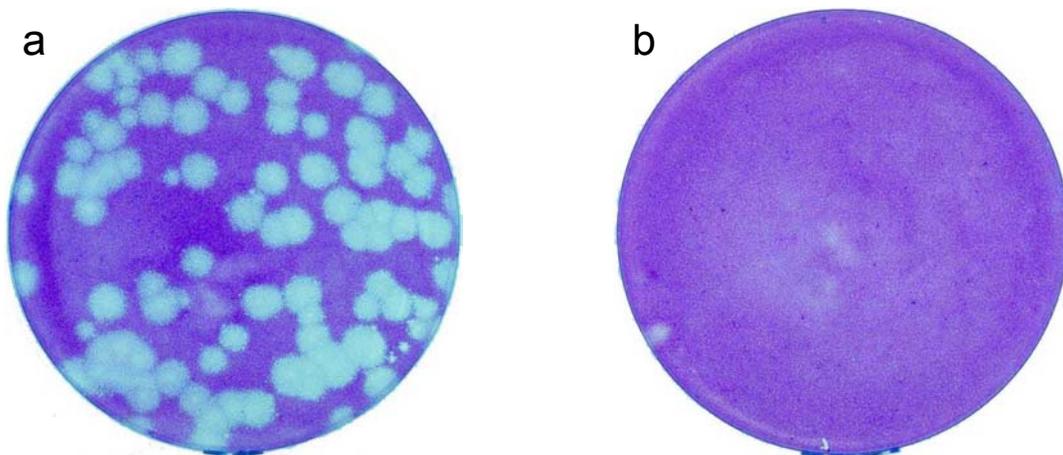


## 4. ERGEBNISSE

Vergleichende Untersuchungen zum Verlauf der CVB3-Infektion in C57BL/6J Mäusen, Perforin knock out Mäusen und  $\beta_2$  Mikroglobulin knock out Mäusen

### 4.1. Ergebnisse der Virustitration

Die Virustitrationen der auf Verozellen vermehrten cDNA-generierten, 3xHerz-passagierten CVB3-Virusvariante ergaben Titer zwischen  $1 \times 10^8$ - $5 \times 10^8$  pfu/ml. Bei der Untersuchung der Plaquemorphologie bezüglich der Plauegröße konnten überwiegend große Plaques beobachtet werden.



**Abbildung 3:** Plaquemorphologie der cDNA-generierten, 3xHerzpassagierten CVB3-Variante auf Verozellen (a), Negativkontrolle (b).

### 4.2. Tierversuchsplan

Von jedem der drei Mausstämme (C57BL/6J, Perforin knock out,  $\beta_2$  Mikroglobulin knock out) wurden jeweils 50 vier Wochen alte Mäuse mit je 10 Tieren pro Untersuchungszeitpunkt (4., 8., 12., 28. Tag p.i.) und je 10 Kontrolltieren eingeplant. Je 40 Tiere pro Mausstamm wurden mit  $1 \times 10^5$  pfu CVB3 in 0,2 ml PBS i.p. infiziert. Je 10 Tiere pro Stamm (Kontrolltiere) erhielten 0,2 ml PBS i.p..

Nach einer Infektionsdauer von 4, 8, 12 und 28 Tagen wurden die Mäuse mit CO<sub>2</sub>-Gas getötet und die Organe sowie Blut entnommen. Von den 10 Kontrolltieren wurden am 4. und 8. Tag nach Versuchsbeginn je 3 Mäuse und am 12. und 28. Tag je 2 Mäuse getötet.

### 4.3. Klinische Beobachtungen und Mortalität

Die klinische Beobachtung der infizierten Mäuse wurde im Vergleich zu den Kontrolltieren und unter Berücksichtigung der Nachtaktivität von Mäusen durchgeführt. Der Allgemeinzustand der Tiere wurde anhand des Exterieurs und Verhaltens beurteilt.

C57BL/6J und Perforin knock out Mäuse zeigten vom 6. bis 10. Tag p.i. folgende klinische Erscheinungen: gesträubtes Fell, Blässe von Schwanz und Ohren, mäßiger Gewichtsverlust und eingeschränktes Fluchtverhalten. Diese Symptome konnten bei 70-80% der infizierten Tiere beobachtet werden. Nach dem 10. Tag p.i. fiel bei den C57BL/6J und Perforin knock out Mäusen ein leicht zurückgebliebenes Wachstum im Vergleich zu den Kontrolltieren auf.  $\beta_2$  Mikroglobulin knock out Mäuse zeigten bereits ab dem 2. Tag p.i. klinische Symptome. Diese hielten bis zum Ende des Versuchs (28 Tage p.i.) an. Neben stark gesträubtem Fell, Blässe von Schwanz und Ohren, hohem Gewichtsverlust und eingeschränktem Fluchtverhalten ließ sich der Absatz von extrem großvolumigem, hellbraunem Kot beobachten. Die infizierten  $\beta_2$  Mikroglobulin knock out Mäuse blieben im Vergleich zu den nicht infizierten Kontrolltieren stark im Wachstum zurück. Die Morbidität bei den  $\beta_2$  Mikroglobulin knock out Mäusen betrug 100%, das heißt alle infizierten Tiere zeigten die geschilderten klinischen Erscheinungen.

