quantifizierung der kardialen ANP-mRNA unter Verwendung der rL32-mRNA als interner Expressionsstandard. ** $p < 0,01$ vs. WT -STZ. PSL: Phosphor-stimulierte Lumineszenz.

Neben dem stark ausgeprägten Anstieg der ANP-mRNA wurde auch für BNP (*B-type natriuretic peptide*), ein verbreiteter Marker des geschädigten Myokards, eine signifikant erhöhte mRNA-Expression in diabetischen Wildtypen, jedoch nicht in hyperglykämischen ANT1-transgenen Mäusen detektiert (nicht abgebildet).

Zusammengefasst konnten wir im murinen Modell der diabetischen Kardiomyopathie kardioprotektive Effekte im Zusammenhang mit einer kardialen ANT1-Überexpression zeigen, die sich vor allem in der Stabilisierung der Herzfunktion äußerten.

4 DISKUSSION

Eine ausreichende Versorgung des Herzmuskels mit Energie ist essentiell für eine uneingeschränkte Herzfunktion. Störungen der mitochondrialen Energieproduktion oder des Transfers von Energiemolekülen innerhalb der Zelle wurden bei Patienten sowie in Tiermodellen in der Entwicklung von Kardiomyopathien belegt^{186, 236}.

Die virale Myokarditis ist eine durch kardiotope Viren verursachte, entzündliche Erkrankung des Herzmuskels, der insbesondere aufgrund der mit ihr assoziierten Folgeerkrankung DCM eine besondere Bedeutung zukommt⁸. Die fortschreitende Verschlechterung der Herzstruktur und Herzfunktion bei DCM-Patienten führt zu einer lebensbedrohlichen Erkrankung²², so dass die DCM eine der Hauptursachen für Herztransplantationen in Deutschland ist und einen beachtenswerten Faktor in der Gesundheitswirtschaft darstellt. Die Faktoren, die nach Abklingen der akuten Myokarditis zu einem chronischen Verlauf beitragen, sind bisher nicht endgültig erschlossen, beinhalten aber den genetischen Hintergrund und immunologischen Status des infizierten Wirts sowie Sequenzen des viralen Genoms^{64, 67}. Zur Analyse der molekularbiologischen, proteinbiochemischen und immunologischen Prozesse im Verlauf der Myokarditis stehen experimentelle Tiermodelle zur Verfügung, bei denen in CVB3-infizierten Mäusen eine in Krankheitsverlauf und Pathologie der humanen sehr ähnliche Myokarditis hervorgerufen werden kann²³. Die Verwendung unterschiedlicher Inzuchtstämme erlaubt es zudem, zwischen dem akuten, ausheilenden Krankheitsverlauf (resistent, z. B. C57BL/6) und dem chronischen Erkrankungsbild (permissiv, z. B. A.SW) zu unterscheiden.

Obwohl bekannt ist, dass der zelluläre Energiestoffwechsel in DCM-Patienten gestört ist^{189, 237}, gibt es diesbezüglich nur wenige Erkenntnisse in der akuten Myokarditis. Hier stellte sich die Frage, ob Modifikationen des Energiestoffwechsels bereits frühe Ereignisse der Myokarditis sind, die chronisch werden und die Entwicklung der Herzinsuffizienz begünstigen, oder ob sie erst mit dem chronischen Verlauf auftreten. In diesem Zusammenhang sollte auch untersucht werden, ob sich die Regulation der mitochondrialen Funktion und der Apoptose im Krankheitsverlauf der Myokarditis zwischen resistenten und permissiven Mausstämmen unterscheidet. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit der mitochondriale Energiestoffwechsel in Herzen mit experimenteller CVB3-Myokarditis untersucht und durch Vergleich zweier Mausstämmen zwischen resistentem und permissivem Mausmodell unterschieden.

4.1 CVB3-Myokarditis-Modell der Maus

Die mitochondriale Funktion im Herzen CVB3-infizierter Mäuse wurde im akuten Stadium der Myokarditis (8 Tage p. i.), nach Abklingen der Erkrankung (28 Tage p. i., nur C57BL/6)

und im Stadium der chronischen Myokarditis (90 Tage p. i., nur A.SW) analysiert. Chow *et al.* beschrieben, dass in Abhängigkeit vom verwendeten Virusstamm 25-100 % der infizierten C57BL/6-Mäuse eine histologisch definierte Myokarditis entwickeln und, ebenfalls virusabhängig, bis zu 30 % der Tiere bis Tag 7 nach der Infektion versterben²⁷. Basierend auf der histologischen Auswertung wurde in unserem Versuch für alle CVB3-infizierte Tiere beider Stämme am Tag 8 nach der Infektion eine akute, von inflammatorischen Infiltraten begleitete Myokarditis nachgewiesen, die von einer geringen Gesamtmortalität von unter 5 % begleitet wurde. Ebenfalls übereinstimmend mit der Literatur^{26, 60, 238} war die kardiale Viruslast in permissiven A.SW-Mäusen deutlich höher als in resistenten C57BL/6-Tieren. Verschiedene Arbeitsgruppen haben bereits gezeigt, dass diese Differenz nicht auf Unterschieden in der viralen Replikation in anderen Geweben basiert, da weder in der Milz, noch im Pankreas oder im Serum Unterschiede in der Viruslast zwischen verschiedenen Inzuchtstämmen gemessen wurden^{60, 238}. Da jedoch die Virusreplikation ein dynamischer Prozess ist, dessen kardiales Maximum zwischen Tag 2 und 4 nach der Infektion erreicht wird, basierten die beobachteten Unterschiede am Tag 8 nach der Infektion möglicherweise auch auf einer ungleichen Effizienz in der Viruseliminierung in resistenten und permissiven Mausstämmen⁶⁰.

Die am Tag 8 nach der Infektion zwischen infizierten C57BL/6- und A.SW-Mäusen auftretenden Unterschiede in der kardialen Viruslast spiegelten sich zunächst nicht im histologischen Bild wider. Beim Vergleich der Mittelwerte von infizierten C57BL/6- und A.SW-Mäusen, wie in Abbildung 3.2 dargestellt, erschien das Ausmaß der kardialen Inflammation bei beiden Stämmen vergleichbar zu sein. Jedoch ließ sich durch eine Korrelationsanalyse eindeutig zeigen, dass beim Vergleich der Einzelwerte jeder Probe ein linearer Zusammenhang zwischen dem viralen Befall des Herzens (mittels *in situ* Hybridisierung) und der Infiltration des Herzgewebes (mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung) besteht ($r=0,613$; $p=0,007$; $n=18$), die in der Literatur manchmal²⁸, jedoch nicht immer^{25, 27}, beobachtet wird.

Der genetische Hintergrund des infizierten Wirts prägt die immunologische Antwort, die sich unter anderem im Cytokinmuster niederschlägt. Zwischen C57BL/6- und A.SW-Mäusen gab es bereits unter nicht infizierten Bedingungen erhebliche Unterschiede in der Expression von IL-1 β und TGF β , die auch 8 Tage nach der Infektion mit CVB3 zu einer deutlich höheren Expression dieser beiden Cytokine in C57BL/6-Mäusen beitrugen. Dahingegen gab es zwischen den beiden Stämmen keine signifikanten Unterschiede in der Expression von TNF α sowie IFN β . Eine Vorinfektion der betroffenen Tiere konnte durch den Vergleich verschiedener, unabhängiger Kontrollgruppen ausgeschlossen werden.

Vergleichende Angaben über Cytokinlevel in resistenten und permissiven Tieren variieren in Abhängigkeit von den verwendeten Mausstämmen und den Zeitpunkten der Messung^{60, 239, 240}. Neben der Menge sind auch die Komposition sowie der Zeitfaktor des Cytokinmusters entscheidend, um die Viruseliminierung zu erzielen und die Entwicklung einer Autoimmunmyokarditis zu vermeiden³²⁵. Für IL-1 β und TNF α gibt es Berichte, dass diese Cytokine in permissiven Stämmen (C3H.HeJ) stärker als in resistenten Stämmen (CD-1) exprimiert wurden²³⁹ und eine Autoimmunmyokarditis in resistenten B10.A-Mäusen förderten²⁴¹. Demgegenüber konnten Leipner *et al.* keine Unterschiede in der Expression von TNF α , IFN γ und IFN β zwischen C57BL/6- und BALB/c-Mäusen, die sich in der Viruseliminierung unterschieden, nachweisen⁶⁰. Zudem wird die Expressionsstärke relativiert durch die Möglichkeit der posttranslationalen Regulation wie sie beispielsweise für TGF β gezeigt wurde²⁴². Die Angaben zu diesem Aspekt sind insgesamt uneinheitlich, was in Anbetracht der Individualität isolierter Inzuchtstämme nicht verwundert. Der immunologische Status eines Versuchstieres ist nicht nur abhängig vom genetischen Hintergrund des Stamms, sondern auch von Umweltfaktoren wie beispielsweise Stress, Ernährungs- und Haltungsbedingungen sowie dem Hygienestatus. Insofern müssen Tiere aus eigener Zucht, im Gegensatz zu denen von internationalen Distributoren kommerziell erworbenen Tieren, als ein eigenständiger, isolierter Inzuchtstamm mit sich unterscheidenden Eigenschaften gelten, die desto stärker ausgeprägt sind, je länger er vom Ursprungsstamm getrennt ist. In unseren Experimenten wurden die Tiere beider Stämme über mehrere Generationen unter den gleichen Bedingungen gehalten, so dass sie sich für vergleichende Studien eigneten.

Zusammengefasst beeinflusste der genetische Hintergrund des Wirts die immunologische Antwort in Reaktion auf die Virusinfektion. Gleichzeitig wurden Unterschiede in der kardialen Viruslast beobachtet, die auf Unterschieden in der viralen Replikation und/oder der Viruseliminierung basierten.

4.2 Die mitochondriale Funktion im Mausmodell der CVB3-Myokarditis

4.2.1 Energieproduktion über die Atmungskette

Die mitochondriale Energieproduktion beeinflusst zahlreiche zelluläre Prozesse und ihre Regulation unterscheidet sich, wie unsere Versuche zeigten, erheblich in den beiden Myokarditis-Modellen der Maus. In unserem Experiment wurde in resistenten C57BL/6-Mäusen eine asynchrone Regulation der Atmungskettenkomplexe beobachtet, die durch die vorübergehend erhöhte Aktivität der Komplexe I und III bei gleichzeitig verringerter Aktivität der Komplexe II und IV in der frühen (4 d p. i.) und akuten (8 d p. i.) Myokarditis charakterisiert war. Demgegenüber stand die umfassende Herunterregulation aller

Atmungskettenkomplexe in CVB3-infizierten permissiven A.SW-Mäusen, die beim Komplex I bis ins chronische Stadium fortbestand.

Die Veränderungen der Atmungskettenaktivität lagen in unseren Versuchen zwischen 20-50 %. In diesem Zusammenhang ist bei der Analyse von Gewebe zu beachten, dass im CVB3-infizierten Herzen nicht alle Zellen und nicht alle Mitochondrien einer Zelle gleichermaßen von der Infektion und der Reaktion des Immunsystems betroffen sind. Daher ergibt die Analyse stets einen Mittelwert, gebildet aus stark betroffenen Zellen, nicht betroffenen Zellen und den Intermediaten, der abhängig ist vom Mengenverhältnis dieser Zellen in einer gegebenen Probe. In stark betroffenen Arealen des infizierten Herzens dürfte die tatsächliche Beeinträchtigung noch stärker sein als es der angegebene Wert wiedergibt.

Die Regulation der Komplex I-Aktivität in der Myokarditis konnte durch Expressionsuntersuchungen mittels massenspektrometrischer Analyse untermauert werden. Hierbei waren 11 der 45 bekannten Untereinheiten in den Herzen infizierter C57BL/6-Mäuse höher als in A.SW-Tieren exprimiert, wobei es sich bei den detektierten Untereinheiten zum überwiegenden Teil um akzessorische Proteine handelte, die keine direkte katalytische Funktion besitzen ²⁴³. Allerdings wurden für NDUFA1, NDUFA2, und NDUF5 Mutationen beschrieben, die die Funktion des Komplexes I beeinträchtigen und somit die funktionale Relevanz dieser Untereinheiten demonstrieren ²⁴⁴. Für verschiedene Untereinheiten, u. a. das Komplex I-Montageprotein Mimitin, wurde *in vitro* eine IL-1 β -abhängige Induktion beschrieben ^{245, 246}, die die in unserem Experiment aufgezeigte Verknüpfung der Komplex I-Aktivität mit der Expression von IL-1 β stützt. In A.SW-Mäusen waren sowohl die Expression der Untereinheiten des Komplexes I als auch die Aktivität geringer als im C57BL/6-Stamm und die Reduktion der Aktivität blieb auch über die akute Phase hinaus bestehen. Damit übereinstimmend wurde für ebenfalls permissive A/J-Mäuse nach CVB3-Infektion eine Herunterregulation der Transkripte mehrerer Untereinheiten des Komplexes I beschrieben ²⁴⁷. Darüber hinaus wurde ein Komplex I-Mangel in Patienten mit verschiedensten klinischen Diagnosen, die mit schwerer Kardiomyopathie assoziiert waren, verknüpft ²⁴⁴ und könnte auch im Rahmen einer Myokarditis zur Herzinsuffizienz beitragen.

Die Aktivität der Komplexe II und IV war sowohl im resistenten als auch im permissiven Mausstamm in der frühen und/oder akuten Phase der Myokarditis reduziert. In beiden Stämmen normalisierte sich die Aktivitätshöhe bis zum Versuchsende, jedoch war die Normalisierung von Komplex IV in C57BL/6-Mäusen im Vergleich zu A.SW-Mäusen bereits in der akuten Phase abgeschlossen. Auch hier bestätigen *in vitro* Studien den Einfluss spezifischer Cytokine wie TNF α auf die Aktivität der Atmungskettenkomplexe. So ließen sich nach TNF α -Inkubation Phosphorylierungen an Untereinheiten der

Atmungskettenkomplexe wie an Komplex IV nachweisen, die die Aktivität senkten²⁴⁸⁻²⁵⁰. Bereits 1989 belegten Lancaster *et al.*, dass TNF α die Aktivität der Atmungskettenkomplexe II und IV einschränkt²⁵¹ und in Kardiomyozyten wurde eine Reduktion der gesamten Atmungskettenaktivität gezeigt²⁵². Infolge der Störung der Elektronentransportkette durch TNF α kommt es über oxidative Modifikationen zu Veränderungen der Membranpermeabilität²⁵³.

Ein weiteres Cytokin, dem eine Beteiligung an der Regulation der Atmungskettenaktivität zugeschrieben wurde, ist IFN β , dessen Expression in unserem Versuch mit der Aktivität der Komplexe I, II und IV verknüpft war. IFN β hat einen allgemeinen entkoppelnden Effekt auf die Atmungskette und bereits 1961 basierte Isaacs den antiviralen Effekt der Interferone auf der Inhibierung der viralen Replikation durch Energieentzug²⁵⁴. Zahlreiche Studien haben seither die therapeutische, antivirale Wirkung der Interferone bestätigt^{48, 255, 256}. Obwohl sich in unserem Versuch der entkoppelnde Effekt des IFN β auf die Atmungskette zu bestätigen schien, konnten wir in CVB3-infizierten A.SW-Mäusen trotz hoher IFN β -Expression und niedriger Atmungskettenaktivität einen höheren kardialen Virustiter im Vergleich zu C57BL/6-Tieren messen. Dieser vermeintliche Widerspruch zum antiviralen Effekt ist möglicherweise durch den zeitlichen Faktor erklärbar, da die Virusvermehrung, deren Maximum um Tag 3 nach der Infektion liegt, der IFN β -Expression, mit einem Maximum um Tag 7 nach der Infektion⁶⁰, vorausgeht und diese erst induziert. Eine hohe Viruslast im infizierten Herzen würde somit eine starke IFN β -Antwort erst auslösen, wie wir mittels Korrelationsanalyse verdeutlichen konnten (*in situ* Hybridisierung: $r=0,717$, $p<0,05$; Plaque-Assay: $r=0,538$, $p=0,071$).

Durch Cytokine hervorgerufene Effekte basieren insbesondere im Gesamtorganismus auf einer Vielzahl synergistischer Effekte, die durch zwei oder mehr Cytokine hervorgerufen werden können, sowie antagonistischer Effekte verschiedener Cytokine. Die spezifische Zuordnung einzelner Cytokine zu den hier beschriebenen Effekten erfordert weitere, detailliertere Untersuchungen unter Verwendung isolierter Kardiomyozytenkulturen.

Für die Komplexe II, III und IV wurden keine Übereinstimmungen zwischen den Aktivitätsmessungen und den massenspektrometrisch erhobenen Expressionsdaten gefunden. Am Tag 8 nach der Infektion war die Aktivität dieser Komplexe in C57BL/6-Mäusen höher als im A.SW-Stamm, jedoch war die Expression einzelner Untereinheiten signifikant niedriger. Es gibt mehrere Ansätze, um diese Diskrepanz zu erklären. Zum einen wurden in der massenspektrometrischen Analyse nur für wenige Untereinheiten der Multiproteinkomplexe der Atmungskette Veränderungen festgestellt. Mit Ausnahme von SDHC (Komplex II) und UQCRFS1 (Komplex III) wird keiner dieser Untereinheiten eine katalytische Funktion innerhalb ihres Komplexes zugeschrieben, so dass die Aktivität des Komplexes von der Expressionsänderung tatsächlich unbeeinflusst bleiben kann.

Zudem können einzelne Untereinheiten der Multiproteinkomplexe vor der Infektion im Überschuss vorliegen, so dass eine geringfügige Abnahme des Proteins sich nicht auf die Funktion des Komplexes auswirken würde. Zum anderen kann die Aktivität von Enzymen auch durch Modifikationen, wie Phosphorylierungen, beeinflusst werden, die für alle Komponenten der oxidativen Phosphorylierung einschließlich kleiner Elektronen-Carrier wie Cytochrom c beschrieben wurden²⁴⁹. Der höheren Expression in A.SW-Tieren im Vergleich zu C57BL/6-Mäusen lag somit möglicherweise ein kompensatorischer Effekt zugrunde, der einer Inhibierung der Aktivität, wie wir sie in den A.SW-Tieren beobachtet haben, entgegenwirken sollte.

4.2.2 Der ANT im resistenten und permissiven Modell der CVB3-Myokarditis

Der ANT, der die mitochondriale Energieproduktion mit dem cytosolischen Energieverbrauch verbindet und einen regulatorischen Einfluss sowohl auf die oxidative Phosphorylierung^{121, 122} als auch die mitochondriale Apoptose ausübt^{102, 149}, ist von entscheidender Bedeutung für die mitochondriale Funktion.

