



---

seit 1558

**Experimentelle Untersuchungen zu Veränderungen in  
Sequenz und/oder Expression des Coxsackievirus-  
Adenovirus-Rezeptors (CAR) beim Menschen**

**Dissertation**

**zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium**

**(Dr. rer. nat.)**

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der  
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von

Dipl.-Biol. Martin Czolbe

geboren am 26.03.1976 in Freiberg/Sachs

1. Gutachter: PD Dr. Matthias Platzer, Jena
2. Gutachter: Prof. Dr. Andreas Henke, Jena
3. Gutachter: PD Dr. Albert Heim, Hannover

Tag der öffentlichen Verteidigung: 28.04.2011

*So eine Arbeit wird eigentlich nie fertig, man muss sie für fertig erklären, wenn man nach Zeit und Umständen das Möglichste getan hat.*

Johann Wolfgang von Goethe

<b>1</b>	<b>Zielstellung.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>3</b>
2.1	Herzinsuffizienz und Kardiomyopathien.....	3
2.2	Pathogenese der dilatativen Kardiomyopathie .....	7
2.2.1	Familiär-genetische Formen .....	8
2.2.2	Infektiöse Formen.....	11
2.2.3	Immunologische Formen .....	18
2.2.4	Toxische Formen .....	22
2.2.5	Idiopathische Formen .....	22
2.3	Der Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptor (CAR) .....	23
2.3.1	Aufbau .....	23
2.3.2	Biologische Funktion von CAR.....	26
2.3.3	CAR als Virusrezeptor.....	28
2.3.4	Bedeutung von CAR in der Gentherapie.....	31
<b>3</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>34</b>
3.1	Materialien .....	34
3.1.1	Geräte .....	34
3.1.2	DNA- und Proteinstandards.....	34
3.1.3	Oligonukleotide .....	34
3.1.4	Klinische Proben.....	36
3.1.5	Versuchstiere .....	37
3.1.6	Viren .....	37
3.1.7	Software .....	38
3.1.8	Datenbanken.....	38
3.2	Zellbiologische Methoden.....	38
3.2.1	Zellkultivierung .....	39
3.2.2	Infektion und/oder Inkubation mit Zytokinen.....	40
3.3	Virologische Methoden.....	40
3.3.1	Virusvermehrung.....	40
3.3.2	Bestimmung der Viruskonzentration .....	41
3.4	Molekularbiologische und -genetische Methoden .....	42
3.4.1	Untersuchungen zur CAR-Expression bei DCM-Patienten.....	42
3.4.2	Untersuchungen zur CAR-Expression im Mausmodell .....	45
3.4.3	Mutationsanalyse im humanen CAR-Gen .....	48
3.4.4	Mutationsanalyse in der CAR-Promotor-Region.....	50

3.4.5	Untersuchungen zur Beeinflussung der CAR-Expression im Zellmodell.....	51
3.5	Histologische Methoden .....	55
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>57</b>
4.1	Qualitative und quantitative Untersuchungen auf mRNA-Ebene im humanen Myokard .....	57
4.1.1	Qualitativer Nachweis der hCAR-Transkription .....	57
4.1.2	Equilibrierung der cDNA-Proben aus Myokardgewebe .....	57
4.1.3	Quantifizierung der cDNA-Proben durch semiquantitative RT-PCR.....	59
4.1.4	Darstellung der CAR-Expression im humanen Myokard durch Immunhistochemie.....	62
4.2	Quantitative Untersuchungen auf mRNA-Ebene im murinen Myokard .....	63
4.2.1	Quantifizierung der cDNA-Proben unter Zuhilfenahme des Haushaltsgens $\beta$ -Aktin .....	63
4.2.2	Quantifizierung der cDNA-Proben mittels Real-time PCR .....	66
4.3	Mutationsanalyse im humanen CAR-Gen .....	69
4.4	Untersuchungen im Zellmodell zur Beeinflussung der Expression des humanen CAR.....	73
4.4.1	Qualitativer Nachweis der CAR-Transkription in den verwendeten Zelllinien .....	73
4.4.2	Untersuchungen zum Einfluss der Virusinfektion.....	74
4.4.3	Untersuchungen zum Einfluss der Zelldichte.....	76
4.4.4	Untersuchungen zum Einfluss von Zytokinen.....	78
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>88</b>
5.1	Untersuchungen zur CAR-Expression im humanen Myokard ....	89
5.2	Untersuchungen zur CAR-Expression in murinen Geweben.....	93
5.3	Sequenzuntersuchungen im humanen CAR-Gen .....	98
5.4	Untersuchungen im Zellmodell .....	101
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>111</b>
<b>7</b>	<b>Summary.....</b>	<b>114</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>116</b>
<b>9</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>132</b>