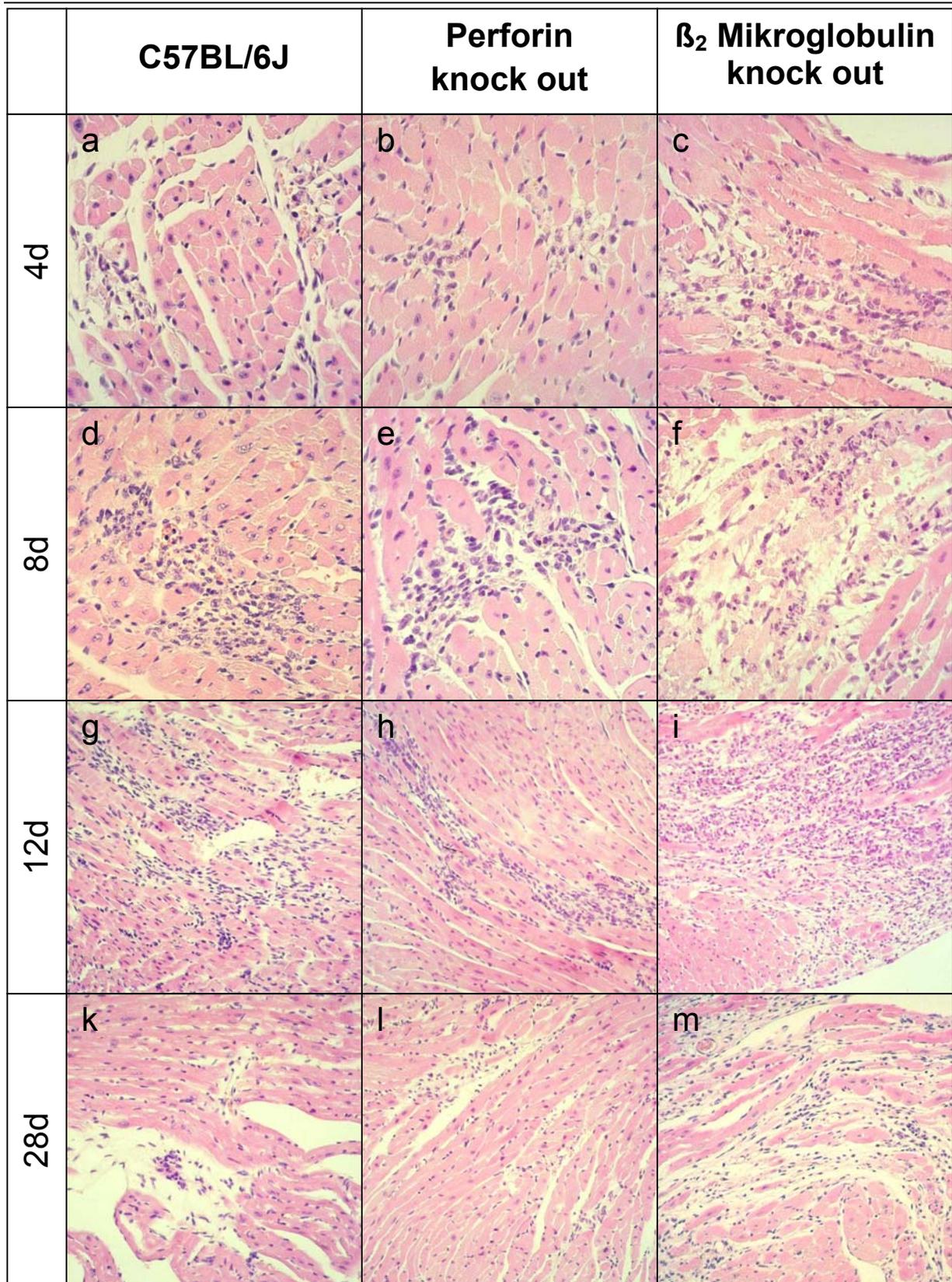
Die Mortalität der infizierten Mäuse korrelierte jedoch überraschenderweise nicht mit der Schwere der klinischen Erscheinungen. Bei den  $\beta_2$  Mikroglobulin knock out Mäusen gab es, ungeachtet der ausgeprägten klinischen Symptomatik keine Todesfälle, während sowohl eine C57BL/6J Maus 10 Tage p.i. als auch eine Perforin knock out Maus 11 Tage p.i. verstarb. Bei den nicht infizierten Kontrolltieren der drei Mausstämmen traten keine Todesfälle auf.