Im Tiermodell der CVB3-Myokarditis wurde die ANT1-Isoform in Abhängigkeit vom genetischen Hintergrund unterschiedlich reguliert. In resistenten C57BL/6-Mäusen war die ANT1-Expression bereits am Tag 4 nach der Infektion langanhaltend, auf RNA-Ebene bis Tag 28 nach der Infektion, erniedrigt. In permissiven A.SW-Mäusen hingegen war keine Herunterregulation zu beobachten, vielmehr konnte eine tendenzielle Erhöhung des ANT1-Transkripts festgestellt werden, die sich allerdings nicht auf Proteinebene nachweisen ließ. Weitere Hinweise auf eine gegenüber C57BL/6-Tieren höhere ANT1-Expression in permissiven Mäusen lieferten Infektionsversuche mit SWR-Mäusen, bei denen 5, 13 und 28 Tage nach der Infektion eine signifikante Erhöhung der ANT1-Expression nachgewiesen werden konnte, die sowohl auf RNA- als auch Protein-Ebene bestand (nicht publizierte Daten). Auch in Patienten mit Verdacht auf inflammatorische Herzerkrankung konnte gezeigt werden, dass bei Enterovirus-Infektionen die erhöhte ANT1-Expression von einer unterdrückten T-Zell-spezifischen Immunantwort begleitet wird¹⁹⁶, die ebenfalls mit dem permissiven Krankheitsbild assoziiert wird^{218, 257}.

Während es bisher keine Berichte über eine eingeschränkte ANT-Expression in der akuten, humanen Virusmyokarditis gibt, wurde eine erhöhte ANT-Expression in Patienten mit chronischer Myokarditis und DCM beschrieben¹⁹⁴. In Patienten war die Expressionszunahme des Proteins begleitet von einer Abnahme der ANT-Aktivität, die auf eine Verschiebung des kardialen ANT-Isoformmusters zurückzuführen war, so dass das Verhältnis von ANT1 zu ANT2 in Richtung der langsameren ANT1-Isoform verschoben wurde^{194, 195, 258}. Ein vergleichbarer Isoform-Shift wurde im murinen Myokarditis-Modell nicht festgestellt. Die Abnahme des mitochondrialen ANT-Proteins in CVB3-infizierten

C57BL/6-Mäusen basierte auf der Herunterregulation des ANT1. Dahingegen blieb der ANT2 sowohl im permissiven als auch im resistenten Stamm im Verlauf der Myokarditis unverändert und wurde nicht durch die Expressionsveränderungen des ANT1 beeinflusst. Die Regulation der ANT1-Expression konnte *in vivo* mit der IL-1 β -Expression korreliert werden. Dieser Zusammenhang wurde in isolierten Kardiomyozyten bestätigt, da diese nach Inkubation mit IL-1 β signifikant weniger ANT1-mRNA als unbehandelte Zellen exprimierten. Andere stoffwechselrelevante Cytokine, wie IFN β , TGF β oder TNF α , hatten *in vitro* keinerlei Auswirkungen auf die ANT1-Expression.

4.2.3 Der Energietransfer über das Creatinkinase-System

Die CK, die den Transport energiereicher Phosphate von den Mitochondrien zum kontraktilen Apparat ermöglicht und aus diesem Grund von zentraler Bedeutung für die Erhaltung der kontraktilen Funktion des Herzens ist ^{186, 259}, wird in den beiden hier untersuchten Tiermodellen der Myokarditis ebenfalls unterschiedlich reguliert.

Die Aktivität der mitochondrialen CK ist in der akuten Myokarditis sowohl in C57BL/6- als auch A.SW-Mäusen stark reduziert, woraus eine Beeinträchtigung des Energietransfers und des zellulären Energiehaushalts resultiert. Eine vergleichbare Regulation konnten wir in CVB3-infizierten Mäusen des permissiven SWR-Stamms beobachten, bei denen die Abnahme der Aktivität der mitochondrialen CK nicht durch eine Abnahme der Expression verursacht wurde, sondern höchstwahrscheinlich durch Modifikation des aktiven Zentrums des Enzyms hervorgerufen wurde ²¹⁵. In SWR-Mäusen wurde die Regulation der CK mit intrazellulären Effekten, die mit der IL-1 β - und TNF α -Expression assoziiert sind, verknüpft ²¹⁵ und auch in C57BL/6- und A.SW-Mäusen konnte die Assoziation zwischen der mitochondrialen CK und TNF α ($r=0,63$, $p<0,001$) bestätigt werden.

Die mitochondriale CK ist stark anfällig für oxidative Modifikationen ¹⁸⁹, verursacht durch vermehrte Radikalbildung, die in humaner und muriner Myokarditis beschrieben wurde ²⁶⁰⁻²⁶³. Auch in unserem Versuch wurde eine Aktivierung des antioxidativen Systems und eine Zunahme des oxidativen Stresses in C57BL/6-Mäusen beobachtet. In *in vitro* Experimenten verursachte die Inkubation von Kardiomyozyten mit TNF α eine Zunahme des oxidativen Stresses und der zellulären Apoptose ²⁶⁴. Gleichzeitig wurde eine Herunterregulation der CK ²⁶⁵ und eine kontraktile Dysfunktion beobachtet ²⁶⁶⁻²⁶⁹. *In vivo*, unter Verwendung einer TNF α -transgenen Maus, wurden ebenfalls eine Abnahme der mitochondrialen CK und der oxidativen Phosphorylierung sowie eine Erhöhung der Schädigung der mtDNA mit einhergehender Veränderung der Ultrastruktur der Mitochondrien gemessen ²⁵².

Darüber hinaus gibt es Berichte, die die mitochondriale CK über die mPTP mit der Apoptose verknüpfen ^{270, 271}, wobei auch die funktionale Kopplung mit dem ANT eine Rolle

spielt^{100, 270, 272}. Interessanterweise wurde in infizierten C57BL/6-Tieren die reduzierte Aktivität der mitochondrialen CK von einer geringen ANT1-Expression und einer starken apoptotischen Reaktion begleitet. In A.SW-Tieren hingegen wurde zwar eine reduzierte CK-Aktivität gemessen, jedoch kann diese nicht auf den gleichen, ROS-abhängigen Mechanismus zurückgeführt werden, da in infizierten Herzen der permissiven Mäuse keine verstärkte Lipidperoxidation stattfand. Dennoch war auch hier das antioxidative System aktiviert, so dass möglicherweise andersartige oder geringgradige, nicht detektierte oxidative Prozesse im Gang waren. Darüber hinaus kam es in infizierten permissiven Mäusen nicht zur Reduktion der ANT1-Expression und die Induktion der mitochondrialen Apoptose blieb ebenfalls aus.

Demgegenüber ist die Aktivität der cytosolischen CK in virusinfizierten C57BL/6-Mäusen unverändert, jedoch in Mäusen des A.SW- und SWR-Stamms in der akuten Myokarditis sowohl in der Expression als auch der Aktivität eingeschränkt. Zahlreiche Studien belegen die Regulation der cytosolischen CK durch vielfältige zelluläre Signale, wie beispielsweise Differenzierung, Proliferation und Tumorwachstum²⁷³. Spindler *et al.* konnten anhand von mtCK-*knock out*-Mäusen zeigen, dass lediglich die mitochondriale CK essentiell ist, um energiereiche Phosphate in der Zelle auf einem normalen Niveau zu halten^{274, 275}, wohingegen die Deletion der cytosolischen M-CK keine gravierenden Mängel hervorrief.

Zusammenfassend ist gezeigt worden, dass in der akuten Phase der viralen Myokarditis die Atmungskette, der ANT und das CK-System stammabhängig stark reguliert wurden. Diese Regulation steht im Zusammenhang mit der Expression stoffwechselrelevanter Cytokine. Weiterführende Experimente unter Verwendung zusätzlicher Inzuchtstämme und in der Zellkultur sind nötig, um diese Zusammenhänge zu spezifizieren und synergistische sowie antagonistische Effekte zu beleuchten.

Darüber hinaus kann nicht ausschließlich nur der Wirtsorganismus regulatorische Prozesse bewirken, sondern auch das Virus selbst. Zahlreiche Viren interagieren mit mitochondrialen Komponenten, um die zelluläre Apoptose zu modifizieren und beeinflussen so primär oder sekundär die mitochondriale Funktion. Polioviren, ebenfalls Enteroviren, sowie Herpesviren (HHV1) inhibieren den Elektronentransport an Komplex II^{180, 276}, während die Infektion mit Influenzavirus zum Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials führt²⁷⁷. Die Interaktion des Hepatitis-C-Virus mit Mitochondrien wurde mit einer Kardiomyopathie assoziiert²⁷⁸. Für CVB3 selbst wurde bereits gezeigt, dass sein VP2-Protein mit dem proapoptotischen Protein Siva interagiert⁵¹. Daneben wurden auch für die meisten anderen Struktur- und Nichtstrukturproteine der Picornaviren pro- (VP1, VP2, VP3, 2A, 2C und 3C) und antiapoptotische (2B und 3A) Effekte beschrieben²⁷⁹.

4.3 Apoptose und oxidativer Stress im CVB3-Myokarditis-Modell

4.3.1 Das antioxidative Stress-System in resistenten und permissiven Mausstämmen

Ein Ungleichgewicht in der Atmungskette ist häufig verbunden mit der Erhöhung des zellulären oxidativen Stresses und der Induktion von Apoptose²⁸⁰. In CVB3-infizierten C57BL/6-Mäusen, die durch eine asynchrone Regulation der Atmungskette mit erhöhter Aktivität der Komplexe I und III charakterisiert waren, wurde anhand der Expression der proapoptotischen Marker Bax und Caspase-3 eine starke Induktion des apoptotischen Prozesses gezeigt. Die Komplexe I und III sind Hauptproduzenten der ROS²⁸¹⁻²⁸³. An ihnen können Elektronen direkt auf molekularen Sauerstoff (O_2) übertragen werden und Superoxid-Anionen ($\cdot O_2^-$) sowie Wasserstoffperoxid (H_2O_2) entstehen. Dies geschieht insbesondere dann, wenn, wie in C57BL/6-Mäusen zu beobachten ist, nachfolgende, elektronenakzeptierende Komplexe in ihrer Aktivität eingeschränkt sind. H_2O_2 kann mitochondriale Proteine modifizieren und die mitochondriale Integrität beeinträchtigen, so dass apoptotische und nekrotische Prozesse ausgelöst werden²⁸⁴. Zu den positiven Effekten des erhöhten oxidativen Stresses zählt die Eliminierung der virusinfizierten Zelle durch die ROS-induzierte Apoptose^{263, 285}. Darüber hinaus kann H_2O_2 in die unmittelbar infektionsgefährdeten Nachbarzellen diffundieren und durch präventive Induktion der Apoptose die Eindämmung der Infektion und die Eliminierung des Virus fördern²⁸⁶.

In Hepatozyten förderte TGF β die Produktion von ROS und den Zelltod mittels Herunterregulation antioxidativer Gene wie Catalase, Glutathion-Peroxidase und Superoxid-Dismutase 2²⁸⁷. Damit übereinstimmend konnten wir in Herzen CVB3-infizierter C57BL/6-Mäusen eine erhöhte TGF β -Expression bei gleichzeitig geringer Catalase-Expression und starker Apoptose nachweisen. Die Korrelation zwischen der TGF β -Expression und der Aktivität des ROS-produzierenden Komplexes III bot hier ebenfalls einen Hinweis auf die mögliche Assoziation von TGF β und dem oxidativen Stress in infizierten Kardiomyozyten. In Kombination mit der ungleichen Regulation der antioxidativen Enzyme MnSOD2 und Catalase, die eine Akkumulation von H_2O_2 zur Folge hat, kann dies zu einer Erhöhung des oxidativen Stresses und einer Verstärkung der Apoptose beitragen²⁸⁸. Tatsächlich konnten wir zeigen, dass in CVB3-infizierten C57BL/6-Mäusen, die zelluläre Schädigung durch Lipidperoxidation erhöht war und mit einer Aktivierung der mitochondrialen Apoptose einherging. Korrelationsanalysen unterstützten diese Überlegungen, da ein niedriger kardialer Virustiter assoziiert war mit einer hohen TGF β -Expression ($r=-0,75$, $p<0,01$, nicht abgebildet), einer hohen Aktivität der ROS-produzierenden Komplexe I und III, einer niedrigen Expression des antioxidativen Enzyms Catalase sowie einer erhöhten Expression der Effektor-Caspase Caspase-3. Die in C57BL/6-Mäusen nachgewiesene

stark reduzierte Viruslast stimmt somit überein mit dem in TGF β -transgenen Mäusen beschriebenen antiviralen Effekt dieses Cytokins²⁸⁹.

Esposito *et al.* berichteten zudem von einer Erhöhung der ROS, insbesondere H₂O₂, in ANT1-*knock out* Mäusen¹⁹⁹. Diese Beobachtungen wurden kürzlich von einer anderen Arbeitsgruppe bestätigt, die gezeigt hat, dass das *Silencing* von ANT1 durch eine siRNA oxidativen Stress und den programmierten Zelltod in Glioblastomzellen induziert. Die Autoren beschreiben, dass eine Reduktion der ANT1-Dichte unter einen physiologischen Schwellenwert fundamentale Funktionen des ANT1, wie die Entkoppler-Funktion, beeinträchtigt und somit den Zelltod auslöst²⁹⁰. Ein vollständiger Mangel an ANT1 und auch eine teilweise Einschränkung der ANT1-Expression, wie wir sie in CVB3-infizierten C57BL/6-Mäusen festgestellt haben, ist somit mit der Aktivierung des antioxidativen Systems und erhöhtem oxidativen Stress assoziiert.

Demgegenüber war in CVB3-infizierten A.SW-Mäusen die umfassende Herunterregulation der Atmungskettenkomplexe zwar von Veränderungen des antioxidativen Systems begleitet, die sich gleichwohl konträr zum resistenten Stamm verhielten, ging jedoch weder einher mit verstärkter Lipidperoxidation noch mit der Induktion proapoptotischer Marker wie Bax und Caspase-3 oder auch TGF β . Da zudem der kardiale Virustiter deutlich höher als in C57BL/6-Mäusen war, scheint in permissiven Mäusen eine Viruseliminierung über diesen Mechanismus nicht stattzufinden. In ischämischen *Preconditioning*-Experimenten wurde gezeigt, dass eine Herunterregulation des Komplexes I und eine hohe Catalase-Expression, wie hier in infizierten permissiven A.SW- sowie SWR-Mäusen zu beobachten, eine kardioprotektive Wirkung hat^{291, 292}. Zusätzlich kann die Verringerung der Aktivität eine geringe Entkopplung der Atmungskette bewirken, die den Elektronenfluss über die Atmungskette reduziert, die Entstehung und Akkumulation von ROS verhindert und so einen Schutz vor der oxidativen Schädigung der Zelle und des Gewebes herstellt^{293, 294}. In diesem Zusammenhang ist es erwähnenswert, dass auch eine hohe Expression von ANT1, wie sie in A.SW- und SWR-Tieren beobachtet wurde, entkoppelnd auf die Atmungskette wirkt³²⁶. Des Weiteren berichteten Sanchez-Alcazar *et al.*, dass die Blockade der Atmungskette zu einer Herunterregulation des TNF-Rezeptors führte und über diesen Mechanismus die TNF α -induzierte Cytotoxizität verhinderte²⁹⁵. Somit ergibt sich der Eindruck, dass in permissiven Stämmen das Virus davon profitierte, dass möglicherweise nicht die Viruseliminierung im Vordergrund stand, sondern der Schutz des infizierten Herzens vor der strukturellen Schädigung, die durch eine übermäßige Apoptose verursacht werden kann.

4.3.2 Die Apoptose in resistenten und permissiven Mausstämmen

Basierend auf ihrem genetischen und immunologischen Status versuchten CVB3-infizierte C57BL/6- und A.SW-Tiere offenbar auf unterschiedlichem Wege der Infektion beizukommen. Der resistente Stamm trägt durch eine immunvermittelte, massive Aktivierung der Apoptose zur schnellen und vollständigen Viruseliminierung bei. Im Gegensatz dazu wurde in permissiven Tieren die Apoptose unterdrückt, möglicherweise um das Herz vor Schädigung zu schützen, was jedoch zu einer erhöhten Viruslast im Herzen führte.

In CVB3-infizierten C57BL/6-Mäusen waren proapoptotische Marker wie eine hohe Bax-Expression und ein erniedrigtes Bcl-2/Bax-Verhältnis bereits am Tag 4 nach der Infektion erhöht und gingen später mit einer Erhöhung der Caspase-3 Expression einher. Im Verlauf der akuten Infektion wurde auch die gegensteuernde Bcl-2-Expression erhöht, die das Bcl-2/Bax-Verhältnis wieder ausglich. Die antiapoptotischen Prozesse waren bis Tag 28 nach der Infektion noch nicht abgeschlossen. In einer aktuellen Publikation beschreiben Won *et al.*, dass die Einschränkung der ANT-Funktion mit der Öffnung der mPTP, erhöhtem oxidativen Stress und der Induktion der Apoptose verbunden ist²⁹⁶. Dieser Zusammenhang stimmt mit der in CVB3-infizierten C57BL/6-Mäusen nachgewiesenen zeitgleichen Abnahme der ANT1-Expression und Zunahme apoptotischer Prozesse überein. Die Abnahme der ANT1-Expression war zudem *in vitro* und *in vivo* mit IL-1 β verknüpft, das sich nachweislich auf die Induktion von Apoptose und die Dysfunktion des Herzens auswirkt²⁹⁷.