## 1 Zielstellung

Coxsackieviren sind kardiotope Viren, die im Verdacht stehen, beim Menschen eine dilatative Kardiomyopathie (DCM) hervorzurufen. Im Mausmodell lösen sie eine Myokarditis aus, die im weiteren Verlauf mit Vernarbungen im Myokard ohne nachweisbare Entzündung und mit einer Erweiterung beider Ventrikel dem Krankheitsbild einer humanen DCM entspricht. Da beim Menschen die auslösende Herzmuskelentzündung häufig nicht diagnostiziert wird, ist eine exakte Bestimmung des Anteils enteroviraler Infektionen an der DCM-Entstehung diffizil – nach derzeitigem Kenntnisstand stellen Coxsackieviren vom Typ B (und hier speziell der Subtyp 3) in mindestens 10–25 % der Fälle das zugrundeliegende Agens dar.

Der primäre Rezeptor für die Erreger auf der Zelloberfläche ist der Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptor (CAR), ein 46-kDa-Protein aus der Immunglobulin-Superfamilie, dessen physiologische Funktion bislang nicht genau definiert werden konnte.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, diesen Rezeptor in verschiedenen Systemen genauer zu untersuchen und damit einen Beitrag zur Aufklärung seiner Bedeutung im Krankheitsgeschehen und seiner bisher nur unvollständig verstandenen Regulationsmechanismen zu leisten.

Folgende Fragestellungen waren zu bearbeiten:

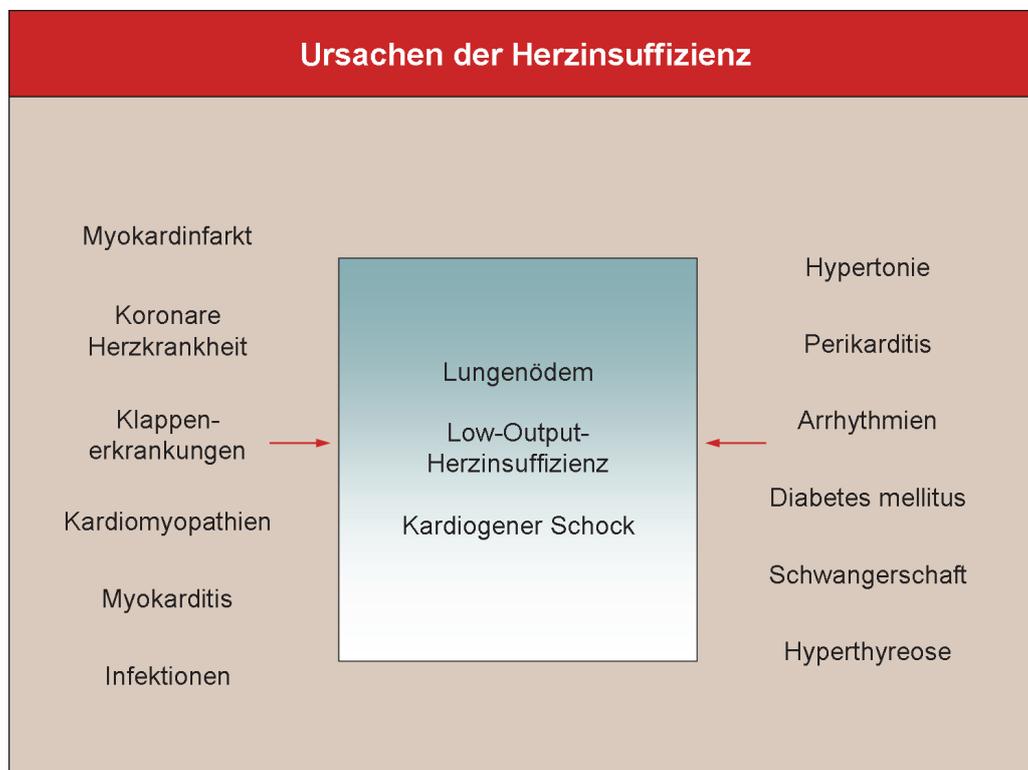
- Gibt es Unterschiede in der CAR-Expression zwischen gesunden Probanden und DCM-Patienten?
- Wie wirkt sich eine coxsackievirale Infektion auf die Rezeptor-Expression im Mausmodell aus, gibt es hierbei Unterschiede zwischen verschiedenen Organen?
- Existieren Mutationen im CAR-Gen, die die Expression des Proteins, seine Lokalisierung oder seine Bindungseigenschaften beeinflussen, somit einen prädisponierenden Faktor für eine Coxsackievirus-Infektion darstellen und bei DCM-Patienten gehäuft auftreten?