### **4.4. Vergleich der histopathologischen Myokardbefunde bei CVB3-infizierten Mäusen**

Die Beurteilung der histopathologischen Veränderungen erfolgte lichtmikroskopisch bei 80-, 200- und 400-facher Vergrößerung an HE-gefärbten Präparaten. Der homogene Verlauf der Erkrankung innerhalb der drei Mausstämmen im Hinblick auf die klinische Symptomatik lässt auf eine große Anzahl Tiere mit histopathologischen Myokardveränderungen schließen. Tatsächlich konnte bei allen drei Mausstämmen während der akuten Phase der Infektion (4, 8 und 12 Tage p.i.) in allen untersuchten Herzen histopathologische Myokardveränderungen festgestellt werden. 28 Tage p.i. betrug der Anteil der Tiere mit geringgradigem pathologischem Herzbefund bei den C57BL/6J und Perforin knock out Mäusen circa 20%. Im Gegensatz dazu wiesen 100% der  $\beta_2$  Mikroglobulin knock out Mäuse 28 Tage p.i. noch großflächige myokardiale Läsionen auf.

Das Myokard der CVB3-infizierten Mäuse zeigte hinsichtlich des im Verlauf der Infektion auftretenden Schweregrades pathologischer Veränderungen sowohl vom Mausstamm als auch vom Untersuchungszeitpunkt her Unterschiede. 4 Tage p.i. konnten bei allen drei Mausstämmen disseminiert im Myokard kleine Entzündungsherde beobachtet werden (Abb. 4 a-c). Die Entzündungsherde waren charakterisiert durch die Anwesenheit einzelner mononukleärer Infiltratzellen sowie durch die Nekrose einzelner Myozyten. 8 Tage p.i. ging die akute Entzündungsreaktion bei allen drei Mausstämmen einher mit massiver Infiltration mononukleärer Zellen des lymphatischen Systems sowie dem Untergang mehr oder weniger ausgedehnter Myokardareale (Abb. 4 d-f). 12 Tage p.i. konnte bei allen drei Mausstämmen ein Maximum an Entzündungszellinfiltraten sowie eine beginnende Fibrosierung der

4. Ergebnisse

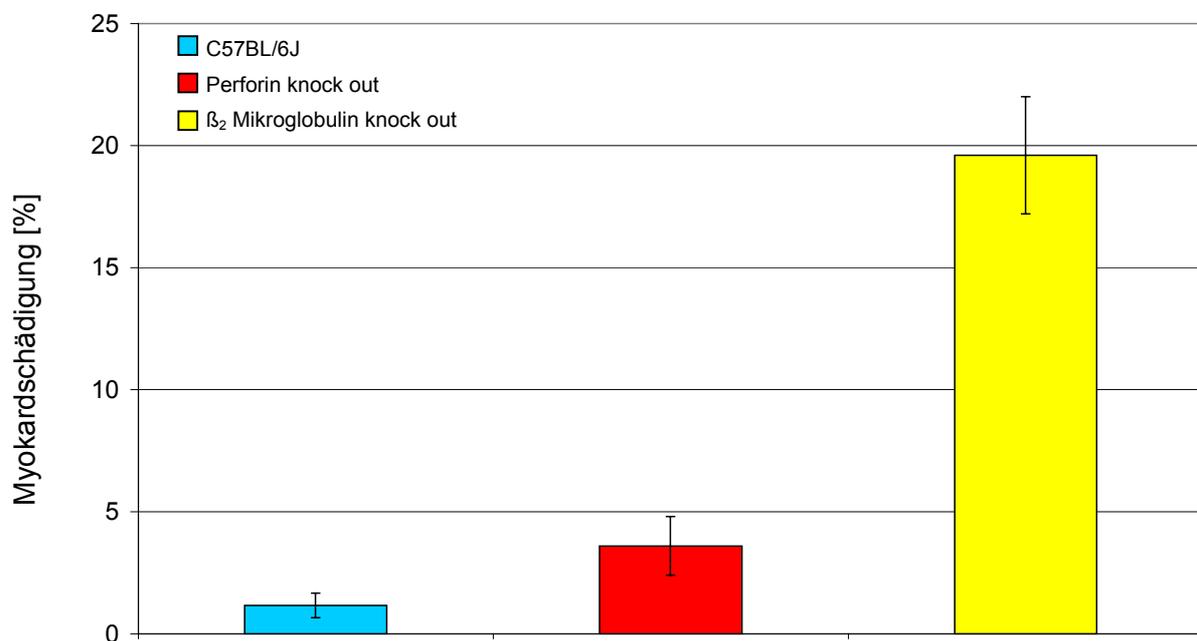


**Abbildung 4:** Übersicht über die histopathologischen Myokardbefunde im Verlauf der CVB3-Infektion. HE-Färbung; a-f 220-fache Vergrößerung, g-m 110-fache Vergrößerung.