In A.SW-Mäusen unterschied sich die Expression von Bax und Bcl-2 sowie des proapoptotisch und antiviral wirkenden TGF β am Tag 8 nach der Infektion nicht von nicht infizierten Tieren und gleichzeitig wiesen Tiere des permissiven Stamms einen signifikant höheren Virustiter als C57BL/6-Mäuse auf. Die geringfügig erhöhte Caspase-3-Expression, die in A.SW-Tieren mit akuter Myokarditis festgestellt wurde, ist möglicherweise auf extrinsische Apoptosesignale ohne Beteiligung der Mitochondrien zurückzuführen. Denkbar wäre auch eine direkte Induktion durch das Virus selbst, jedoch ist die virusvermittelte Apoptose nicht Caspase-3-abhängig und läuft über einen Caspase-unabhängigen cytopathischen Effekt^{327, 328}. Das Fehlen apoptotischer Prozesse in akut CVB3-infizierten A.SW-Mäusen stimmt überein mit Berichten über eine stammabhängige Induktion der Apoptose anderer Arbeitsgruppen^{298, 299}, bei denen in permissiven C3H.HeJ-Mäusen keine und in A.SW-Mäusen deutlich weniger kardiale Apoptose als in resistenten Stämmen stattgefunden hat. Auch Huber *et al.* verglichen die Apoptose im infizierten Myokard von drei verschiedenen Mausstämmen. Dabei wurden in DBA/2-Mäusen keine apoptotischen Zellen entdeckt, in MRL- Herzen war die Apoptose auf die zellulären Infiltrate beschränkt und in BALB/c-Tieren waren große Flächen des infizierten

Herzen von der Apoptose betroffen. Dennoch waren alle Stämme im gleichen Ausmaß von der Inflammation des Herzens betroffen⁷². In der späten Phase der Infektion entstand in A.SW-Tieren durch die singular eingeschränkte Komplex I-Aktivität ein Ungleichgewicht in der Atmungskette, das mit einer Zunahme der Expression apoptoserelevanter Marker wie Bax, Bcl-2 und TGF β sowie einer Abnahme der Pro-Caspase-3 einherging. Die reduzierte Expression der Pro-Caspase-3 und das ausgeglichene Bcl-2/Bax-Verhältnis deuteten jedoch auf abklingende apoptotische Prozesse hin, die den geringgradigen, chronischen Prozess charakterisieren. Dass die myokardiale Apoptose nicht ausschließlich ein Merkmal des akuten sondern auch des chronischen Stadiums der Infektion ist, hat Venteo kürzlich in Patienten mit Myokarditis als auch DCM nachgewiesen³⁰⁰.

Darüber hinaus muss unterschieden werden, welche Zelltypen des infizierten Herzens apoptotisch waren. Die zwei großen Gruppen sind zum einen die Kardiomyozyten, die durch die direkte virusinduzierte Apoptose und durch die immunvermittelte Apoptose zugrunde gehen können und zum anderen die im Zuge der immunologischen Antwort eingewanderten Zellen des Immunsystems, die beim Abklingen der Inflammation apoptotisch werden²⁹⁹. In CVB3-infizierten C57BL/6-Tieren konnte die frühe Apoptose vor allem auf Kardiomyozyten zurückgeführt werden, da bereits am Tag 4 nach der Infektion eine deutliche Induktion der Apoptose nachgewiesen werden konnte, jedoch zu diesem Zeitpunkt nur wenige Immunzellen im Herzen vorhanden waren. In der akuten Myokarditis basierte die Apoptose sowohl in C57BL/6 als auch in A.SW-Mäusen auf dem zeitgleichen Absterben infiltrierter Immunzellen. Aufgrund des Fehlens von Immunzellen am Tag 90 nach der Infektion ging die späte Apoptose wahrscheinlich wieder von Kardiomyozyten aus. Zusätzlich können sowohl in resistenten als auch permissiven Mausstämmen nekrotische Prozesse eine Rolle gespielt haben³⁰¹.

Zusammengefasst beeinflusste die Modifikation der Atmungskettenkomplexe die Integrität der Mitochondrien, woraus weitreichende Konsequenzen für die infizierte Zelle und die viralen Invasoren entstanden. Dabei versuchten C57BL/6- und A.SW-Tiere auf unterschiedliche Weise der Infektion zu begegnen. Während resistente C57BL/6-Mäuse oxidativen Stress zur apoptotischen Viruseliminierung nutzten, wurde er von permissiven A.SW-Tieren bekämpft und die Apoptose unterdrückt.

Die in resistenten C57BL/6-Mäusen beobachtete, starke apoptotische Antwort ist auch in Patienten mit einer hohen Heilungsrate verbunden, mit der Annahme, dass die Apoptose eine durch das Immunsystem ausgelöste Eliminierung des Virus und der infizierten und/oder beschädigten Zellen unterstützt³⁰². Demgegenüber stehen Berichte, die, in Übereinstimmung mit dem permissiven A.SW-Mausmodell, eine eingeschränkte,

Mitochondrien-abhängige Apoptose auch in Patienten mit Myokarditis und DCM beschrieben haben^{302, 303}. Zudem konnte gezeigt werden, dass bei Enterovirus-Infektionen, vor allem bei Patienten mit Verdacht auf inflammatorische Herzerkrankung, die erhöhte ANT1-Expression von einer unterdrückten T-Zell-spezifischen Immunantwort begleitet wird¹⁹⁶, die ebenfalls mit dem permissiven Krankheitsbild assoziiert wird^{218, 257}. Daher könnte die koordinierte Analyse von Myokarditis-Patienten in Hinblick auf den Immunstatus, die Viruspräsenz und die intrazellulären Bedingungen nicht nur die Diagnose, sondern auch die Prognose unterstützen und möglicherweise mitochondriale Ziele für medizinische Intervention aufzeigen.

4.4 ANT1-Überexpression in kardialen Erkrankungen

Beim Vergleich von akut CVB3-infizierten, resistenten C57BL/6- und permissiven A.SW-Mäusen wurden im Rahmen dieser Arbeit Unterschiede in der Regulation des mitochondrialen Energiestoffwechsels und der zellulären Apoptose festgestellt. Der ANT ist durch seine Funktion als ADP/ATP-Austauscher und als regulatorische Komponente der mPTP sowohl in den Energiestoffwechsel als auch den Apoptoseprozess eingebunden³⁰⁴. Durch eine Reihe von *Preconditioning*-Experimenten sowie durch unsere Arbeiten mit dem hypertonen Rattenmodell ist gezeigt worden, dass eine stabile, hohe ANT1-Expression mit kardioprotektiven Effekten assoziiert ist^{204, 206, 207, 305, 306}. Im murinen Myokarditis-Modell hingegen war die geringere kardiale Viruslast in CVB3-infizierten C57BL/6-Tieren im Vergleich zu A.SW-Tieren von einer starken Abnahme der ANT1-Expression begleitet, die im permissiven Mäusen nicht stattfand. Daher war für uns von Interesse, welche Bedeutung die ANT1-Expression in der CVB3-Myokarditis hat. Zu diesem Zweck wurde ein herzspezifisch ANT1-transgener C57BL/6-Mausstamm im CVB3-Myokarditis-Modell verwendet, um die Auswirkungen einer künstlich erzeugten, hohen ANT1-Expression auf den mitochondrialen Energiestoffwechsel, die Apoptose und die Virusreplikation im resistenten Tiermodell zu überprüfen.

Darüber hinaus sollte unter Verwendung des STZ-induzierten Diabetes-Modells geklärt werden, ob die Auswirkungen der erhöhten ANT1-Expression auf das erkrankte Herz krankheitsspezifisch oder allgemeingültig sind.

4.4.1 Charakterisierung der ANT1-transgenen Maus

Zwei ANT1-transgene Linien, die, basierend auf dem Restriktionsmuster ihrer genomischen DNA, durch unterschiedliche Integrationsorte des Konstrukts charakterisiert waren, wurden basal untersucht. Da bei beiden Linien ein einheitlicher Phänotyp

erkennbar war und eine vergleichbare Überexpression nachgewiesen wurde, wurde die Linie 20 für die weiteren Versuche ausgewählt.

Die ANT1-transgene Maus enthielt 10-12 genomische Kopien des Transgens, die zu einer massiven Zunahme der ANT1-mRNA und einer moderaten Zunahme des ANT-Proteins führten. In den Mitochondrien betrug die Erhöhung des ANT-Proteins 20-30 % und entspricht in etwa unserem anderen Tiermodell der ANT1-transgenen Ratte ²⁰⁴. Da auch die pathologische Erhöhung der ANT-Expression in Myokarditis- und DCM-Patienten in diesem Bereich lag ^{192, 194}, besteht hier möglicherweise eine Sättigung der Aufnahmekapazität für das am stärksten vertretene Proteins der inneren mitochondrialen Membran. Der α MHC-Promotor des transgenen Konstrukts steuerte eine herzspezifische Regulation des Transgens in einem 2- bis 3-fachen Umfang der endogenen Expression. Variationen in der 5'-UTR des α MHC-Promotors ²²⁷ resultierten in der Expression unterschiedlich gespleißter Transkripte in ANT1-transgenen Herzen. Zudem hatte die ontogenetische Regulation des α MHC-Gens eine signifikante Zunahme des transgenen Transkripts in den ersten vier Lebenswochen zur Folge ³⁰⁷. Die transgene ANT1-Expression war streng auf das Herz beschränkt, so dass eine Beeinflussung der viralen Replikation außerhalb des Herzens, beispielsweise in Leber, Pankreas, Milz oder dem Gastrointestinaltrakt, ausgeschlossen werden konnte.

Die ANT1-Überexpression im Herzen beeinflusste unter basalen Bedingungen die mitochondrialen Funktionen nicht. In Übereinstimmung mit dem ANT1-transgenen Rattenmodell konnte kein Einfluss auf die Anzahl der Mitochondrien, das CK-System oder verschiedene Apoptose-Marker beobachtet werden. Allerdings wurden in Ratten bei vergleichbarer ANT1-Überexpression deutliche Unterschiede in der Aktivität der Atmungskettenkomplexe festgestellt ²⁰⁴.

Für beide Tiermodelle ließen sich jedoch übereinstimmend Veränderungen der Hämodynamik feststellen, die durch ein erhöhtes Schlagvolumen charakterisiert waren, welches auf ein erhöhtes Kammervolumen im Vergleich zum Wildtyp zurückzuführen ist. Dies bedeutet zum einen eine höhere Pumpleistung und Versorgung des Organismus, zum anderen führt dies zu einer anhaltenden, stärkeren Belastung des Organs, die sich auf Dauer negativ auswirken könnte. Da zu den Untersuchungszeitpunkten im Alter von 8 und 16 Monaten jedoch keine strukturellen Veränderungen des Herzens festgestellt werden konnten (nicht abgebildet) und ANT1-transgene Tiere eine geringere Nachlast als Wildtypen hatten, entstand in diesem Fall kein übermäßiger Druck auf die anderen Organe und keine Benachteiligung durch das erhöhte Schlagvolumen.

Zusammengefasst stand uns hier ein herzspezifisch ANT1-transgenes Mausmodell zur Verfügung, das im etablierten CVB3-Myokarditis-Modell der Maus eingesetzt werden konnte.

4.4.2 Experimentelle ANT1-Überexpression in der CVB3-Myokarditis

Die Validität dieses Versuchs war abhängig von der Beständigkeit der ANT1-Überexpression auch während der Infektion mit CVB3. Taylor *et al.* berichteten, dass die Aktivität des α MHC-Promotors, der die Expression des ANT1 im transgenen Tiermodell steuerte, in der akuten Myokarditis reduziert ist²⁴⁷. Tatsächlich wurde in unserem Versuch in ANT1-überexprimierenden Mäusen eine massive Herunterregulation der ANT1-mRNA, die sich aus endogenen und transgenen Transkripten zusammensetzte, beobachtet, die in ihrem Ausmaß die Abnahme des endogenen Transkripts in infizierten C57BL/6-Wildtypen deutlich überstieg. Trotz dieser starken Regulation war die ANT1-Transkriptmenge in transgenen Tieren zu allen untersuchten Zeitpunkten signifikant größer als in Wildtyp-Tieren und Western Blot Analysen bestätigten, dass der mitochondriale ANT1-Spiegel in transgenen Tieren deutlich höher als in Wildtypen lag und somit die Grundlage für intrazelluläre Effekte während der CVB3-Infektion bilden konnte.

Die erhöhte ANT1-Expression in den kardialen Mitochondrien der transgenen Maus wirkte sich im CVB3-induzierten Myokarditis-Modell insbesondere auf die Viruslast im Herzen der infizierten Tiere aus. In CVB3-infizierten, ANT1-transgenen Herzen wurde am Tag 8 nach der Infektion signifikant mehr Virus nachgewiesen, der in den betroffenen Tieren mit einer verstärkten Infiltration von immunkompetenten Zellen einherging. Dieser Unterschied im kardialen Virustiter war unabhängig von der mitochondrialen Atmungskette, dem CK-System und dem antioxidativen System, deren Regulation in Wildtyp- und ANT1-transgenen Tieren vergleichbar war. Auch die zwischen den beiden Gruppen beobachteten Expressionsunterschiede der apoptotischen Marker waren nicht so umfangreich, um die Unterschiede in der Viruslast erklären zu können. Vielmehr ist davon auszugehen, dass die ANT1-assoziierte Erhöhung der Virusreplikation zu dieser geringfügig höheren Apoptose führte, da mehr Zellen infiziert werden konnten.

Es gibt weitere Hinweise, dass der die Virusreplikation fördernde Effekt der hohen ANT1-Expression unabhängig von den mit ANT assoziierten Funktionen des mitochondrialen Energiestoffwechsels und der Apoptose ist. Während der akuten Myokarditis hatten sowohl die A.SW- als auch die ANT1-transgenen C57BL/6-Mäuse eine stabile, hohe ANT1-Expression, hingegen unterschieden sich die beiden Gruppen in der Regulation des Energiestoffwechsels und der Apoptose erheblich voneinander. Diese Regulation entsprach in ANT1-transgenen Tieren der der C57BL/6-Wildtypen, mit denen sie im genetischen Hintergrund und der Expression stoffwechselrelevanter Cytokine wie IL-1 β , TGF β , TNF α sowie IFN β übereinstimmten (nicht gezeigt). Auch in isolierten, CVB3-infizierten Kardiomyozyten ging die erhöhte ANT1-Expression mit einer signifikant höheren Virusmenge einher. Der mitochondriale Energiestoffwechsel und die Apoptose-induktion wurden im Verlauf der Virusmyokarditis somit von der immunologischen

Reaktion des Wirts bestimmt, wohingegen die in ANT1-transgenen Tieren beobachteten Unterschiede in der Virusreplikation auf die erhöhte ANT1-Expression zurückzuführen sind. Ob es sich hierbei allerdings um einen direkten, replikationsfördernden Effekt oder aber um eine Verzögerung des Eliminierungsprozesses handelte und wie der Mechanismus dahinter aussieht, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht aufgeklärt werden und wird Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Einige theoretische Überlegungen in Bezug auf diesen Mechanismus sind hier jedoch nennenswert:

Diverse Arbeitsgruppen haben in *Preconditioning*-Experimenten gezeigt, dass die Stabilisierung der ANT1-Expression mit einer Stabilisierung der Elektronentransportkette und einer verbesserten Stressantwort assoziiert ist^{206, 207, 305, 306}. Möglicherweise hat die hohe ANT1-Expression in CVB3-infizierten A.SW- und ANT1-transgenen C57BL/6-Herzen zu einer Stabilisierung der mitochondrialen Integrität beigetragen und dadurch den Mitochondrien-abhängigen Zelltod der infizierten Zelle verzögert, so dass die virale Replikationsphase in der Zelle verlängert wurde. Eine solche Verzögerung der Apoptose konnte mit den hier gewählten Versuchsbedingungen allerdings nicht nachgewiesen werden, da bereits zum frühesten untersuchten Zeitpunkt am Tag 4 nach der Infektion starke proapoptotische Signale, wie die erhöhte Expression von Bax und ein reduziertes Bcl-2/Bax-Verhältnis, im Gang waren. Eine Analyse zu einem noch früheren Zeitpunkt der Infektion, der vor der Induktion der Apoptose durch das aktivierte Immunsystem liegt, wäre nötig, um diese Hypothese zu überprüfen. Die verstärkte Akkumulation virusspezifischer RNA in transgenen Kardiomyozyten könnte jedoch auf eine Verlängerung der Replikationsphase und eine damit einhergehende erhöhte Replikationsmenge pro Zelle im Vergleich zu Wildtyp-Kardiomyozyten hinweisen.

Über die Stabilisierung der Mitochondrien und die dadurch bedingte Verzögerung der Apoptose hätte eine hohe ANT1-Expression indirekt die Replikation des Virus unterstützt. Eine direkte Interaktion zwischen ANT1 und CVB3 ist bisher noch nicht gezeigt worden. Es gibt jedoch Berichte, dass beispielsweise das VP2-Protein des CVB3 mit dem zellulären, proapoptotischen Siva-Protein interagiert⁵¹. Daneben wurden auch für die meisten anderen Struktur- und Nichtstrukturproteine der Picornaviren pro- (VP1, VP2, VP3, 2A, 2C und 3C) und antiapoptotische (2B und 3A) Effekte beschrieben²⁷⁹. ANT wiederum interagiert mit viralen Komponenten anderer Viren wie das Cytomegalievirus (CMV, vMIA) und HIV (Vpr)^{155, 156}, die die mitochondriale Membranpermeabilität verändern¹⁵⁶. Virusproteine des CMV und Epstein-Barr-Virus, welche beide ebenfalls mit der Myokarditis assoziiert werden, richten sich gegen das Mitochondrium, interagieren dort mit dem ANT oder ANT-Interaktionspartnern und manipulieren die Apoptose-assoziierte Permeabilisierung der mitochondrialen Membran³⁰⁸. Diesbezüglich muss

geklärt werden, ob auch CVB3 ähnliche Strategien entwickelt hat, um den ANT1 für seine Replikation und/oder Persistenz zu benutzen.

Für den ANT wurden zudem eine ganze Reihe zellulärer Interaktionspartner beschrieben^{151, 152, 154-156, 159, 162, 163, 271, 309}, so dass auch eine indirekte Beeinflussung der Virusreplikation denkbar ist. Eine weitere, infektionsrelevante Kommunikation von Interesse war beispielsweise die zwischen ANT1 und dem CAR. Hier konnten wir in ANT1-transgenen, pränatalen Kardiomyozyten eine Veränderung der CAR-Expression ausschließen, so dass der CAR-abhängige virale Zelleintritt nicht für die beobachteten Unterschiede in der Virusreplikation zwischen Wildtyp- und transgenen Mäusen verantwortlich gewesen sein kann.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine erhöhte ANT1-Expression im Herzen die kardiale Viruslast nach CVB3-Infektion vergrößerte, dies jedoch unabhängig von den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten ANT1-assoziierten Funktionen des mitochondrialen Energiestoffwechsels und der Apoptose war. Möglicherweise basiert der Effekt auf der frühzeitigen Stabilisierung der mitochondrialen Integrität und einer dadurch verlängerten viralen Replikationsphase. Die Hochregulation des ANT1 unter Bedingungen, die für die Gesundung des Herzens eine Zelleliminierung erforderlich machen, hat somit in Hinblick auf die kardiale Viruslast eine negative Auswirkung auf die Myokarditis.