#### 4. Ergebnisse

geschädigten Myokardareale beobachtet werden (Abb. 4 g-i). 28 Tage p.i. fanden sich bei einzelnen Tieren der C57BL/6 und Perforin-defizienten Mäuse vereinzelt kleine Fibroseareale mit Fibroblasten sowie einigen wenigen Infiltratzellen (Abb. 4 k-l). Im Gegensatz dazu zeigten alle untersuchten  $\beta_2$  Mikroglobulin knock out Mäuse 28 Tage p.i. ausgedehnte Fibroseareale mit zahlreichen Fibroblasten und mononukleären Entzündungszellen (Abb. 4 m).

Die quantitative Analyse der Myokardschädigung mittels Punktzählverfahren (siehe 3.2.10.3) 12 Tage p.i. ergab deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Mausstämmen: der Wildtyp-Stamm C57BL/6J wies eine relative Nekrosefläche von 1,16%  $\pm$ 0,5% auf. Bei den beiden immundefizienten Mausstämmen wurden großflächigere Myokardschädigungen gemessen, wobei die  $\beta_2$  Mikroglobulin knock out Mäuse beinahe die 20-fache (19,6%  $\pm$ 2,4%) und die Perforin knock out Mäuse die 3-fache (3,6%  $\pm$ 1,2%) Nekrosefläche im Vergleich zum Wildtyp-Stamm C57BL/6J aufwiesen (Abb. 5).

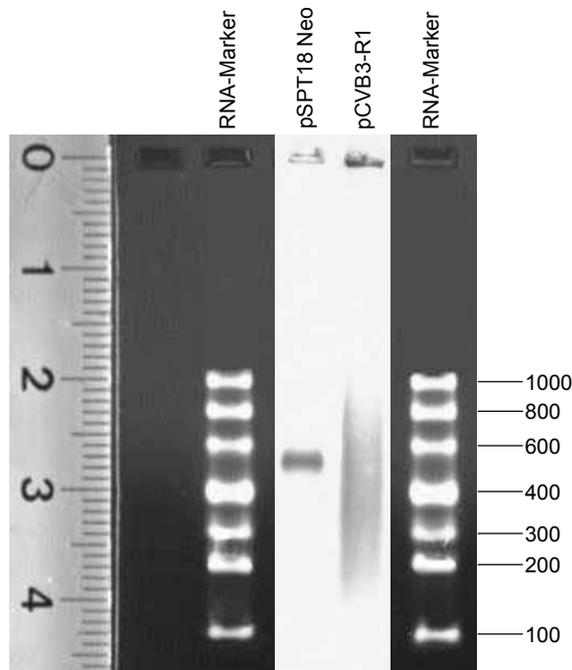


**Abbildung 5:** Relative Myokardschädigung (in %) 12 Tage p.i. bei C57BL/6J, Perforin knock out und  $\beta_2$  Mikroglobulin knock out Mäusen

**4.5. Nachweis enteroviraler RNA im Myokard CVB3-infizierter Mäuse mittels radioaktiver RNA-RNA *in situ* Hybridisierung und RT-PCR**