4.4.3 ANT1-Überexpression im experimentellen Diabetes Typ I

Obwohl die Hypothese eines allgemeinen kardioprotektiven Effekts einer erhöhten ANT1-Expression im CVB3-Myokarditis-Modell nicht bestätigt werden konnte, konnte nicht ausgeschlossen werden, dass die ANT1-Überexpression in Erkrankungen anderer Ätiologie positive Effekte bewirkt. Wir konnten bereits zeigen, dass in Hypertonie-induzierter Herzerkrankung in der Ratte die herzspezifische ANT1-Überexpression durch Beschleunigung des ADP/ATP-Transports zu einer deutlichen Verbesserung des kardialen Krankheitsbilds führte²⁰⁴. Allerdings sind die pathogenen Mechanismen der Virusmyokarditis und der Hypertonie-induzierten Herzerkrankung grundlegend voneinander verschieden. Darauf basierend wurden die Auswirkungen der ANT1-Überexpression auf das Herz in diabetischer Kardiomyopathie überprüft.

Obwohl die diabetische Kardiomyopathie eine häufige Komplikation beim Diabetes ist und zum Herzversagen führen kann, ist ihre Pathogenese bisher nicht vollständig verstanden. Unter den vorgeschlagenen Mechanismen spielt eine Störung des Energiestoffwechsels in ihrer Entwicklung wahrscheinlich eine wichtige Rolle^{310, 311}. Die kardiale Funktion ist abhängig von einer ausreichenden Versorgung mit ATP, jedoch schaltet der kardiale Energiestoffwechsel im Diabetes von Glukose auf Fettsäuren um³¹¹. Eine Reihe von Studien belegen, dass genetisch modifizierte Tiermodelle mit erhöhter Aufnahme³¹²,

Transport³¹³ und Oxidation^{314, 315} von Fettsäuren einen vergleichbaren kardialen Phänotyp wie dem der diabetischen Kardiomyopathie ausbilden. Die metabolische Dysfunktion und die Schädigung der mitochondrialen Struktur wurden ebenfalls als diabetische Komplikationen benannt^{233, 234}, so dass die mitochondriale Funktion des Herzens ein Faktor in der Entwicklung der diabetischen Kardiomyopathie ist.

In unserem Experiment wurde in ANT1-transgenen Mäusen mittels STZ Diabetes induziert. Obwohl sechs Wochen nach der STZ-Injektion sowohl die Stärke der Hyperglykämie als auch der Verlust des Körpergewichts in Wildtyp- und transgenen Mäusen vergleichbar waren, konnte die ANT1-Überexpression eine signifikante Abnahme des Ventrikulengewichts, wie sie in diabetischen Wildtyp-Mäusen beobachtet wurde, verhindern. In Übereinstimmung mit früheren Beschreibungen STZ-induzierter diabetischer Tiermodelle^{316, 317} waren in Wildtypen unter STZ-Behandlung im Vergleich zur normoglykämischen Kontrollgruppe sowohl die systolische als auch die diastolische Funktion signifikant eingeschränkt. Dahingegen wurde keine signifikante Verschlechterung in hyperglykämischen, ANT1-überexprimierenden Mäusen detektiert. Der kardioprotektive Effekt der ANT1-Überexpression wurde durch die unveränderte Expression der ANP-mRNA verdeutlicht, deren Erhöhung ein Marker für kardiales Versagen ist.

Diese Ergebnisse reißen sich ein in Berichte, die eine erhöhte ANT1-Expression als Teil eines kardioprotektiven Genprogramms sehen, die das gestresste Myokard in die Lage versetzen, die mitochondriale Integrität zu stabilisieren, die gleichzeitig die essentielle Energieversorgung sichert^{206, 207}. Eine beträchtliche Anzahl an Beweisen deutet darauf hin, dass die Störung des Energiestoffwechsels in kardialen Myozyten Apoptose induzieren kann, die ebenfalls zur fortschreitenden Entwicklung der diabetischen Kardiomyopathie beitragen kann³¹⁸. Fiordaliso *et al.* haben berichtet, dass in Ratten drei Tage nach STZ-Injektion die Anzahl der Myozyten um 29 % reduziert und die Zahl der toten und apoptotischen Myozyten 5,0- bzw. 6,7-fach erhöht ist²²⁹. Damit im Einklang stehen die Ergebnisse dieser Studie, in der in diabetischen Wildtyp-Mäusen im Vergleich zu nicht diabetischen Kontrollen das Herzgewicht ebenfalls signifikant verringert war. Da trotz vergleichbarer Hyperglykämie keine Veränderungen des Herzgewichts in ANT1-transgenen Mäusen gemessen wurden, implizieren die Ergebnisse, dass die Überexpression von ANT1 in Mitochondrien möglicherweise die durch Diabetes induzierte Apoptose oder Nekrose der Kardiomyozyten inhibierte.

Zusammengefasst lieferten diese Untersuchungen direkte *in vivo* Beweise, dass die erhöhte Expression von ANT1 in Mitochondrien die signifikante Verschlechterung der kardialen Funktion sechs Wochen nach der Induktion von Diabetes Typ I in Mäusen verbessern kann. Sie unterstützten die Vermutung, dass die Stimulation der ANT1-Expression über die Verbesserung der mitochondrialen Funktion ein grundsätzliches

Prinzip bei der Behandlung der diabetischen Kardiomyopathie sein könnte. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die dauerhafte Überexpression von ANT1 in Kardiomyozyten möglicherweise andere Proteine hoch- oder herunterreguliert, die unter hyperglykämischen Bedingungen auf die kardiale Funktion wirken, so dass die Langzeiteffekte einer ANT1-Überexpression auf die diabetische Kardiomyopathie in weiteren Untersuchungen noch geklärt werden müssen. Weitere Untersuchungen sind nötig, um die molekularen Mechanismen hinter dem kardioprotektiven Effekt der ANT1-Überexpression aufzudecken und eine Verbindung zwischen den experimentellen Daten und neuen klinischen Therapien herzustellen.

4.4.4 Beurteilung der ANT1-Überexpression in kardialen Erkrankungen

Basierend auf den hier präsentierten Ergebnissen dieser Arbeit muss geschlossen werden, dass die Beurteilung der Effekte der ANT1-Überexpression vom zugrunde liegenden Krankheitsbild abhängig ist. Insbesondere ist hier entscheidend, welche Funktion der zellulären Apoptose zukommt. Bei der diabetischen Kardiomyopathie²¹¹ und auch bei der Hypertonie-induzierten Herzerkrankung²⁰⁴ war die Apoptose mitverantwortlich für die Schädigung der Herzstruktur und die progressive Verschlechterung der kardialen Funktion. Eine Verhinderung der Apoptose-Induktion durch die ANT1-basierte Stabilisierung der Mitochondrien und ihrer Funktion hatte somit positive Effekte auf das Herz und seine Funktion. Demgegenüber spielt die Apoptose in der CVB3-Myokarditis eine entscheidende Rolle in der Viruseliminierung. Die durch die hohe Expression von ANT1 möglicherweise bedingte Stabilisierung der Mitochondrien in ANT1-transgenen und A.SW-Tieren begünstigte eine Erhöhung der kardialen Viruslast.

5 ZUSAMMENFASSUNG –SUMMARY

5.1 Zusammenfassung

Die kardiale Funktion ist abhängig von einer stabilen Energieversorgung der Kardiomyozyten. Herzerkrankungen gehen häufig einher mit einem gestörten zellulären Energiestoffwechsel, der mit oxidativem Stress, mitochondrialer Schädigung, Apoptose und Nekrose assoziiert ist, die zur kontraktile Dysfunktion beitragen. Beeinträchtigungen des kardialen Energiestoffwechsels wurden u. a. in Patienten mit chronischer Myokarditis, dilatativer und diabetischer Kardiomyopathie beschrieben, jedoch fehlen noch Erkenntnisse über deren Ursache, Art und Auswirkungen. In der vorliegenden Arbeit wurden daher Tiermodelle der inflammatorischen und diabetischen Kardiomyopathie unter besonderer Beachtung mitochondrialer Komponenten analysiert. Zum einen wurden im Tiermodell der Coxsackievirus B3 (CVB3)-Myokarditis zwei Mausstämme mit unterschiedlichem genetischen Hintergrund vergleichend untersucht. Zum anderen wurden die Auswirkungen einer gezielten Modifikation des Adeninnucleotid-Translokators (ANT), der aufgrund seiner Funktionen im Energiestoffwechsel und bei der Apoptose eine mitochondriale Schlüsselkomponente ist, auf die inflammatorische und die diabetische Kardiomyopathie analysiert. Im CVB3-Myokarditis-Modell wurden Mäuse mit unterschiedlicher genetischer Disposition für den akuten, ausheilenden (C57BL/6) und den chronischen (A.SW) Verlauf der Myokarditis untersucht. Infizierte C57BL/6- und A.SW-Mäuse wiesen am Tag 8 nach der Infektion deutliche Unterschiede in der kardialen Viruslast auf, die auf Unterschieden in der viralen Replikation und/oder der Eliminierung basierten. Die Analyse intrazellulärer Prozesse ergab zudem essentielle Unterschiede zwischen den Vertretern beider Stämme in der Regulation des mitochondrialen Energiestoffwechsels und der Apoptose. In der akuten Myokarditis waren resistente C57BL/6-Tiere durch eine asynchrone Regulation der Atmungskettenkomplexe, eine stark reduzierte ANT1-Expression sowie eine Beeinträchtigung des Creatinkinase-Systems charakterisiert. Diese Veränderungen waren teilweise bereits am Tag 4 nach der Infektion ausgeprägt und sind somit frühe Ereignisse in der CVB3-Myokarditis, die den Verlauf der Erkrankung beeinflussen können. Demgegenüber war in permissiven A.SW-Herzen die Aktivität der Atmungskettenkomplexe universell herunterreguliert und die ANT1-Expression im Vergleich zur nicht infizierten Kontrollgruppe unverändert. Die Veränderungen in der Atmungskette gingen in beiden Tiermodellen mit der Aktivierung des antioxidativen Systems einher, jedoch konnte nur in C57BL/6-Tieren eine erhöhte oxidative Schädigung der zellulären Lipide nachgewiesen werden. Diese wurde von einer verstärkten Expression der Apoptose-Marker Bax, Bcl-2 und Caspase-3 begleitet. Die zellulären Bedingungen in infizierten, resistenten Mäusen waren assoziiert mit einer geringeren kardialen Viruslast im Vergleich zu permissiven Mäusen,

die weder eine erhöhte oxidative Schädigung noch eine Induktion der Mitochondrien-abhängigen Apoptose aufwiesen. Die beschriebenen Unterschiede zwischen resistenten und permissiven Stämmen standen im Zusammenhang mit der in den Tieren induzierten immunologischen Antwort auf die CVB3-Infektion. Die Regulation der mitochondrialen Komponenten in der Myokarditis konnte mit der Expression stoffwechselrelevanter Cytokine, wie IL-1 β , TNF α , TGF β und IFN β , korreliert werden. *In vitro* wurde dieser Zusammenhang anhand des Beispiels der IL-1 β -regulierten ANT1-Expression bestätigt.

Der ANT1 verbindet die energieproduzierenden Prozesse der mitochondrialen Matrix mit den energieverbrauchenden Prozessen des Cytosols und ist darüber hinaus an der Regulation der Mitochondrien-abhängigen Apoptose beteiligt. Die unterschiedliche Regulation im resistenten und permissiven CVB3-Myokarditis-Modell gab dazu Anlass, die Expression des ANT1 gezielt zu modifizieren und die Auswirkungen der herzspezifischen ANT1-Überexpression im Tiermodell der CVB3-Myokarditis zu untersuchen. Darüber hinaus sollte unter Verwendung des Modells der Streptozotocin (STZ)-induzierten diabetischen Kardiomyopathie die Wirkung der ANT1-Überexpression in einer Kardiomyopathie anderer Ätiologie analysiert werden, um die Allgemeingültigkeit der Beobachtungen zu testen. Die hohe ANT1-Expression in CVB3-infizierten, transgenen Herzen wurde begleitet von einer signifikant höheren kardialen Viruslast im Vergleich zu infizierten Wildtyp-Herzen. Der Unterschied im Virustiter war unabhängig von den untersuchten Parametern der Atmungskette, des Creatinkinase-Systems, des antioxidativen Systems, der mitochondrialen Apoptose und der Cytokinantwort. *In vitro* Analysen bestätigten den die Virusreplikation fördernden Effekt der hohen ANT1-Expression, so dass geschlossen werden kann, dass Komponenten des Energiestoffwechsels und der Apoptose Einfluss auf die kardiale Viruslast nehmen. Unter Bedingungen, die eine Viruseliminierung erforderlich machten, beeinträchtigte eine hohe ANT1-Expression die Viruseliminierung, förderte die Virusreplikation und hatte somit einen negativen Effekt auf den Verlauf der Myokarditis.

Bei der diabetischen Kardiomyopathie hingegen profitierten hyperglykämische Tiere von einer erhöhten ANT1-Expression. Ein vergleichbarer diabetischer Phänotyp, gezeigt anhand der erhöhten Blutglukose-Konzentration, wurde in Wildtyp- und ANT1-transgenen Tieren durch STZ-Injektion induziert. Die gleichzeitige, kardiale ANT1-Überexpression verbesserte die Herzfunktionsparameter sowie die molekularen Marker der kardialen Schädigung im Vergleich zur normoglykämischen Kontrollgruppe. Somit kann eine herzspezifische ANT1-Überexpression tatsächlich kardioprotektive Effekte haben, die jedoch vom zugrunde liegenden Krankheitsbild und den pathophysiologischen Mechanismen, insbesondere der Apoptose, abhängig sind.

5.2 Summary

Cardiac function is highly dependent on a stable energy supply of the cardiomyocytes. Heart disease is often linked to a disturbed cellular energy metabolism that is associated with oxidative stress, mitochondrial damage, apoptosis, and necrosis, contributing to contractile dysfunction. Impairment of cardiac energy metabolism has for instance been described in patients with myocarditis, dilative and diabetic cardiomyopathy, but further insights into the cause, nature and implications are lacking. In the present work animal models of inflammatory and diabetic cardiomyopathy were analysed with particular regard to mitochondrial components. First, in a murine model of Coxsackievirus B3 (CVB3)-induced myocarditis two different strains with varying genetic backgrounds were compared. Second, the impact of a targeted modification of adenine nucleotide translocase (ANT) expression, which is a mitochondrial key component due to its functions in energy metabolism and apoptosis, was analysed in inflammatory and diabetic cardiomyopathy.

In the CVB3-induced myocarditis model, mice with different genetic predisposition for the acute, up-healing (C57BL/6) and the chronic (A.SW) course of myocarditis were studied. Infected C57BL/6 and A.SW mice showed significant differences in cardiac viral load on day 8 after infection, which was based on differences in viral replication and/or virus elimination. Analysis of intracellular processes also revealed essential differences between the representatives of both strains in the regulation of the mitochondrial energy metabolism and apoptosis. In acute myocarditis, resistant C57BL/6 mice were characterised by an asynchronous regulation of respiratory chain complex activity, a strongly reduced ANT1 expression and an impairment of the creatine kinase system. These changes were partly already pronounced at day 4 after infection and are thus early events in CVB3 myocarditis, which can influence the course of the disease. In contrast, in susceptible A.SW hearts the activities of all respiratory chain complexes were universally downregulated and ANT1 expression was unchanged compared to uninfected controls. In both strains the changes in the respiratory chain were connected with the activation of the antioxidant system, but only in C57BL/6 hearts an increase in oxidative damage of cellular lipids could be detected. This was accompanied by an increased expression of apoptosis markers Bax, Bcl-2, and caspase-3. The cellular conditions in infected, resistant mice were associated with a reduced cardiac viral load compared to susceptible mice that displayed neither an increase in oxidative damage nor an induction of mitochondria-dependent apoptosis. The described differences between resistant and susceptible strains were linked to the specific immune response to CVB3 infection induced in these animals. The regulation of mitochondrial components in CVB3 myocarditis could be correlated to

the expression of metabolically relevant cytokines such as IL-1 β , TNF α , TGF β , and IFN β , and the regulation of ANT1 expression by IL-1 β was verified *in vitro*.

ANT1 connects energy-producing processes in the mitochondrial matrix with energy-consuming reactions in the cytosol and is furthermore involved in the regulation of mitochondria-dependent apoptosis. The differential regulation in resistant and susceptible, CVB3-infected mice prompted us to selectively modify ANT1 expression and to investigate the effects of heart-specific ANT1 overexpression on CVB3-induced myocarditis. The effects of ANT1 overexpression on cardiac disease should be further analysed in a cardiomyopathy of other aetiology, namely in a model of streptozotocin (STZ)-induced diabetic cardiomyopathy, to test the generality of the observations. A high level of ANT1 expression in CVB3-infected, transgenic hearts was associated with a significantly higher cardiac viral load compared to infected wild-type hearts. The difference in virus titres was independent of the examined parameters of the respiratory chain, creatine kinase system, antioxidant system, mitochondrial apoptosis and cytokine expression. *In vitro* analyses confirmed the auxiliary effect of a high ANT1 expression on viral replication. It can be concluded that components of the energy metabolism and apoptosis influence cardiac viral load. Under conditions that necessitate virus elimination a high level of ANT1 delays virus elimination and promotes viral replication and thus has a negative impact on the course of myocarditis.

In diabetic cardiomyopathy, by contrast, hyperglycaemic animals benefited from an elevated ANT1 expression. A comparable diabetic phenotype, evidenced by high blood glucose concentration, was induced by STZ injection in wild-type and ANT1 transgenic mice, however, cardiac ANT1 overexpression improved cardiac function and molecular markers of cardiac damage in comparison to normoglycaemic controls. Thus, heart-specific ANT1 overexpression of ANT1 actually exerts cardioprotective effects, however, these are dependent on the underlying disease and the pathophysiological mechanisms, particularly apoptosis.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- (1) Richardson P, McKenna W, Bristow M et al. Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of cardiomyopathies. *Circulation* 1996 March 1;93(5):841-2.
- (2) Pauschinger M, Doerner A, Kuehl U et al. Enteroviral RNA replication in the myocardium of patients with left ventricular dysfunction and clinically suspected myocarditis. *Circulation* 1999 February 23;99(7):889-95.
- (3) Matsumori A, Yutani C, Ikeda Y, Kawai S, Sasayama S. Hepatitis C virus from the hearts of patients with myocarditis and cardiomyopathy. *Lab Invest* 2000 July;80(7):1137-42.
- (4) Bowles NE, Ni J, Kearney DL et al. 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 August 6;42(3):466-72.
- (5) Kuhl U, Pauschinger M, Bock T et al. Parvovirus B19 infection mimicking acute myocardial infarction. *Circulation* 2003 August 26;108(8):945-50.
- (6) Kuhl U, Pauschinger M, Noutsias M et al. High prevalence of viral genomes and multiple viral infections in the myocardium of adults with "idiopathic" left ventricular dysfunction. *Circulation* 2005 February 22;111(7):887-93.
- (7) Strauer BE, Kandolf R, Mall G et al. [Update 2001. Myocarditis--cardiomyopathy]. *Med Klin (Munich)* 2001 October 15;96(10):608-25.
- (8) Schultheiss HP, Kuhl U. Overview on chronic viral cardiomyopathy/chronic myocarditis. *Ernst Schering Res Found Workshop* 2006;(55):3-18.
- (9) Schultheiss HP, Kuhl U. [Myocarditis]. *Dtsch Med Wochenschr* 2008 December;133 Suppl 8:S290-S294.
- (10) Aretz HT. Myocarditis: the Dallas criteria. *Hum Pathol* 1987 June;18(6):619-24.
- (11) Lieberman EB, Hutchins GM, Herskowitz A, Rose NR, Baughman KL. Clinicopathologic description of myocarditis. *J Am Coll Cardiol* 1991 December;18(7):1617-26.
- (12) McCarthy RE, III, Boehmer JP, Hruban RH et al. Long-term outcome of fulminant myocarditis as compared with acute (nonfulminant) myocarditis. *N Engl J Med* 2000 March 9;342(10):690-5.
- (13) Kuhl U, Schultheiss HP. Viral myocarditis: diagnosis, aetiology and management. *Drugs* 2009 July 9;69(10):1287-302.
- (14) Pauschinger M, Knopf D, Petschauer S et al. Dilated cardiomyopathy is associated with significant changes in collagen type I/III ratio. *Circulation* 1999 June 1;99(21):2750-6.
- (15) Schultheiss HP, Noutsias M, Kuhl U et al. [Cardiomyopathies. I: classification of cardiomyopathies--dilated cardiomyopathy]. *Internist (Berl)* 2005 November;46(11):1245-56.
- (16) Kandolf R, Klingel K, Zell R et al. Molecular pathogenesis of enterovirus-induced myocarditis: virus persistence and chronic inflammation. *Intervirology* 1993;35(1-4):140-51.
- (17) Pauschinger M, Chandrasekharan K, Noutsias M, Kuhl U, Schwimmbeck LP, Schultheiss HP. Viral heart disease: molecular diagnosis, clinical prognosis, and treatment strategies. *Med Microbiol Immunol* 2004 May;193(2-3):65-9.

- (18) Martino TA, Liu P, Sole MJ. Viral infection and the pathogenesis of dilated cardiomyopathy. *Circ Res* 1994 February;74(2):182-8.
- (19) Jin O, Sole MJ, Butany JW et al. Detection of enterovirus RNA in myocardial biopsies from patients with myocarditis and cardiomyopathy using gene amplification by polymerase chain reaction. *Circulation* 1990 July;82(1):8-16.
- (20) Baboonian C, Treasure T. Meta-analysis of the association of enteroviruses with human heart disease. *Heart* 1997 December;78(6):539-43.
- (21) Kim KS, Hufnagel G, Chapman NM, Tracy S. The group B coxsackieviruses and myocarditis. *Rev Med Virol* 2001 November;11(6):355-68.
- (22) Kuhl U, Pauschinger M, Seeberg B et al. Viral persistence in the myocardium is associated with progressive cardiac dysfunction. *Circulation* 2005 September 27;112(13):1965-70.
- (23) Woodruff JF. Viral myocarditis. A review. *Am J Pathol* 1980 November;101(2):425-84.
- (24) Kawai C. From myocarditis to cardiomyopathy: mechanisms of inflammation and cell death: learning from the past for the future. *Circulation* 1999 March 2;99(8):1091-100.
- (25) Wolfgram LJ, Beisel KW, Herskowitz A, Rose NR. Variations in the susceptibility to Coxsackievirus B3-induced myocarditis among different strains of mice. *J Immunol* 1986 March 1;136(5):1846-52.
- (26) 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 September;128(3):455-63.
- (27) Chow LH, Gauntt CJ, McManus BM. Differential effects of myocarditic variants of Coxsackievirus B3 in inbred mice. A pathologic characterization of heart tissue damage. *Lab Invest* 1991 January;64(1):55-64.
- (28) Klingel K, Hohenadl C, Canu A et al. Ongoing enterovirus-induced myocarditis is associated with persistent heart muscle infection: quantitative analysis of virus replication, tissue damage, and inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992 January 1;89(1):314-8.
- (29) Gauntt C, Huber S. Coxsackievirus experimental heart diseases. *Front Biosci* 2003 January 1;8:e23-e35.
- (30) Hyypia T, Hovi T, Knowles NJ, Stanway G. Classification of enteroviruses based on molecular and biological properties. *J Gen Virol* 1997 January;78 (Pt 1):1-11.
- (31) Muckelbauer JK, Rossmann MG. The structure of coxsackievirus B3. *Curr Top Microbiol Immunol* 1997;223:191-208.
- (32) Whitton JL, Cornell CT, Feuer R. Host and virus determinants of picornavirus pathogenesis and tropism. *Nat Rev Microbiol* 2005 October;3(10):765-76.
- (33) Hyypia T, Kallajoki M, Maaronen M et al. Pathogenetic differences between coxsackie A and B virus infections in newborn mice. *Virus Res* 1993 January;27(1):71-8.
- (34) Harvala H, Kalimo H, Dahllund L et al. Mapping of tissue tropism determinants in coxsackievirus genomes. *J Gen Virol* 2002 July;83(Pt 7):1697-706.
- (35) Bergelson JM, Cunningham JA, Droguett G et al. Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* 1997 February 28;275(5304):1320-3.

- (36) He Y, Chipman PR, Howitt J et al. Interaction of coxsackievirus B3 with the full length coxsackievirus-adenovirus receptor. *Nat Struct Biol* 2001 October;8(10):874-8.
- (37) Philipson L, Pettersson RF. The coxsackie-adenovirus receptor--a new receptor in the immunoglobulin family involved in cell adhesion. *Curr Top Microbiol Immunol* 2004;273:87-111.
- (38) Raschperger E, Engstrom U, Pettersson RF, Fuxe J. CLMP, a novel member of the CTX family and a new component of epithelial tight junctions. *J Biol Chem* 2004 January 2;279(1):796-804.
- (39) Tomko RP, Xu R, Philipson L. HCAR and MCAR: the human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997 April 1;94(7):3352-6.
- (40) Honda T, Saitoh H, Masuko M et al. The coxsackievirus-adenovirus receptor protein as a cell adhesion molecule in the developing mouse brain. *Brain Res Mol Brain Res* 2000 April 14;77(1):19-28.
- (41) Tomko RP, Johansson CB, Totrov M, Abagyan R, Frisen J, Philipson L. Expression of the adenovirus receptor and its interaction with the fiber knob. *Exp Cell Res* 2000 February 25;255(1):47-55.
- (42) Bergelson JM, Mohanty JG, Crowell RL, St John NF, Lublin DM, Finberg RW. Coxsackievirus B3 adapted to growth in RD cells binds to decay-accelerating factor (CD55). *J Virol* 1995 March;69(3):1903-6.
- (43) Shafren DR, Bates RC, Agrez MV, Herd RL, Burns GF, Barry RD. Coxsackieviruses B1, B3, and B5 use decay accelerating factor as a receptor for cell attachment. *J Virol* 1995 June;69(6):3873-7.
- (44) Gomez RM, Lopez Costa JJ, Pecci SG, Berria MI. Ultrastructural study of cell injury induced by coxsackievirus B3 in pancreatic and cardiac tissues. *Medicina (B Aires)* 1993;53(4):300-6.
- (45) McManus BM, Chow LH, Wilson JE et al. Direct myocardial injury by enterovirus: a central role in the evolution of murine myocarditis. *Clin Immunol Immunopathol* 1993 August;68(2):159-69.
- (46) Huber SA, Gauntt CJ, Sakkinen P. Enteroviruses and myocarditis: viral pathogenesis through replication, cytokine induction, and immunopathogenicity. *Adv Virus Res* 1998;51:35-80.
- (47) Knowlton KU, Badorff C. The immune system in viral myocarditis: maintaining the balance. *Circ Res* 1999 September 17;85(6):559-61.
- (48) 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 February;17(2):167-81.
- (49) Herzum M, Ruppert V, Kuytz B, Jomaa H, Nakamura I, Maisch B. Coxsackievirus B3 infection leads to cell death of cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 1994 July;26(7):907-13.
- (50) Yajima T, Yasukawa H, Jeon ES et al. Innate defense mechanism against virus infection within the cardiac myocyte requiring gp130-STAT3 signaling. *Circulation* 2006 November 28;114(22):2364-73.
- (51) Henke A, Launhardt H, Klement K, Stelzner A, Zell R, Munder T. Apoptosis in coxsackievirus B3-caused diseases: interaction between the capsid protein VP2 and the proapoptotic protein siva. *J Virol* 2000 May;74(9):4284-90.

- (52) Chau DH, Yuan J, Zhang H et al. Coxsackievirus B3 proteases 2A and 3C induce apoptotic cell death through mitochondrial injury and cleavage of eIF4GI but not DAP5/p97/NAT1. *Apoptosis* 2007 March;12(3):513-24.
- (53) Saraste A, Arola A, Vuorinen T et al. Cardiomyocyte apoptosis in experimental coxsackievirus B3 myocarditis. *Cardiovasc Pathol* 2003 September;12(5):255-62.
- (54) Kishimoto C, Thorp KA, Abelmann WH. Immunosuppression with high doses of cyclophosphamide reduces the severity of myocarditis but increases the mortality in murine Coxsackievirus B3 myocarditis. *Circulation* 1990 September;82(3):982-9.
- (55) O'Connell JB, Reap EA, Robinson JA. The effects of cyclosporine on acute murine Coxsackie B3 myocarditis. *Circulation* 1986 February;73(2):353-9.
- (56) 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 January;66(1):24-31.
- (57) Shioi T, Matsumori A, Sasayama S. Persistent expression of cytokine in the chronic stage of viral myocarditis in mice. *Circulation* 1996 December 1;94(11):2930-7.
- (58) Matsumori A. Molecular and immune mechanisms in the pathogenesis of cardiomyopathy--role of viruses, cytokines, and nitric oxide. *Jpn Circ J* 1997 April;61(4):275-91.
- (59) Godeny EK, Gauntt CJ. Involvement of natural killer cells in coxsackievirus B3-induced murine myocarditis. *J Immunol* 1986 September 1;137(5):1695-702.
- (60) Leipner C, Grun K, Schneider I, Gluck B, Sigusch HH, Stelzner A. Coxsackievirus B3-induced myocarditis: differences in the immune response of C57BL/6 and Balb/c mice. *Med Microbiol Immunol* 2004 May;193(2-3):141-7.
- (61) Matsumori A, Yamada T, Suzuki H, Matoba Y, Sasayama S. Increased circulating cytokines in patients with myocarditis and cardiomyopathy. *Br Heart J* 1994 December;72(6):561-6.
- (62) Wee L, Liu P, Penn L et al. Persistence of viral genome into late stages of murine myocarditis detected by polymerase chain reaction. *Circulation* 1992 November;86(5):1605-14.
- (63) Reetoo KN, Osman SA, Illavia SJ, Cameron-Wilson CL, Banatvala JE, Muir P. Quantitative analysis of viral RNA kinetics in coxsackievirus B3-induced murine myocarditis: biphasic pattern of clearance following acute infection, with persistence of residual viral RNA throughout and beyond the inflammatory phase of disease. *J Gen Virol* 2000 November;81(Pt 11):2755-62.
- (64) Chapman NM, Kim KS. Persistent coxsackievirus infection: enterovirus persistence in chronic myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Curr Top Microbiol Immunol* 2008;323:275-92.
- (65) Caggana M, Chan P, Ramsingh A. Identification of a single amino acid residue in the capsid protein VP1 of coxsackievirus B4 that determines the virulent phenotype. *J Virol* 1993 August;67(8):4797-803.
- (66) Dunn JJ, Chapman NM, Tracy S, Romero JR. Genomic determinants of cardiovirulence in coxsackievirus B3 clinical isolates: localization to the 5' nontranslated region. *J Virol* 2000 May;74(10):4787-94.
- (67) Kim KS, Tracy S, Tappich W et al. 5'-Terminal deletions occur in coxsackievirus B3 during replication in murine hearts and cardiac myocyte cultures and correlate with encapsidation of negative-strand viral RNA. *J Virol* 2005 June;79(11):7024-41.

- (68) Kim KS, Chapman NM, Tracy S. Replication of coxsackievirus B3 in primary cell cultures generates novel viral genome deletions. *J Virol* 2008 February;82(4):2033-7.
- (69) Rose NR. The adjuvant effect in infection and autoimmunity. *Clin Rev Allergy Immunol* 2008 June;34(3):279-82.
- (70) Huber SA, Lodge PA. Coxsackievirus B-3 myocarditis in Balb/c mice. Evidence for autoimmunity to myocyte antigens. *Am J Pathol* 1984 July;116(1):21-9.
- (71) Henke A, Huber S, Stelzner A, Whitton JL. The role of CD8+ T lymphocytes in coxsackievirus B3-induced myocarditis. *J Virol* 1995 November;69(11):6720-8.
- (72) Huber SA. Coxsackievirus-induced myocarditis is dependent on distinct immunopathogenic responses in different strains of mice. *Lab Invest* 1997 May;76(5):691-701.
- (73) Wolfgram LJ, Beisel KW, Rose NR. Heart-specific autoantibodies following murine coxsackievirus B3 myocarditis. *J Exp Med* 1985 May 1;161(5):1112-21.
- (74) Neu N, Beisel KW, Traystman MD, Rose NR, Craig SW. Autoantibodies specific for the cardiac myosin isoform are found in mice susceptible to Coxsackievirus B3-induced myocarditis. *J Immunol* 1987 April 15;138(8):2488-92.
- (75) Neu N, Rose NR, Beisel KW, Herskowitz A, Gurri-Glass G, Craig SW. Cardiac myosin induces myocarditis in genetically predisposed mice. *J Immunol* 1987 December 1;139(11):3630-6.
- (76) Maisch B, Bauer E, Cirsi M, Kochsiek K. Cytolytic cross-reactive antibodies directed against the cardiac membrane and viral proteins in coxsackievirus B3 and B4 myocarditis. Characterization and pathogenetic relevance. *Circulation* 1993 May;87(5 Suppl):IV49-IV65.
- (77) Whitton JL. Immunopathology during coxsackievirus infection. *Springer Semin Immunopathol* 2002;24(2):201-13.
- (78) Maisch B, Trostel-Soeder R, Stechemesser E, Berg PA, Kochsiek K. Diagnostic relevance of humoral and cell-mediated immune reactions in patients with acute viral myocarditis. *Clin Exp Immunol* 1982 June;48(3):533-45.
- (79) Schultheiss HP, Bolte HD. Immunological analysis of auto-antibodies against the adenine nucleotide translocator in dilated cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 1985 June;17(6):603-17.
- (80) Schultheiss HP, Schwimmbeck P, Bolte HD, Klingenberg M. The antigenic characteristics and the significance of the adenine nucleotide translocator as a major autoantigen to antimitochondrial antibodies in dilated cardiomyopathy. *Adv Myocardiol* 1985;6:311-27.
- (81) Rose NR, Beisel KW, Herskowitz A et al. Cardiac myosin and autoimmune myocarditis. *Ciba Found Symp* 1987;129:3-24.
- (82) Lauer B, Schannwell M, Kuhl U, Strauer BE, Schultheiss HP. Antimyosin autoantibodies are associated with deterioration of systolic and diastolic left ventricular function in patients with chronic myocarditis. *J Am Coll Cardiol* 2000 January;35(1):11-8.
- (83) Kuhl U, Melzner B, Schafer B, Schultheiss HP, Strauer BE. The Ca-channel as cardiac autoantigen. *Eur Heart J* 1991 August;12 Suppl D:99-104.
- (84) Latif N, Baker CS, Dunn MJ, Rose ML, Brady P, Yacoub MH. Frequency and specificity of antiheart antibodies in patients with dilated cardiomyopathy detected using SDS-PAGE and western blotting. *J Am Coll Cardiol* 1993 November 1;22(5):1378-84.

- (85) Schwimmbeck PL, Schwimmbeck NK, Schultheiss HP, Strauer BE. Mapping of antigenic determinants of the adenine-nucleotide translocator and coxsackie B3 virus with synthetic peptides: use for the diagnosis of viral heart disease. *Clin Immunol Immunopathol* 1993 August;68(2):135-40.
- (86) Schulze K, Schultheiss HP. The role of the ADP/ATP carrier in the pathogenesis of viral heart disease. *Eur Heart J* 1995 December;16 Suppl O:64-7.
- (87) Schultheiss HP, Klingenberg M. Immunochemical characterization of the adenine nucleotide translocator. Organ specificity and conformation specificity. *Eur J Biochem* 1984 September 17;143(3):599-605.
- (88) Schulze K, Becker BF, Schauer R, Schultheiss HP. Antibodies to ADP-ATP carrier--an autoantigen in myocarditis and dilated cardiomyopathy--impair cardiac function. *Circulation* 1990 March;81(3):959-69.
- (89) Schulze K, Becker BF, Schultheiss HP. Antibodies to the ADP/ATP carrier, an autoantigen in myocarditis and dilated cardiomyopathy, penetrate into myocardial cells and disturb energy metabolism in vivo. *Circ Res* 1989 February;64(2):179-92.
- (90) Schulze K, Witzendichler B, Christmann C, Schultheiss HP. Disturbance of myocardial energy metabolism in experimental virus myocarditis by antibodies against the adenine nucleotide translocator. *Cardiovasc Res* 1999 October;44(1):91-100.
- (91) Maisch B, Drude L, Hengstenberg C, Hufnagel G, Schonian U, Schwab D. Cytolytic anticardiac membrane antibodies in the pathogenesis of myopericarditis. *Postgrad Med J* 1992;68 Suppl 1:S11-S16.
- (92) Schultheiss HP. [Acute viral myocarditis. 1: Pathogenesis, clinical manifestations, diagnosis]. *Fortschr Med* 1991 January 30;109(3):45-8.
- (93) Hackenbrock CR. Chemical and physical fixation of isolated mitochondria in low-energy and high-energy states. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1968 October;61(2):598-605.
- (94) Kottke M, Adam V, Riesinger I et al. Mitochondrial boundary membrane contact sites in brain: points of hexokinase and creatine kinase location, and control of Ca²⁺ transport. *Biochim Biophys Acta* 1988 August 17;935(1):87-102.
- (95) Bucheler K, Adams V, Brdiczka D. Localization of the ATP/ADP translocator in the inner membrane and regulation of contact sites between mitochondrial envelope membranes by ADP. A study on freeze-fractured isolated liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1991 February 8;1056(3):233-42.
- (96) McCabe ER. Microcompartmentation of energy metabolism at the outer mitochondrial membrane: role in diabetes mellitus and other diseases. *J Bioenerg Biomembr* 1994 June;26(3):317-25.
- (97) Marzo I, Brenner C, Zamzami N et al. The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and bcl-2-related proteins. *J Exp Med* 1998 April 20;187(8):1261-71.
- (98) Sickmann A, Reinders J, Wagner Y et al. The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003 November 11;100(23):13207-12.
- (99) CHANCE B, WILLIAMS GR. The respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Adv Enzymol Relat Subj Biochem* 1956;17:65-134.
- (100) Zorov DB, Juhaszova M, Yaniv Y, Nuss HB, Wang S, Sollott SJ. Regulation and pharmacology of the mitochondrial permeability transition pore. *Cardiovasc Res* 2009 July 15;83(2):213-25.