4.5.1. Generierung der CVB3-spezifischen Sonde für die *in situ* Hybridisierung

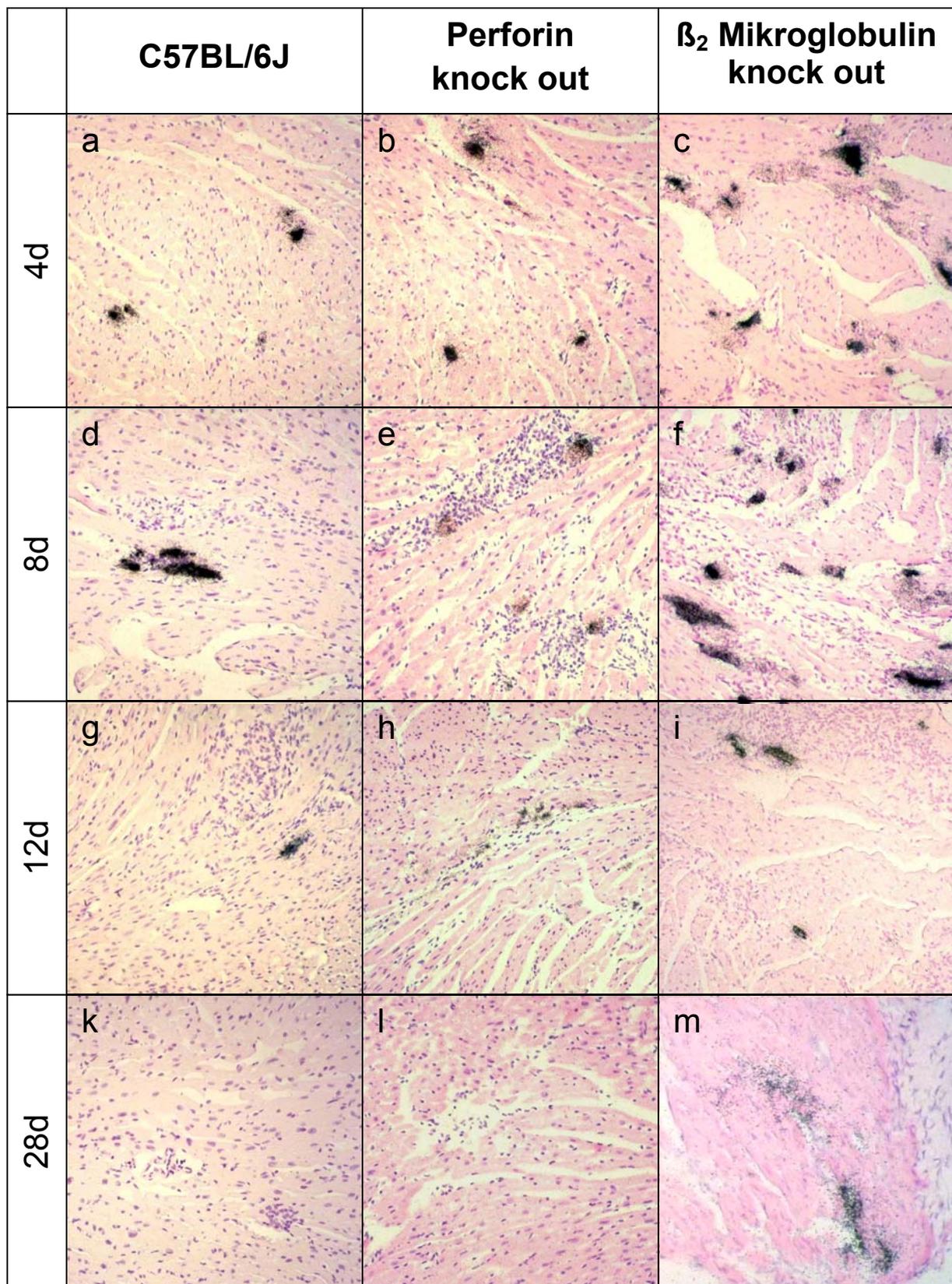
Zunächst erfolgte die Gewinnung reiner pCVB3-R1 Plasmid-DNA im präparativen Maßstab (300-500 µg Plasmid-DNA/100 ml Bakterienkultur). Nach Linearisierung des Plasmids pCVB3-R1 mit dem Restriktionsenzym SmaI wurde eine *in vitro* Transkription mit SP6 RNA-Polymerase in Gegenwart von radioaktiv markiertem <sup>35</sup>S-UTP durchgeführt. Die spezifische Aktivität der synthetisierten RNA, welche zum Nachweis von CVB3-Plusstrang-RNA eingesetzt wurde, betrug 4-8 x 10<sup>6</sup> cpm/µl. Nach Einstellung der Sondenlänge durch limitierte alkalische Hydrolyse wurde die Länge der Sondenfragmente mittels Gelelektrophorese und daran anschließender Autoradiographie überprüft (Abb. 6).



**Abbildung 6:** Gelelektrophorese der Kontrollsonde pSPT18 Neo sowie der hydrolysierten CVB3-RNA mit anschließender Autoradiographie

### 4.5.2. Vergleich der myokardialen Infektionsmuster in CVB3-infizierter Mäuse mittels radioaktiver RNA-RNA *in situ* Hybridisierung