- (101) Bossy-Wetzel E, Green DR. Apoptosis: checkpoint at the mitochondrial frontier. *Mutat Res* 1999 July 30;434(3):243-51.
- (102) Baines CP. The molecular composition of the mitochondrial permeability transition pore. *J Mol Cell Cardiol* 2009 June;46(6):850-7.
- (103) Benn SC, Woolf CJ. Adult neuron survival strategies--slamming on the brakes. *Nat Rev Neurosci* 2004 September;5(9):686-700.
- (104) Zorov DB, Filburn CR, Klotz LO, Zweier JL, Sollott SJ. Reactive oxygen species (ROS)-induced ROS release: a new phenomenon accompanying induction of the mitochondrial permeability transition in cardiac myocytes. *J Exp Med* 2000 October 2;192(7):1001-14.
- (105) Kane DJ, Sarafian TA, Anton R et al. Bcl-2 inhibition of neural death: decreased generation of reactive oxygen species. *Science* 1993 November 19;262(5137):1274-7.
- (106) Shimizu S, Eguchi Y, Kamiike W et al. Bcl-2 prevents apoptotic mitochondrial dysfunction by regulating proton flux. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998 February 17;95(4):1455-9.
- (107) Vander Heiden MG, Chandel NS, Schumacker PT, Thompson CB. Bcl-xL prevents cell death following growth factor withdrawal by facilitating mitochondrial ATP/ADP exchange. *Mol Cell* 1999 February;3(2):159-67.
- (108) Kroemer G, Reed JC. Mitochondrial control of cell death. *Nat Med* 2000 May;6(5):513-9.
- (109) Aquila H, Link TA, Klingenberg M. Solute carriers involved in energy transfer of mitochondria form a homologous protein family. *FEBS Lett* 1987 February 9;212(1):1-9.
- (110) Rial E, Zardoya R. Oxidative stress, thermogenesis and evolution of uncoupling proteins. *J Biol* 2009;8(6):58.
- (111) Hackenberg H, Klingenberg M. Molecular weight and hydrodynamic parameters of the adenosine 5'-diphosphate--adenosine 5'-triphosphate carrier in Triton X-100. *Biochemistry* 1980 February 5;19(3):548-55.
- (112) Klingenberg M, Nelson DR. Structure-function relationships of the ADP/ATP carrier. *Biochim Biophys Acta* 1994 August 30;1187(2):241-4.
- (113) Dahout-Gonzalez C, Nury H, Trezeguet V, Lauquin GJ, Pebay-Peyroula E, Brandolin G. Molecular, functional, and pathological aspects of the mitochondrial ADP/ATP carrier. *Physiology (Bethesda)* 2006 August;21:242-9.
- (114) Klingenberg M. The ADP and ATP transport in mitochondria and its carrier. *Biochim Biophys Acta* 2008 October;1778(10):1978-2021.
- (115) Pfaff E, Klingenberg M. Adenine nucleotide translocation of mitochondria. 1. Specificity and control. *Eur J Biochem* 1968 October 17;6(1):66-79.
- (116) Metelkin E, Goryanin I, Demin O. Mathematical modeling of mitochondrial adenine nucleotide translocase. *Biophys J* 2006 January 15;90(2):423-32.
- (117) Duee ED, Vignais PV. Kinetics and specificity of the adenine nucleotide translocation in rat liver mitochondria. *J Biol Chem* 1969 July 25;244(14):3920-31.
- (118) Klingenberg M. The ADP-ATP translocation in mitochondria, a membrane potential controlled transport. *J Membr Biol* 1980 September 30;56(2):97-105.
- (119) Kramer R, Klingenberg M. Modulation of the reconstituted adenine nucleotide exchange by membrane potential. *Biochemistry* 1980 February 5;19(3):556-60.

- (120) Giraud S, Bonod-Bidaud C, Wesolowski-Louvel M, Stepien G. Expression of human ANT2 gene in highly proliferative cells: GRBOX, a new transcriptional element, is involved in the regulation of glycolytic ATP import into mitochondria. *J Mol Biol* 1998 August 21;281(3):409-18.
- (121) Feng J, Zhu M, Schaub MC et al. Phosphoproteome analysis of isoflurane-protected heart mitochondria: phosphorylation of adenine nucleotide translocator-1 on Tyr194 regulates mitochondrial function. *Cardiovasc Res* 2008 October 1;80(1):20-9.
- (122) Kholodenko B, Zilinskiene V, Borutaite V, Ivanoviene L, Toleikis A, Praskevicius A. The role of adenine nucleotide translocators in regulation of oxidative phosphorylation in heart mitochondria. *FEBS Lett* 1987 November 2;223(2):247-50.
- (123) Schonfeld P. Does the function of adenine nucleotide translocase in fatty acid uncoupling depend on the type of mitochondria? *FEBS Lett* 1990 May 21;264(2):246-8.
- (124) Vyssokikh MY, Katz A, Rueck A et al. Adenine nucleotide translocator isoforms 1 and 2 are differently distributed in the mitochondrial inner membrane and have distinct affinities to cyclophilin D. *Biochem J* 2001 September 1;358(Pt 2):349-58.
- (125) O'Malley K, Pratt P, Robertson J, Lilly M, Douglas MG. Selection of the nuclear gene for the mitochondrial adenine nucleotide translocator by genetic complementation of the op1 mutation in yeast. *J Biol Chem* 1982 February 25;257(4):2097-103.
- (126) Endres M, Neupert W, Brunner M. Transport of the ADP/ATP carrier of mitochondria from the TOM complex to the TIM22.54 complex. *EMBO J* 1999 June 15;18(12):3214-21.
- (127) Wiedemann N, Pfanner N, Ryan MT. The three modules of ADP/ATP carrier cooperate in receptor recruitment and translocation into mitochondria. *EMBO J* 2001 March 1;20(5):951-60.
- (128) Zimmermann R, Neupert W. Transport of proteins into mitochondria. Posttranslational transfer of ADP/ATP carrier into mitochondria in vitro. *Eur J Biochem* 1980 August;109(1):217-29.
- (129) Sollner T, Pfaller R, Griffiths G, Pfanner N, Neupert W. A mitochondrial import receptor for the ADP/ATP carrier. *Cell* 1990 July 13;62(1):107-15.
- (130) Battini R, Ferrari S, Kaczmarek L, Calabretta B, Chen ST, Baserga R. Molecular cloning of a cDNA for a human ADP/ATP carrier which is growth-regulated. *J Biol Chem* 1987 March 25;262(9):4355-9.
- (131) Neckelmann N, Li K, Wade RP, Shuster R, Wallace DC. cDNA sequence of a human skeletal muscle ADP/ATP translocator: lack of a leader peptide, divergence from a fibroblast translocator cDNA, and coevolution with mitochondrial DNA genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987 November;84(21):7580-4.
- (132) Houldsworth J, Attardi G. Two distinct genes for ADP/ATP translocase are expressed at the mRNA level in adult human liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988 January;85(2):377-81.
- (133) Cozens AL, Runswick MJ, Walker JE. DNA sequences of two expressed nuclear genes for human mitochondrial ADP/ATP translocase. *J Mol Biol* 1989 March 20;206(2):261-80.
- (134) Chen ST, Chang CD, Huebner K et al. A human ADP/ATP translocase gene has seven pseudogenes and localizes to chromosome X. *Somat Cell Mol Genet* 1990 March;16(2):143-9.

- (135) Ku DH, Kagan J, Chen ST, Chang CD, Baserga R, Wurzel J. The human fibroblast adenine nucleotide translocator gene. Molecular cloning and sequence. *J Biol Chem* 1990 September 25;265(27):16060-3.
- (136) Dolce V, Scarcia P, Iacopetta D, Palmieri F. A fourth ADP/ATP carrier isoform in man: identification, bacterial expression, functional characterization and tissue distribution. *FEBS Lett* 2005 January 31;579(3):633-7.
- (137) Li K, Warner CK, Hodge JA et al. A human muscle adenine nucleotide translocator gene has four exons, is located on chromosome 4, and is differentially expressed. *J Biol Chem* 1989 August 25;264(24):13998-4004.
- (138) Slim R, Levilliers J, Ludecke HJ et al. A human pseudoautosomal gene encodes the ANT3 ADP/ATP translocase and escapes X-inactivation. *Genomics* 1993 April;16(1):26-33.
- (139) Gawaz M, Douglas MG, Klingenberg M. Structure-function studies of adenine nucleotide transport in mitochondria. II. Biochemical analysis of distinct AAC1 and AAC2 proteins in yeast. *J Biol Chem* 1990 August 25;265(24):14202-8.
- (140) Levy SE, Chen YS, Graham BH, Wallace DC. Expression and sequence analysis of the mouse adenine nucleotide translocase 1 and 2 genes. *Gene* 2000 August 22;254(1-2):57-66.
- (141) Stepien G, Torroni A, Chung AB, Hodge JA, Wallace DC. Differential expression of adenine nucleotide translocator isoforms in mammalian tissues and during muscle cell differentiation. *J Biol Chem* 1992 July 25;267(21):14592-7.
- (142) Doerner A, Pauschinger M, Badorff A et al. Tissue-specific transcription pattern of the adenine nucleotide translocase isoforms in humans. *FEBS Lett* 1997 September 8;414(2):258-62.
- (143) Halestrap AP, Davidson AM. Inhibition of Ca²⁺(+)-induced large-amplitude swelling of liver and heart mitochondria by cyclosporin is probably caused by the inhibitor binding to mitochondrial-matrix peptidyl-prolyl cis-trans isomerase and preventing it interacting with the adenine nucleotide translocase. *Biochem J* 1990 May 15;268(1):153-60.
- (144) de Macedo DV, Nepomuceno ME, Pereira-da-Silva L. Involvement of the ADP/ATP carrier in permeabilization processes of the inner mitochondrial membrane. *Eur J Biochem* 1993 August 1;215(3):595-600.
- (145) Shimizu S, Shinohara Y, Tsujimoto Y. Bax and Bcl-xL independently regulate apoptotic changes of yeast mitochondria that require VDAC but not adenine nucleotide translocator. *Oncogene* 2000 September 7;19(38):4309-18.
- (146) Vieira HL, Haouzi D, El HC et al. Permeabilization of the mitochondrial inner membrane during apoptosis: impact of the adenine nucleotide translocator. *Cell Death Differ* 2000 December;7(12):1146-54.
- (147) Halestrap AP, Brennerb C. The adenine nucleotide translocase: a central component of the mitochondrial permeability transition pore and key player in cell death. *Curr Med Chem* 2003 August;10(16):1507-25.
- (148) Kokoszka JE, Waymire KG, Levy SE et al. The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore. *Nature* 2004 January 29;427(6973):461-5.
- (149) Halestrap AP. What is the mitochondrial permeability transition pore? *J Mol Cell Cardiol* 2009 June;46(6):821-31.

- (150) Baines CP, Molkentin JD. Adenine nucleotide translocase-1 induces cardiomyocyte death through upregulation of the pro-apoptotic protein Bax. *J Mol Cell Cardiol* 2009 June;46(6):969-77.
- (151) Bottero V, Rossi F, Samson M, Mari M, Hofman P, Peyron JF. I κ B α , the NF- κ B inhibitory subunit, interacts with ANT, the mitochondrial ATP/ADP translocator. *J Biol Chem* 2001 June 15;276(24):21317-24.
- (152) Sharer JD, Shern JF, Van VH, Wallace DC, Kahn RA. ARL2 and BART enter mitochondria and bind the adenine nucleotide transporter. *Mol Biol Cell* 2002 January;13(1):71-83.
- (153) Baines CP, Song CX, Zheng YT et al. Protein kinase Cepsilon interacts with and inhibits the permeability transition pore in cardiac mitochondria. *Circ Res* 2003 May 2;92(8):873-80.
- (154) Nishihara M, Miura T, Miki T et al. Modulation of the mitochondrial permeability transition pore complex in GSK-3beta-mediated myocardial protection. *J Mol Cell Cardiol* 2007 November;43(5):564-70.
- (155) Goldmacher VS, Bartle LM, Skaletskaya A et al. A cytomegalovirus-encoded mitochondria-localized inhibitor of apoptosis structurally unrelated to Bcl-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999 October 26;96(22):12536-41.
- (156) Jacotot E, Ferri KF, El HC et al. Control of mitochondrial membrane permeabilization by adenine nucleotide translocator interacting with HIV-1 viral protein rR and Bcl-2. *J Exp Med* 2001 February 19;193(4):509-19.
- (157) Schonfeld P, Schild L, Bohnensack R. Expression of the ADP/ATP carrier and expansion of the mitochondrial (ATP + ADP) pool contribute to postnatal maturation of the rat heart. *Eur J Biochem* 1996 November 1;241(3):895-900.
- (158) Barath P, Luciakova K, Hodny Z, Li R, Nelson BD. The growth-dependent expression of the adenine nucleotide translocase-2 (ANT2) gene is regulated at the level of transcription and is a marker of cell proliferation. *Exp Cell Res* 1999 May 1;248(2):583-8.
- (159) Bauer MK, Schubert A, Rocks O, Grimm S. Adenine nucleotide translocase-1, a component of the permeability transition pore, can dominantly induce apoptosis. *J Cell Biol* 1999 December 27;147(7):1493-502.
- (160) Zamora M, Granell M, Mampel T, Vinas O. Adenine nucleotide translocase 3 (ANT3) overexpression induces apoptosis in cultured cells. *FEBS Lett* 2004 April 9;563(1-3):155-60.
- (161) Rodic N, Oka M, Hamazaki T et al. DNA methylation is required for silencing of ant4, an adenine nucleotide translocase selectively expressed in mouse embryonic stem cells and germ cells. *Stem Cells* 2005 October;23(9):1314-23.
- (162) Marzo I, Brenner C, Zamzami N et al. Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science* 1998 September 25;281(5385):2027-31.
- (163) Brenner C, Cadiou H, Vieira HL et al. Bcl-2 and Bax regulate the channel activity of the mitochondrial adenine nucleotide translocator. *Oncogene* 2000 January 20;19(3):329-36.
- (164) Zamzami N, El HC, Maisse C et al. Bid acts on the permeability transition pore complex to induce apoptosis. *Oncogene* 2000 December 14;19(54):6342-50.
- (165) Brustovetsky N, Klingenberg M. Mitochondrial ADP/ATP carrier can be reversibly converted into a large channel by Ca²⁺. *Biochemistry* 1996 July 2;35(26):8483-8.

- (166) Ruck A, Dolder M, Wallimann T, Brdiczka D. Reconstituted adenine nucleotide translocase forms a channel for small molecules comparable to the mitochondrial permeability transition pore. *FEBS Lett* 1998 April 10;426(1):97-101.
- (167) Belzacq AS, Vieira HL, Verrier F et al. Bcl-2 and Bax modulate adenine nucleotide translocase activity. *Cancer Res* 2003 January 15;63(2):541-6.
- (168) Halestrap AP, Woodfield KY, Connern CP. Oxidative stress, thiol reagents, and membrane potential modulate the mitochondrial permeability transition by affecting nucleotide binding to the adenine nucleotide translocase. *J Biol Chem* 1997 February 7;272(6):3346-54.
- (169) Costantini P, Belzacq AS, Vieira HL et al. Oxidation of a critical thiol residue of the adenine nucleotide translocator enforces Bcl-2-independent permeability transition pore opening and apoptosis. *Oncogene* 2000 January 13;19(2):307-14.
- (170) McStay GP, Clarke SJ, Halestrap AP. Role of critical thiol groups on the matrix surface of the adenine nucleotide translocase in the mechanism of the mitochondrial permeability transition pore. *Biochem J* 2002 October 15;367(Pt 2):541-8.
- (171) Vieira HL, Belzacq AS, Haouzi D et al. The adenine nucleotide translocator: a target of nitric oxide, peroxynitrite, and 4-hydroxynonenal. *Oncogene* 2001 July 19;20(32):4305-16.
- (172) Le QK, Le QD. Involvement of the ADP/ATP carrier in calcium-induced perturbations of the mitochondrial inner membrane permeability: importance of the orientation of the nucleotide binding site. *Arch Biochem Biophys* 1988 September;265(2):249-57.
- (173) Belzacq AS, Vieira HL, Kroemer G, Brenner C. The adenine nucleotide translocator in apoptosis. *Biochimie* 2002 February;84(2-3):167-76.
- (174) Buchwald A, Till H, Unterberg C, Oberschmidt R, Figulla HR, Wiegand V. Alterations of the mitochondrial respiratory chain in human dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J* 1990 June;11(6):509-16.
- (175) Marin-Garcia J, Goldenthal MJ, Pierpont ME, Ananthakrishnan R. Impaired mitochondrial function in idiopathic dilated cardiomyopathy: biochemical and molecular analysis. *J Card Fail* 1995 September;1(4):285-91.
- (176) Arbustini E, Diegoli M, Fasani R et al. Mitochondrial DNA mutations and mitochondrial abnormalities in dilated cardiomyopathy. *Am J Pathol* 1998 November;153(5):1501-10.
- (177) Jarreta D, Orus J, Barrientos A et al. Mitochondrial function in heart muscle from patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Cardiovasc Res* 2000 March;45(4):860-5.
- (178) Scheubel RJ, Tostlebe M, Simm A et al. Dysfunction of mitochondrial respiratory chain complex I in human failing myocardium is not due to disturbed mitochondrial gene expression. *J Am Coll Cardiol* 2002 December 18;40(12):2174-81.
- (179) Bornstein B, Huertas R, Ochoa P et al. Mitochondrial gene expression and respiratory enzyme activities in cardiac diseases. *Biochim Biophys Acta* 1998 February 27;1406(1):85-90.
- (180) Koundouris A, Kass GE, Johnson CR, Boxall A, Sanders PG, Carter MJ. Poliovirus induces an early impairment of mitochondrial function by inhibiting succinate dehydrogenase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 2000 May 19;271(3):610-4.
- (181) Wen JJ, Dhiman M, Whorton EB, Garg NJ. Tissue-specific oxidative imbalance and mitochondrial dysfunction during *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Microbes Infect* 2008 August;10(10-11):1201-9.

- (182) Hardy CJ, Weiss RG, Bottomley PA, Gerstenblith G. Altered myocardial high-energy phosphate metabolites in patients with dilated cardiomyopathy. *Am Heart J* 1991 September;122(3 Pt 1):795-801.
- (183) Masuda Y, Tateno Y, Ikehira H et al. High-energy phosphate metabolism of the myocardium in normal subjects and patients with various cardiomyopathies--the study using ECG gated MR spectroscopy with a localization technique. *Jpn Circ J* 1992 June;56(6):620-6.
- (184) de Roos A, Doornbos J, Luyten PR, Oosterwaal LJ, van der Wall EE, den Hollander JA. Cardiac metabolism in patients with dilated and hypertrophic cardiomyopathy: assessment with proton-decoupled P-31 MR spectroscopy. *J Magn Reson Imaging* 1992 November;2(6):711-9.
- (185) Neubauer S, Horn M, Cramer M et al. Myocardial phosphocreatine-to-ATP ratio is a predictor of mortality in patients with dilated cardiomyopathy. *Circulation* 1997 October 7;96(7):2190-6.
- (186) Nascimben L, Ingwall JS, Pauletto P et al. Creatine kinase system in failing and nonfailing human myocardium. *Circulation* 1996 October 15;94(8):1894-901.
- (187) Neubauer S, Remkes H, Spindler M et al. Downregulation of the Na(+)-creatine cotransporter in failing human myocardium and in experimental heart failure. *Circulation* 1999 November 2;100(18):1847-50.
- (188) Ingwall JS, Weiss RG. Is the failing heart energy starved? On using chemical energy to support cardiac function. *Circ Res* 2004 July 23;95(2):135-45.
- (189) Schlattner U, Tokarska-Schlattner M, Wallimann T. Mitochondrial creatine kinase in human health and disease. *Biochim Biophys Acta* 2006 February;1762(2):164-80.
- (190) Neubauer S. The failing heart--an engine out of fuel. *N Engl J Med* 2007 March 15;356(11):1140-51.
- (191) Dorner A, Giessen S, Gaub R et al. An isoform shift in the cardiac adenine nucleotide translocase expression alters the kinetic properties of the carrier in dilated cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail* 2006 January;8(1):81-9.
- (192) Schultheiss HP. Dysfunction of the ADP/ATP carrier as a causative factor for the disturbance of the myocardial energy metabolism in dilated cardiomyopathy. *Basic Res Cardiol* 1992;87 Suppl 1:311-20.
- (193) Sylven C, Lin L, Jansson E et al. Ventricular adenine nucleotide translocator mRNA is upregulated in dilated cardiomyopathy. *Cardiovasc Res* 1993 July;27(7):1295-9.
- (194) Schultheiss HP, Schulze K, Dorner A. Significance of the adenine nucleotide translocator in the pathogenesis of viral heart disease. *Mol Cell Biochem* 1996 October;163-164:319-27.
- (195) Dorner A, Schulze K, Rauch U, Schultheiss HP. Adenine nucleotide translocator in dilated cardiomyopathy: pathophysiological alterations in expression and function. *Mol Cell Biochem* 1997 September;174(1-2):261-9.
- (196) Dorner A, Pauschinger M, Schwimmbeck PL, Kuhl U, Schultheiss HP. The shift in the myocardial adenine nucleotide translocator isoform expression pattern is associated with an enteroviral infection in the absence of an active T-cell dependent immune response in human inflammatory heart disease. *J Am Coll Cardiol* 2000 June;35(7):1778-84.
- (197) De Marcos LC, Trezeguet V, Dianoux AC, Brandolin G, Lauquin GJ. The human mitochondrial ADP/ATP carriers: kinetic properties and biogenesis of wild-type and

- mutant proteins in the yeast *S. cerevisiae*. *Biochemistry* 2002 December 3;41(48):14412-20.
- (198) Graham BH, Waymire KG, Cottrell B, Trounce IA, MacGregor GR, Wallace DC. A mouse model for mitochondrial myopathy and cardiomyopathy resulting from a deficiency in the heart/muscle isoform of the adenine nucleotide translocator. *Nat Genet* 1997 July;16(3):226-34.
- (199) Esposito LA, Melov S, Panov A, Cottrell BA, Wallace DC. Mitochondrial disease in mouse results in increased oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999 April 27;96(9):4820-5.
- (200) Yin H, Stahl JS, Andrade FH et al. Eliminating the Ant1 isoform produces a mouse with CPEO pathology but normal ocular motility. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005 December;46(12):4555-62.
- (201) Deschauer M, Hudson G, Muller T, Taylor RW, Chinnery PF, Zierz S. A novel ANT1 gene mutation with probable germline mosaicism in autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia. *Neuromuscul Disord* 2005 April;15(4):311-5.
- (202) Jordens EZ, Palmieri L, Huizing M et al. Adenine nucleotide translocator 1 deficiency associated with Sengers syndrome. *Ann Neurol* 2002 July;52(1):95-9.
- (203) Sharer JD. The adenine nucleotide translocase type 1 (ANT1): a new factor in mitochondrial disease. *IUBMB Life* 2005 September;57(9):607-14.
- (204) Walther T, Tschöpe C, Sterner-Kock A et al. Accelerated mitochondrial adenosine diphosphate/adenosine triphosphate transport improves hypertension-induced heart disease. *Circulation* 2007 January 23;115(3):333-44.
- (205) Flierl A, Chen Y, Coskun PE, Samulski RJ, Wallace DC. Adeno-associated virus-mediated gene transfer of the heart/muscle adenine nucleotide translocator (ANT) in mouse. *Gene Ther* 2005 April;12(7):570-8.
- (206) Ning XH, Xu CS, Song YC et al. Hypothermia preserves function and signaling for mitochondrial biogenesis during subsequent ischemia. *Am J Physiol* 1998 March;274(3 Pt 2):H786-H793.
- (207) McLeod CJ, Jeyabalan AP, Minners JO, Clevenger R, Hoyt RF, Jr., Sack MN. Delayed ischemic preconditioning activates nuclear-encoded electron-transfer-chain gene expression in parallel with enhanced postanoxic mitochondrial respiratory recovery. *Circulation* 2004 August 3;110(5):534-9.
- (208) Chomczynski P, Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc* 2006;1(2):581-5.
- (209) Hodge R. Preparation of RNA gel blots. *Methods Mol Biol* 1994;28:49-54.
- (210) Feinberg AP, Vogelstein B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 1983 July 1;132(1):6-13.
- (211) Wang Y, Ebermann L, Sterner-Kock A et al. Myocardial overexpression of adenine nucleotide translocase 1 ameliorates diabetic cardiomyopathy in mice. *Exp Physiol* 2009 February;94(2):220-7.
- (212) Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001 May 1;29(9):e45.
- (213) Laemmli UK, Beguin F, Gujer-Kellenberger G. A factor preventing the major head protein of bacteriophage T4 from random aggregation. *J Mol Biol* 1970 January 14;47(1):69-85.

- (214) Greinacher A, Wesche J, Hammer E et al. Characterization of the human neutrophil alloantigen-3a. *Nat Med* 2010 January;16(1):45-8.
- (215) Ebermann L, Piper C, Kuhl U et al. Impact of myocardial inflammation on cytosolic and mitochondrial creatine kinase activity and expression. *Basic Res Cardiol* 2009 May;104(3):247-57.
- (216) Westermann D, Knollmann BC, Steendijk P et al. Diltiazem treatment prevents diastolic heart failure in mice with familial hypertrophic cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail* 2006 March;8(2):115-21.
- (217) Wang Y, de Waard MC, Sterner-Kock A et al. Cardiomyocyte-restricted over-expression of C-type natriuretic peptide prevents cardiac hypertrophy induced by myocardial infarction in mice. *Eur J Heart Fail* 2007 June;9(6-7):548-57.
- (218) 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 December;169(6):2085-93.
- (219) Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 1990 October 5;215(3):403-10.
- (220) 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 June;9(6):1311-9.
- (221) Saks VA, Lipina NV, Smirnov VN, Chazov EI. Studies of energy transport in heart cells. The functional coupling between mitochondrial creatine phosphokinase and ATP ADP translocase: kinetic evidence. *Arch Biochem Biophys* 1976 March;173(1):34-41.
- (222) Bessman SP, Carpenter CL. The creatine-creatine phosphate energy shuttle. *Annu Rev Biochem* 1985;54:831-62.
- (223) Wallimann T, Dolder M, Schlattner U et al. Some new aspects of creatine kinase (CK): compartmentation, structure, function and regulation for cellular and mitochondrial bioenergetics and physiology. *Biofactors* 1998;8(3-4):229-34.
- (224) Schlegel J, Zurbriggen B, Wegmann G, Wyss M, Eppenberger HM, Wallimann T. Native mitochondrial creatine kinase forms octameric structures. I. Isolation of two interconvertible mitochondrial creatine kinase forms, dimeric and octameric mitochondrial creatine kinase: characterization, localization, and structure-function relationships. *J Biol Chem* 1988 November 15;263(32):16942-53.
- (225) Jacobs H, Heldt HW, Klingenberg M. High activity of creatine kinase in mitochondria from muscle and brain and evidence for a separate mitochondrial isoenzyme of creatine kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 1964 August 11;16(6):516-21.
- (226) Yuan JP, Zhao W, Wang HT et al. Coxsackievirus B3-induced apoptosis and caspase-3. *Cell Res* 2003 June;13(3):203-9.
- (227) Dennehey BK, Leinwand LA, Krauter KS. Diversity in transcriptional start site selection and alternative splicing affects the 5'-UTR of mouse striated muscle myosin transcripts. *J Muscle Res Cell Motil* 2006;27(8):559-75.
- (228) Bonnevie-Nielsen V, Steffes MW, Lernmark A. A major loss in islet mass and B-cell function precedes hyperglycemia in mice given multiple low doses of streptozotocin. *Diabetes* 1981 May;30(5):424-9.
- (229) Fiordaliso F, Li B, Latini R et al. Myocyte death in streptozotocin-induced diabetes in rats in angiotensin II- dependent. *Lab Invest* 2000 April;80(4):513-27.

- (230) Cai L. Diabetic cardiomyopathy and its prevention by metallothionein: experimental evidence, possible mechanisms and clinical implications. *Curr Med Chem* 2007;14(20):2193-203.
- (231) Feuvray D, Darmellah A. Diabetes-related metabolic perturbations in cardiac myocyte. *Diabetes Metab* 2008 February;34 Suppl 1:S3-S9.
- (232) Tschöpe C, Westermann D. Development of diabetic cardiomyopathy and the kallikrein-kinin system--new insights from B1 and B2 receptor signaling. *Biol Chem* 2008 June;389(6):707-11.
- (233) Ciapaite J, Bakker SJ, Diamant M et al. Metabolic control of mitochondrial properties by adenine nucleotide translocator determines palmitoyl-CoA effects. Implications for a mechanism linking obesity and type 2 diabetes. *FEBS J* 2006 December;273(23):5288-302.
- (234) Shen X, Zheng S, Thongboonkerd V et al. Cardiac mitochondrial damage and biogenesis in a chronic model of type 1 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004 November;287(5):E896-E905.
- (235) Howarth FC, Adem A, Adeghate EA et al. Distribution of atrial natriuretic peptide and its effects on contraction and intracellular calcium in ventricular myocytes from streptozotocin-induced diabetic rat. *Peptides* 2005 April;26(4):691-700.
- (236) Hansson A, Hance N, Dufour E et al. A switch in metabolism precedes increased mitochondrial biogenesis in respiratory chain-deficient mouse hearts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004 March 2;101(9):3136-41.
- (237) Lemieux H, Hoppel CL. Mitochondria in the human heart. *J Bioenerg Biomembr* 2009 April;41(2):99-106.
- (238) Anderson DR, Wilson JE, Carthy CM, Yang D, Kandolf R, McManus BM. Direct interactions of coxsackievirus B3 with immune cells in the splenic compartment of mice susceptible or resistant to myocarditis. *J Virol* 1996 July;70(7):4632-45.
- (239) Freeman GL, Colston JT, Zabalgoitia M, Chandrasekar B. Contractile depression and expression of proinflammatory cytokines and iNOS in viral myocarditis. *Am J Physiol* 1998 January;274(1 Pt 2):H249-H258.
- (240) Weinzierl AO, Szalay G, Wolburg H et al. 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 myocarditis. *J Virol* 2008 August;82(16):8149-60.
- (241) Lane JR, Neumann DA, Lafond-Walker A, Herskowitz A, Rose NR. Interleukin 1 or tumor necrosis factor can promote Coxsackie B3-induced myocarditis in resistant B10.A mice. *J Exp Med* 1992 April 1;175(4):1123-9.
- (242) Kang JS, Liu C, Derynck R. New regulatory mechanisms of TGF-beta receptor function. *Trends Cell Biol* 2009 August;19(8):385-94.
- (243) Remacle C, Barbieri MR, Cardol P, Hamel PP. Eukaryotic complex I: functional diversity and experimental systems to unravel the assembly process. *Mol Genet Genomics* 2008 August;280(2):93-110.
- (244) Fosslie E. Review: Mitochondrial medicine--cardiomyopathy caused by defective oxidative phosphorylation. *Ann Clin Lab Sci* 2003;33(4):371-95.
- (245) Wegrzyn P, Jura J, Kupiec T et al. A search for genes modulated by interleukin-6 alone or with interleukin-1beta in HepG2 cells using differential display analysis. *Biochim Biophys Acta* 2006 March;1762(3):319-28.

- (246) Wegrzyn P, Yarwood SJ, Fiegler N et al. Mimitin - a novel cytokine-regulated mitochondrial protein. *BMC Cell Biol* 2009;10:23.
- (247) Taylor LA, Carthy CM, Yang D et al. Host gene regulation during coxsackievirus B3 infection in mice: assessment by microarrays. *Circ Res* 2000 August 18;87(4):328-34.
- (248) Zell R, Geck P, Werdan K, Boekstegers P. TNF-alpha and IL-1 alpha inhibit both pyruvate dehydrogenase activity and mitochondrial function in cardiomyocytes: evidence for primary impairment of mitochondrial function. *Mol Cell Biochem* 1997 December;177(1-2):61-7.
- (249) Huttemann M, Lee I, Samavati L, Yu H, Doan JW. Regulation of mitochondrial oxidative phosphorylation through cell signaling. *Biochim Biophys Acta* 2007 December;1773(12):1701-20.
- (250) Samavati L, Lee I, Mathes I, Lottspeich F, Huttemann M. Tumor necrosis factor alpha inhibits oxidative phosphorylation through tyrosine phosphorylation at subunit I of cytochrome c oxidase. *J Biol Chem* 2008 July 25;283(30):21134-44.
- (251) Lancaster JR, Jr., Laster SM, Gooding LR. Inhibition of target cell mitochondrial electron transfer by tumor necrosis factor. *FEBS Lett* 1989 May 8;248(1-2):169-74.
- (252) Li YY, Chen D, Watkins SC, Feldman AM. Mitochondrial abnormalities in tumor necrosis factor-alpha-induced heart failure are associated with impaired DNA repair activity. *Circulation* 2001 November 13;104(20):2492-7.
- (253) Sanchez-Alcazar JA, Schneider E, Martinez MA et al. Tumor necrosis factor-alpha increases the steady-state reduction of cytochrome b of the mitochondrial respiratory chain in metabolically inhibited L929 cells. *J Biol Chem* 2000 May 5;275(18):13353-61.
- (254) ISAACS A, PORTERFIELD JS, BARON S. The influence of oxygenation on virus growth. II. Effect on the antiviral action of interferon. *Virology* 1961 August;14:450-5.
- (255) Daliento L, Calabrese F, Tona F et al. Successful treatment of enterovirus-induced myocarditis with interferon-alpha. *J Heart Lung Transplant* 2003 February;22(2):214-7.
- (256) Fairweather D, Frisancho-Kiss S, Yusung SA et al. Interferon-gamma protects against chronic viral myocarditis by reducing mast cell degranulation, fibrosis, and the profibrotic cytokines transforming growth factor-beta 1, interleukin-1 beta, and interleukin-4 in the heart. *Am J Pathol* 2004 December;165(6):1883-94.
- (257) Leipner C, Grun K, Borchers M, Stelzner A. The outcome of coxsackievirus B3-(CVB3-) induced myocarditis is influenced by the cellular immune status. *Herz* 2000 May;25(3):245-8.
- (258) Dorner A, Schultheiss HP. The myocardial expression of the adenine nucleotide translocator isoforms is specifically altered in dilated cardiomyopathy. *Herz* 2000 May;25(3):176-80.
- (259) Saks V, Dzeja P, Schlattner U, Vendelin M, Terzic A, Wallimann T. Cardiac system bioenergetics: metabolic basis of the Frank-Starling law. *J Physiol* 2006 March 1;571(Pt 2):253-73.
- (260) Hiraoka Y, Kishimoto C, Kurokawa M, Ochiai H, Sasayama S. Effects of polyethylene glycol conjugated superoxide dismutase on coxsackievirus B3 myocarditis in mice. *Cardiovasc Res* 1992 October;26(10):956-61.
- (261) Hiraoka Y, Kishimoto C, Takada H et al. Role of oxygen derived free radicals in the pathogenesis of coxsackievirus B3 myocarditis in mice. *Cardiovasc Res* 1993 June;27(6):957-61.