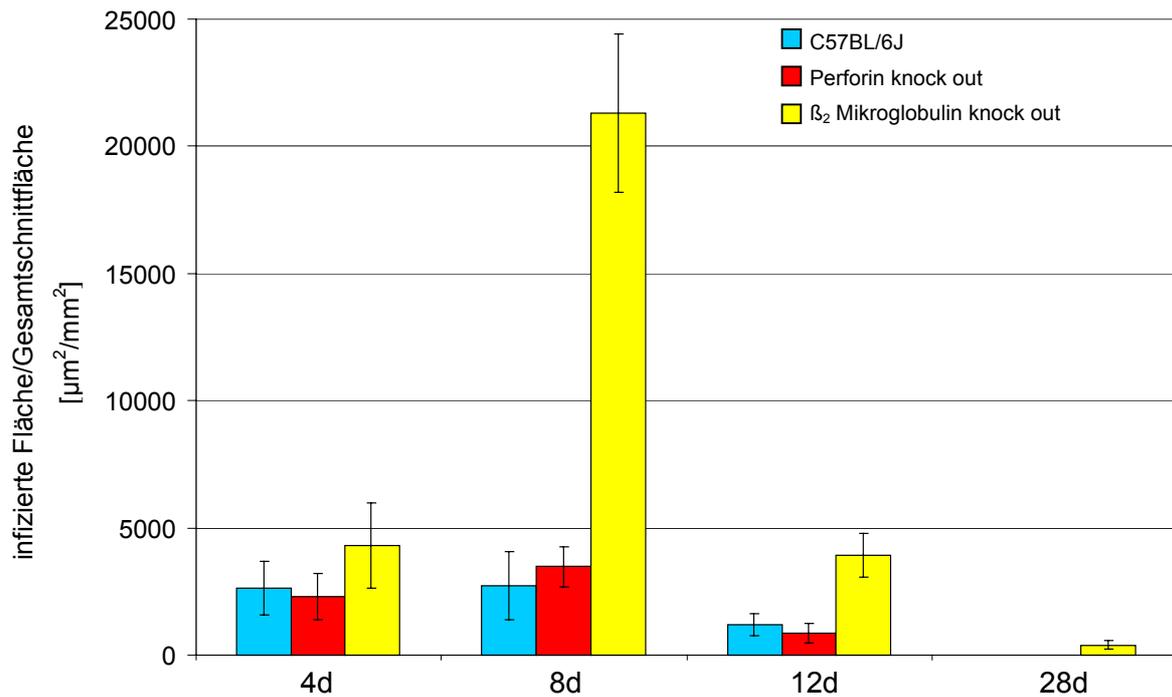
Der Nachweis enteroviraler RNA in den Myokardproben CVB3-infizierter Mäuse wurde mittels *in situ* Hybridisierung unter Verwendung einer Enterovirus-spezifischen, radioaktiv markierten RNA-Sonde an sechs Paraffinschnitten pro Mausherz durchgeführt. Die Auswertung erfolgte lichtmikroskopisch bei 80-, 200- und 400-facher Vergrößerung an HE-gefärbten Präparaten. Bei der CVB3-induzierten Myokarditis im Mausmodell können zwei Infektionsphasen, die akute und die persistente Phase der Infektion, unterschieden werden. Die akute Phase (4.-10. Tag p.i.) ist dadurch gekennzeichnet, daß sich der hämatogenen Infektion einzelner Myozyten (2.-4. Tag p.i.) eine Zell-zu-Zellausbreitung der Viren anschließt. Dabei kann das mittels *in situ* Hybridisierung nachgewiesene Infektionsmuster in Abhängigkeit vom Mausstamm einen unterschiedlichen Ausdehnungsgrad erreichen. 4 Tage p.i. wurden bei allen drei untersuchten Mausstämmen einzelne infizierte Myozyten disseminiert im Myokard nachgewiesen, wobei im Vergleich zu den C57BL/6J und Perforin knock out Mäusen (Abb. 7 a, b) die  $\beta_2$  Mikroglobulin knock out Mäuse bereits 4 Tage p.i. deutlich mehr autoradiographische Signale aufwiesen (Abb. 7 c) als. 8 Tage p.i. fand sich bei den C57BL/6J und Perforin knock out Mäusen eine geringgradige Zunahme der herdförmig begrenzten infizierten Fläche (Abb. 7 d, e), während bei den  $\beta_2$  Mikroglobulin knock out Mäusen zu diesem Zeitpunkt eine dramatische Ausbreitung der Infektion im Myokard zu beobachten war (Abb. 7 f). Am 12. Tag p.i. ließ sich bei allen drei Mausstämmen eine deutliche Abnahme der Anzahl infizierter Myozyten feststellen (Abb. 7 g, h, i), wobei die  $\beta_2$  Mikroglobulin knock out Mäuse die größte Abnahme an infizierter Fläche aufwiesen (Abb. 7 j). 28 Tage p.i. zeigten sich im Myokard der C57BL/6J und Perforin knock out Mäuse keine autoradiographischen Signale mehr (Abb. 7 k, l). Im Gegensatz dazu konnte 28 Tage p.i. bei den  $\beta_2$  Mikroglobulin knock out Mäusen enterovirale RNA im Myokard mittels *in situ* Hybridisierung nachgewiesen werden (Abb. 7 m), dabei waren 8 von 10 untersuchten Tieren Enterovirus-positiv. Dieser Befund sowie die Befunde der histopathologischen Untersuchung sprechen bei den C57BL/6J und Perforin knock out Mäusen für eine Ausheilung der enteroviralen Herzerkrankung. Dahingegen waren die  $\beta_2$  Mikroglobulin knock out Mäuse nicht in der Lage, im Verlauf der Infektion den Erreger aus dem Myokard zu eliminieren. Sie weisen 28 Tage p.i. eine chronische Myokarditis auf, die mit Viruspersistenz einhergeht.



**Abbildung 7:** Übersicht über die *in situ* Hybridisierungsbefunde im Verlauf der CVB3-Infektion. HE-Färbung; a-l 100-fache Vergrößerung, m 300-fache Vergrößerung.

Die der *in situ* Hybridisierung unterzogenen Gewebeproben wurden zusätzlich quantitativ mittels eines interaktiven Bildanalyse-Systems ausgewertet. Dabei konnten die Ergebnisse der qualitativen Bewertung bestätigt werden. 4 Tage p.i. betrug die infizierte Fläche [ $\mu\text{m}^2$ ] pro Gesamtschnittfläche [ $\text{mm}^2$ ] in C57BL/6J-Mäusen  $2633 \mu\text{m}^2/\text{mm}^2$ , in Perforin knock out Mäusen  $2300 \mu\text{m}^2/\text{mm}^2$  und in  $\beta_2$  Mikroglobulin knock out Mäusen  $4297 \mu\text{m}^2/\text{mm}^2$ . 8 Tage p.i. wurde an den hybridisierten Myokardproben der C57BL/6J Mäuse eine infizierte Fläche von  $2734 \mu\text{m}^2$  pro  $\text{mm}^2$  Gesamtschnittfläche ermittelt. Die Perforin knock out Mäuse wiesen mit  $3486 \mu\text{m}^2$  pro  $\text{mm}^2$  Gesamtschnittfläche eine geringfügig größere Ausbreitung der Infektion auf. Dies spricht bei den beiden Mausstämmen für eine eher geringgradige Zunahme der myokardialen Infektion. Im Myokard der  $\beta_2$  Mikroglobulin knock out Mäuse wurde hingegen bei  $21321 \mu\text{m}^2$  infizierter Fläche pro  $\text{mm}^2$  Gesamtschnittfläche eine circa 7-fach größere infizierte Fläche im Vergleich zu den beiden anderen Mausstämmen gemessen. Dieser Befund zeigt die großflächige Virusausbreitung im Myokard der  $\beta_2$  Mikroglobulin knock out Mäuse im Vergleich zu den beiden anderen Mausstämmen. 12 Tage p.i. zeigte sich im Myokard aller 3 Mausstämmen ein Rückgang der infizierten Fläche, wobei die  $\beta_2$  Mikroglobulin knock out Mäuse dann noch  $3926 \mu\text{m}^2$  infizierter Fläche pro  $\text{mm}^2$  Gesamtschnittfläche aufwiesen. Bei den C57BL/6J bzw. den Perforin knock out Mäusen wurden an den hybridisierten Myokardproben 12 Tage p.i.  $1200 \mu\text{m}^2$  bzw.  $850 \mu\text{m}^2$  infizierte Fläche pro  $\text{mm}^2$  Gesamtschnittfläche ermittelt. 28 Tage p.i. wies das Myokard der  $\beta_2$  Mikroglobulin knock out Mäuse immer noch eine infizierte Fläche von  $400 \mu\text{m}^2$  pro  $\text{mm}^2$  Gesamtschnittfläche auf, während das Myokard der C57BL/6J und Perforin knock out Mäuse zu diesem Zeitpunkt keine autoradiographischen Signale mehr zeigte. In Abbildung 8 sind die Ergebnisse der quantitativen Untersuchung graphisch dargestellt.