- (262) Beck MA, Handy J, Levander OA. The role of oxidative stress in viral infections. *Ann N Y Acad Sci* 2000;917:906-12.
- (263) Kyto V, Lapatto R, Lakkisto P et al. Glutathione depletion and cardiomyocyte apoptosis in viral myocarditis. *Eur J Clin Invest* 2004 March;34(3):167-75.
- (264) Pinsky DJ, Cai B, Yang X, Rodriguez C, Sciacca RR, Cannon PJ. The lethal effects of cytokine-induced nitric oxide on cardiac myocytes are blocked by nitric oxide synthase antagonism or transforming growth factor beta. *J Clin Invest* 1995 February;95(2):677-85.
- (265) Langen RC, Schols AM, Kelders MC, Wouters EF, Janssen-Heininger YM. Inflammatory cytokines inhibit myogenic differentiation through activation of nuclear factor-kappaB. *FASEB J* 2001 May;15(7):1169-80.
- (266) Nose PS. Cytokines and reperfusion injury. *J Card Surg* 1993 March;8(2 Suppl):305-8.
- (267) Bryant D, Becker L, Richardson J et al. Cardiac failure in transgenic mice with myocardial expression of tumor necrosis factor-alpha. *Circulation* 1998 April 14;97(14):1375-81.
- (268) Thielmann M, Dorge H, Martin C et al. Myocardial dysfunction with coronary microembolization: signal transduction through a sequence of nitric oxide, tumor necrosis factor-alpha, and sphingosine. *Circ Res* 2002 April 19;90(7):807-13.
- (269) Skyschally A, Gres P, Hoffmann S et al. Bidirectional role of tumor necrosis factor-alpha in coronary microembolization: progressive contractile dysfunction versus delayed protection against infarction. *Circ Res* 2007 January 5;100(1):140-6.
- (270) Dolder M, Walzel B, Speer O, Schlattner U, Wallimann T. Inhibition of the mitochondrial permeability transition by creatine kinase substrates. Requirement for microcompartmentation. *J Biol Chem* 2003 May 16;278(20):17760-6.
- (271) Vysokikh MY, Brdiczka D. The function of complexes between the outer mitochondrial membrane pore (VDAC) and the adenine nucleotide translocase in regulation of energy metabolism and apoptosis. *Acta Biochim Pol* 2003;50(2):389-404.
- (272) O'Gorman E, Beutner G, Dolder M, Koretsky AP, Brdiczka D, Wallimann T. The role of creatine kinase in inhibition of mitochondrial permeability transition. *FEBS Lett* 1997 September 8;414(2):253-7.
- (273) Qin W, Khuchua Z, Cheng J, Boero J, Payne RM, Strauss AW. Molecular characterization of the creatine kinases and some historical perspectives. *Mol Cell Biochem* 1998 July;184(1-2):153-67.
- (274) Spindler M, Niebler R, Remkes H, Horn M, Lanz T, Neubauer S. Mitochondrial creatine kinase is critically necessary for normal myocardial high-energy phosphate metabolism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002 August;283(2):H680-H687.
- (275) Spindler M, Engelhardt S, Niebler R et al. Alterations in the myocardial creatine kinase system precede the development of contractile dysfunction in beta(1)-adrenergic receptor transgenic mice. *J Mol Cell Cardiol* 2003 April;35(4):389-97.
- (276) Derakhshan M, Willcocks MM, Salako MA, Kass GE, Carter MJ. Human herpesvirus 1 protein US3 induces an inhibition of mitochondrial electron transport. *J Gen Virol* 2006 August;87(Pt 8):2155-9.
- (277) Gibbs JS, Malide D, Hornung F, Bennink JR, Yewdell JW. The influenza A virus PB1-F2 protein targets the inner mitochondrial membrane via a predicted basic amphipathic helix that disrupts mitochondrial function. *J Virol* 2003 July;77(13):7214-24.

- (278) Omura T, Yoshiyama M, Hayashi T et al. Core protein of hepatitis C virus induces cardiomyopathy. *Circ Res* 2005 February 4;96(2):148-50.
- (279) Buenz EJ, Howe CL. Picornaviruses and cell death. *Trends Microbiol* 2006 January;14(1):28-36.
- (280) Higuchi M, Proske RJ, Yeh ET. Inhibition of mitochondrial respiratory chain complex I by TNF results in cytochrome c release, membrane permeability transition, and apoptosis. *Oncogene* 1998 November 12;17(19):2515-24.
- (281) Ide T, Tsutsui H, Kinugawa S et al. Mitochondrial electron transport complex I is a potential source of oxygen free radicals in the failing myocardium. *Circ Res* 1999 August 20;85(4):357-63.
- (282) Lenaz G. The mitochondrial production of reactive oxygen species: mechanisms and implications in human pathology. *IUBMB Life* 2001 September;52(3-5):159-64.
- (283) Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL, Lesnefsky EJ. Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J Biol Chem* 2003 September 19;278(38):36027-31.
- (284) Circu ML, Aw TY. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic Biol Med* 2010 March 15;48(6):749-62.
- (285) Benedict CA, Norris PS, Ware CF. To kill or be killed: viral evasion of apoptosis. *Nat Immunol* 2002 November;3(11):1013-8.
- (286) Skulachev VP. Possible role of reactive oxygen species in antiviral defense. *Biochemistry (Mosc)* 1998 December;63(12):1438-40.
- (287) Herrera B, Murillo MM, varez-Barrientos A, Beltran J, Fernandez M, Fabregat I. Source of early reactive oxygen species in the apoptosis induced by transforming growth factor-beta in fetal rat hepatocytes. *Free Radic Biol Med* 2004 January 1;36(1):16-26.
- (288) Hussain SP, Amstad P, He P et al. p53-induced up-regulation of MnSOD and GPx but not catalase increases oxidative stress and apoptosis. *Cancer Res* 2004 April 1;64(7):2350-6.
- (289) Horwitz MS, Knudsen M, Ilic A, Fine C, Sarvetnick N. Transforming growth factor-beta inhibits coxsackievirus-mediated autoimmune myocarditis. *Viral Immunol* 2006;19(4):722-33.
- (290) Lena A, Rechichi M, Salvetti A et al. The silencing of adenine nucleotide translocase isoform 1 induces oxidative stress and programmed cell death in ADF human glioblastoma cells. *FEBS J* 2010 July;277(13):2853-67.
- (291) Woo YJ, Zhang JC, Vijayasathy C et al. Recombinant adenovirus-mediated cardiac gene transfer of superoxide dismutase and catalase attenuates postischemic contractile dysfunction. *Circulation* 1998 November 10;98(19 Suppl):II255-II260.
- (292) Burwell LS, Nadtochiy SM, Brookes PS. Cardioprotection by metabolic shut-down and gradual wake-up. *J Mol Cell Cardiol* 2009 June;46(6):804-10.
- (293) Echtay KS, Esteves TC, Pakay JL et al. A signalling role for 4-hydroxy-2-nonenal in regulation of mitochondrial uncoupling. *EMBO J* 2003 August 15;22(16):4103-10.
- (294) Chen Q, Camara AK, Stowe DF, Hoppel CL, Lesnefsky EJ. Modulation of electron transport protects cardiac mitochondria and decreases myocardial injury during ischemia and reperfusion. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007 January;292(1):C137-C147.

- (295) Sanchez-Alcazar JA, Hernandez I, De la Torre MP et al. Down-regulation of tumor necrosis factor receptors by blockade of mitochondrial respiration. *J Biol Chem* 1995 October 13;270(41):23944-50.
- (296) Won JC, Park JY, Kim YM et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1-alpha overexpression prevents endothelial apoptosis by increasing ATP/ADP translocase activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010 February;30(2):290-7.
- (297) Bujak M, Frangogiannis NG. The role of IL-1 in the pathogenesis of heart disease. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2009 May;57(3):165-76.
- (298) Colston JT, Chandrasekar B, Freeman GL. Expression of apoptosis-related proteins in experimental coxsackievirus myocarditis. *Cardiovasc Res* 1998 April;38(1):158-68.
- (299) Ligons DL, Guler ML, Li HS, Rose NR. A locus on chromosome 1 promotes susceptibility of experimental autoimmune myocarditis and lymphocyte cell death. *Clin Immunol* 2009 January;130(1):74-82.
- (300) Venteo L, Bourlet T, Renois F et al. Enterovirus-related activation of the cardiomyocyte mitochondrial apoptotic pathway in patients with acute myocarditis. *Eur Heart J* 2010 March;31(6):728-36.
- (301) Herskowitz A, Beisel KW, Wolfgram LJ, Rose NR. Coxsackievirus B3 murine myocarditis: wide pathologic spectrum in genetically defined inbred strains. *Hum Pathol* 1985 July;16(7):671-3.
- (302) Abbate A, Sinagra G, Bussani R et al. Apoptosis in patients with acute myocarditis. *Am J Cardiol* 2009 October 1;104(7):995-1000.
- (303) Alter P, Maisch B. Escape from cardiomyocyte apoptosis by enterovirus persistence due to elevated soluble Fas-receptors. *Z Kardiol* 2004 July;93(7):524-32.
- (304) Dorner A, Schultheiss HP. Adenine nucleotide translocase in the focus of cardiovascular diseases. *Trends Cardiovasc Med* 2007 November;17(8):284-90.
- (305) Kobara M, Tatsumi T, Matoba S et al. Effect of ischemic preconditioning on mitochondrial oxidative phosphorylation and high energy phosphates in rat hearts. *J Mol Cell Cardiol* 1996 February;28(2):417-28.
- (306) Laclau MN, Boudina S, Thambo JB et al. Cardioprotection by ischemic preconditioning preserves mitochondrial function and functional coupling between adenine nucleotide translocase and creatine kinase. *J Mol Cell Cardiol* 2001 May;33(5):947-56.
- (307) Ng WA, Grupp IL, Subramaniam A, Robbins J. Cardiac myosin heavy chain mRNA expression and myocardial function in the mouse heart. *Circ Res* 1991 June;68(6):1742-50.
- (308) Boya P, Roumier T, Andreau K et al. Mitochondrion-targeted apoptosis regulators of viral origin. *Biochem Biophys Res Commun* 2003 May 9;304(3):575-81.
- (309) Dolder M, Wendt S, Wallimann T. Mitochondrial creatine kinase in contact sites: interaction with porin and adenine nucleotide translocase, role in permeability transition and sensitivity to oxidative damage. *Biol Signals Recept* 2001 January;10(1-2):93-111.
- (310) Carvajal K, Moreno-Sanchez R. Heart metabolic disturbances in cardiovascular diseases. *Arch Med Res* 2003 March;34(2):89-99.
- (311) An D, Rodrigues B. Role of changes in cardiac metabolism in development of diabetic cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006 October;291(4):H1489-H1506.

- (312) Yagyu H, Chen G, Yokoyama M et al. Lipoprotein lipase (LpL) on the surface of cardiomyocytes increases lipid uptake and produces a cardiomyopathy. *J Clin Invest* 2003 February;111(3):419-26.
- (313) Chiu HC, Kovacs A, Blanton RM et al. Transgenic expression of fatty acid transport protein 1 in the heart causes lipotoxic cardiomyopathy. *Circ Res* 2005 February 4;96(2):225-33.
- (314) Chiu HC, Kovacs A, Ford DA et al. A novel mouse model of lipotoxic cardiomyopathy. *J Clin Invest* 2001 April;107(7):813-22.
- (315) Finck BN, Lehman JJ, Leone TC et al. The cardiac phenotype induced by PPARalpha overexpression mimics that caused by diabetes mellitus. *J Clin Invest* 2002 January;109(1):121-30.
- (316) Nielsen LB, Bartels ED, Bollano E. Overexpression of apolipoprotein B in the heart impedes cardiac triglyceride accumulation and development of cardiac dysfunction in diabetic mice. *J Biol Chem* 2002 July 26;277(30):27014-20.
- (317) Pacher P, Liaudet L, Soriano FG, Mabley JG, Szabo E, Szabo C. The role of poly(ADP-ribose) polymerase activation in the development of myocardial and endothelial dysfunction in diabetes. *Diabetes* 2002 February;51(2):514-21.
- (318) Ghosh S, Rodrigues B. Cardiac cell death in early diabetes and its modulation by dietary fatty acids. *Biochim Biophys Acta* 2006 October;1761(10):1148-62.
- (319) Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molekularbiologie der Zelle. 4. Auflage (2004). Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KgaA, Weinheim.
- (320) Rapoport SM. Medizinische Biochemie. 8. völlig neu überarbeitete Auflage (1983). Verlag Volk und Gesundheit, Berlin.
- (321) Löffler G, Petrides PE. Biochemie und Pathobiochemie. (1998). Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, Mailand, Paris Singapur, Tokio.
- (322) Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. In Molecular cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. (1989). Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- (323) Smith AL. Preparation, properties and conditions for assay of mitochondria: Slaughterhouse material, small scale. *Methods Enzymol.* 1967; 10:81–86.
- (324) Hogan B, Beddington R, Costantini F, Lacy E. Manipulating the Mouse Embryo. 2nd ed. (1994). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- (325) Richer MJ, Poffenberger, MC, Horwitz, MS. Early inflammatory responses direct chronic autoimmunity development in the heart following coxsackievirus infection. *Future Virol* 2007;2(3):283-91.
- (326) Brand MD, Pakay JL, Ocloo A, Kokoszka J, Wallace DC, Brookes PS, Cornwall EJ. The basal proton conductance of mitochondria depends on adenine nucleotide translocase content. *Biochem J.* 2005 Dec 1;392(Pt 2):353-62.
- (327) Agol VI, Belov GA, Bienz K, Egger D, Kolesnikova MS, Raikhlin NT, Romanova LI, Smirnova EA, Tolskaya EA. Two types of death of poliovirus-infected cells: caspase involvement in the apoptosis but not cytopathic effect. *Virology.* 1998 Dec 20;252(2):343-53.
- (328) Carthy CM, Granville DJ, Watson KA, Anderson DR, Wilson JE, Yang D, Hunt DW, McManus BM. Caspase activation and specific cleavage of substrates after coxsackievirus B3-induced cytopathic effect in HeLa cells. *J Virol.* 1998 Sep;72(9):7669-75.

7 PUBLIKATIONSVERZEICHNIS

7.1 Veröffentlichungen

Walther T, Tschöpe C, Sterner-Kock A, Westermann D, Heringer-Walther S, Riad A, Nikolic A, Wang Y, Ebermann L, Siems WE, Bader M, Shakibaei M, Schultheiss HP, Dörner A. Accelerated mitochondrial adenosine diphosphate/adenosine triphosphate transport improves hypertension-induced heart disease. *Circulation*. 2007;115(3):333-44.

Ebermann L, Spillmann F, Sidiropoulos M, Escher F, Heringer-Walther S, Schultheiss HP, Tschöpe C, Walther T. The angiotensin-(1-7) receptor agonist AVE0991 is cardioprotective in diabetic rats. *Eur J Pharmacol*. 2008;590(1-3):276-80.

*Wang Y¹, Ebermann L¹, Sterner-Kock A, Wika S, Schultheiss HP, Dörner A, Walther T. Myocardial overexpression of adenine nucleotide translocase 1 ameliorates diabetic cardiomyopathy in mice. *Exp Physiol*. 2009;94(2):220-7.

*Ebermann L¹, Piper C¹, Kühl U, Klingel K, Schlattner U, Siafarikas N, Zeichhardt H, Schultheiss HP, Dörner A. Impact of myocardial inflammation on cytosolic and mitochondrial creatine kinase activity and expression. *Basic Res Cardiol*. 2009;104(3):247-57.

Wang Y, Moreira Mda C, Heringer-Walther S, Ebermann L, Schultheiss HP, Wessel N, Siems WE, Walther T. Plasma ACE2 activity is an independent prognostic marker in Chagas' disease and equally potent as BNP. *J Card Fail*. 2010;16(2):157-63.

*Ebermann L, Wika S, Vogelpohl I, Hammer E, Klingel K, Lassner D, Völker U, Zeichhardt H, Schultheiss HP, Dörner A. The Myocardial Coxsackievirus B3 Load Correlates with the Mitochondrial Function in Infected Mouse Hearts. (Manuskript in Vorbereitung)

*Diese Publikationen enthalten Daten aus der vorliegenden Arbeit.

7.2 Kongressbeiträge

Ebermann L, Sterner-Kock A, Tschöpe C, Westermann D, Riad A, Wang Y, Bader M, Schultheiss HP, Dörner A, Walther T. Stabilisierung der mitochondrialen Funktion durch herzspezifische Überexpression des Adeninnukleotid-Translokators 1 (ANT1) in

hypertensiven Renin-Ratten. (Vortrag) 30. wissenschaftlicher Kongresses der Deutschen Hypertonie Gesellschaft (2006)

Ebermann L, Piper C, Kühl U, Klingel K, Schultheiss HP, Dörner A. Das myokardiale Creatinkinase-System bei muriner und humaner Myokarditis. (Vortrag) 74. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie (2008)

Ebermann L, Piper C, Kühl U, Klingel K, Schultheiss HP, Dörner A. Myocardial inflammation modifies cytosolic and mitochondrial creatine kinase activity and expression. (Poster) European Society of Cardiology (2008)

Ebermann L, Wika S, Vogelpohl I, Klingel K, Hammer E, Völker U, Weithäuser A, Pinkert S, Lassner D, Fechner H, Rauch U, Kandolf R, Schultheiss HP, Dörner A. Significance of mitochondrial function in Cocksackievirus B3-induced myocarditis. (Poster) International Symposium „New Molecular Pathomechanisms and Novel Therapeutic Approaches in Heart Failure“ (2010)

7.3 Auszeichnungen

Young Investigator Award des 30. wissenschaftlichen Kongresses der Deutschen Hypertonie Gesellschaft (2006)

DANKSAGUNG

Professor Dr. Heinz-Peter Schultheiss sei gedankt für die freundliche Überlassung des Themas und seine Unterstützung.

Professor Dr. Petra Knaus und Professor Dr. Volker A. Erdmann bin ich zu großem Dank verpflichtet, für ihre Bereitschaft diese Arbeit im Fachbereich Biologie, Chemie und Pharmazie der Freien Universität Berlin zu vertreten.

Mein besonderer Dank gilt Dr. rer. nat. Andrea Dörner für die umfassende Betreuung, fortwährende Hilfsbereitschaft und freundliche Zusammenarbeit.

Ich danke Inga Vogelpohl und Sabine Knüppel für ihre Unterstützung bei den Laborarbeiten und das heitere Arbeitsklima. Für Letzteres auch großen Dank an die AGs Pels (Sandra, Chantip, Diana) und Walther (Florian, Yong), insbesondere an Professor Dr. Thomas Walther für viele hilfreiche Ratschläge und nahezu unendliche Geduld beim Publizieren.

Insbesondere möchte ich auch Sandra Pinkert und Alice Weithäuser für ihren Anteil an den Infektionsexperimenten danken. Weiterhin danke ich der AG von Professor Dr. Carsten Tschöpe für die Übernahme der hämodynamischen Messungen sowie Professor Dr. Karin Klingel, Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Tübingen, für die Durchführung der *in situ* Hybridisierung. Eben solcher Dank geht an Dr. Elke Hammer, Interfakultäres Institut für Genetik und Funktionelle Genomforschung, Ernst-Moritz-Arndt Universität Greifswald, für die massenspektrometrische Analyse.

Sehr herzlich bedanke ich mich auch bei den Mitgliedern der Kommission zur Vergabe von Promotionsstipendien für die Gewährung eines solchen.

Meinen Freunden und Mitstreitern danke ich für ihre offenen Ohren, Motivationsarbeit, Ablenkung und gemeinsame Urlaube, insbesondere Beate Kellert, Nathalie Veith und Henrick Schomacker.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir stets uneingeschränkt Unterstützung und Rückhalt bieten und mit Rat und Tat zur Seite stehen.

LEBENS LAUF

Der Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel erstellt wurde.

Berlin,.....