## 4. Ergebnisse

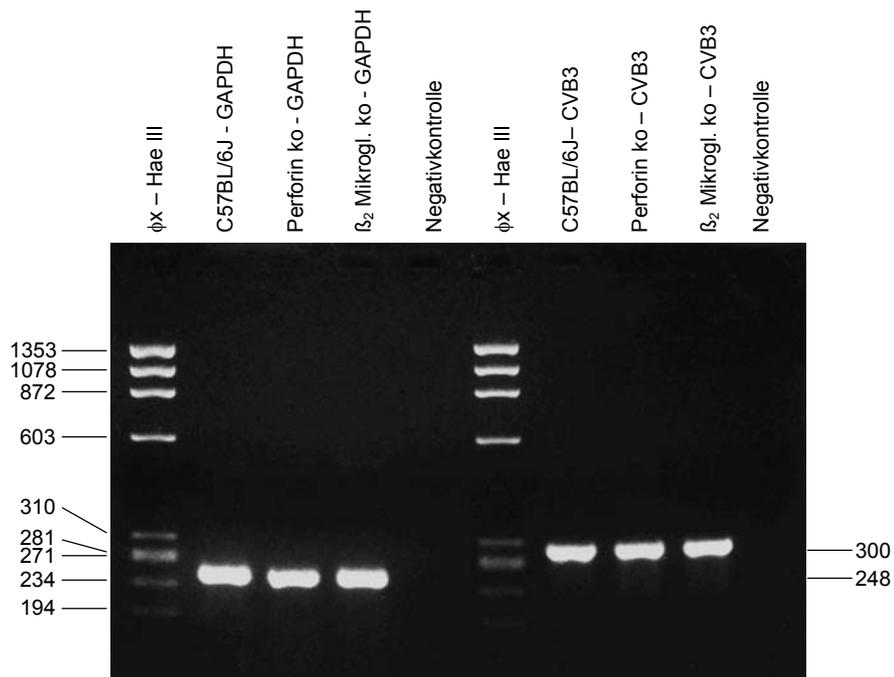


**Abbildung 8:** Quantifizierung der infizierten Myokardfläche bei C57BL/6J, Perforin knock out und  $\beta_2$  Mikroglobulin knock out Mäusen 4, 8, 12 und 28 Tage p.i.

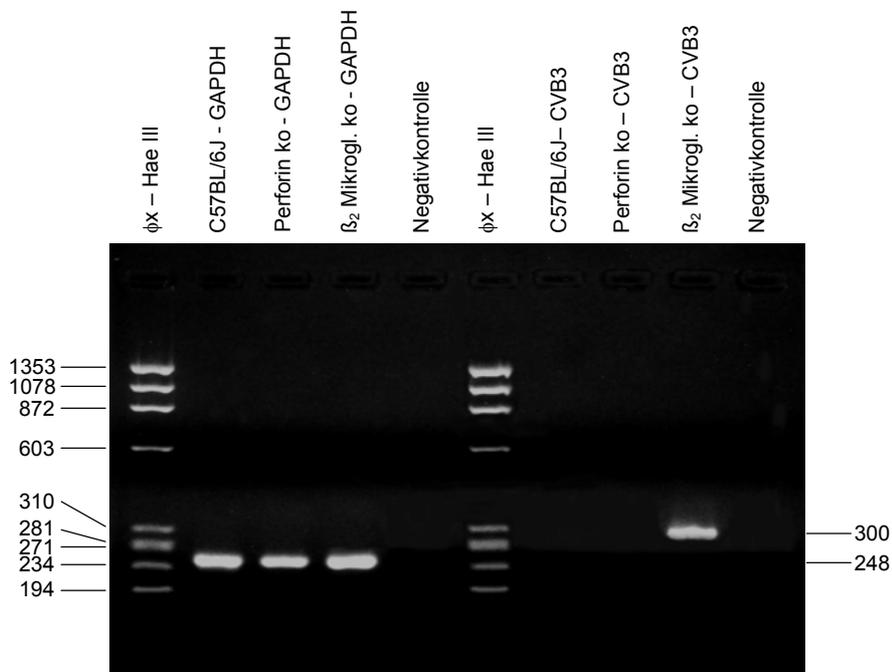
### 4.5.3. Nachweis enteroviraler RNA im Myokard infizierter Mäuse mittels RT-PCR

Zur Evaluierung der *in situ* Hybridisierung wurde eine RT-PCR mit enteroviruspezifischen Primern an Poly(A) RNA durchgeführt, welche aus nativem, schockgefrorenem Myokardgewebe CVB3-infizierter C57BL/6J, Perforin knock out und  $\beta_2$  Mikroglobulin knock out Mäuse 8 Tage p.i. und 28 Tage p.i. isoliert wurde. 8 Tage p.i. konnten bei allen drei Mausstämmen enterovirale Nukleinsäuresequenzen amplifiziert werden (Abb. 9/1). Korrespondierend zu den Ergebnissen der *in situ* Hybridisierung gelang dies 28 Tage p.i. nur noch bei den  $\beta_2$  Mikroglobulin knock out Mäusen (Abb. 9/2). Als Beleg für die Isolierung strukturell intakter und damit amplifizierbarer Poly(A) RNA wurden von jeder Myokardprobe 248 bp der Glyceraldehydphosphatdehydrogenase-mRNA mittels RT-PCR amplifiziert.

## 4. Ergebnisse



**Abbildung 9/1:** Gelelektrophorese nach RT-PCR zum Nachweis myokardialer CVB3-RNA in verschiedenen Mausstämmen 8 Tage p. i..



**Abbildung 9/2:** Gelelektrophorese nach RT-PCR zum Nachweis myokardialer CVB3-RNA in verschiedenen Mausstämmen 28 Tage p. i..