- Durch welche Parameter (virale Infektion, Zelldichte, chemische Botenstoffe) lässt sich die Rezeptorexpression im Zellmodell beeinflussen?

## 2 Einleitung

### 2.1 Herzinsuffizienz und Kardiomyopathien

Basierend auf einer Definition der WHO aus dem Jahr 1995 stellt eine Herzinsuffizienz die Unfähigkeit des Herzens dar, den Organismus mit ausreichend Blut und – daraus folgend – mit genügend Sauerstoff zu versorgen, um den Stoffwechsel sowohl unter Ruhe- als auch unter Belastungsbedingungen zu gewährleisten. Die Ursachen für die Entstehung einer Herzinsuffizienz sind vielfältig (s. Abb. 1), das Syndrom repräsentiert den häufigsten pathophysiologischen Endzustand kardiovaskulärer Erkrankungen.



**Abb. 1: Ursachen der Herzinsuffizienz,** nach [119]

Der wichtigste kardiale Ursprung einer Herzinsuffizienz ist die koronare Herzkrankheit (KHK), unter den nicht kardialen nimmt die arterielle Hypertonie (welche wiederum einen Risikofaktor für eine KHK darstellt) den ersten Platz ein.

Typische Symptome des Krankheitsbildes sind Belastungsdyspnoe (in späteren Stadien auch Ruhedyspnoe), Müdigkeit und Flüssigkeitsretention in verschiedenen Körperregionen und Organen. Mit dem Fortschreiten der Erkrankung setzt sich der Leistungsabfall fort, es kann zu nächtlichen

Anfällen schwerer Atemnot mit Erstickungsgefühl, Husten und schaumigem Auswurf kommen, insgesamt tritt eine kontinuierliche Verschlechterung der Lebensqualität ein. Eine international anerkannte Einteilung des Schweregrads einer Herzinsuffizienz ist die *NYHA-Klassifikation* (benannt nach der **New York Heart Association**).

**Tab. 1: NYHA-Klassifikation**, nach [2, 6]

NYHA-Stadium	Beschwerden	mittlere Lebenserwartung nach Diagnosestellung
I	Herzerkrankung ohne körperliche Limitation. Alltägliche körperliche Belastung verursacht keine inadäquate Erschöpfung, Luftnot, Rhythmusstörungen oder Angina pectoris.	5 Jahre
II	Herzerkrankung mit leichter Einschränkung der körperlichen Leistungsfähigkeit. Keine Beschwerden in Ruhe und bei geringer Anstrengung. Stärkere körperliche Belastung verursacht Erschöpfung, Luftnot, Rhythmusstörungen oder Angina pectoris.	5 Jahre
III	Herzerkrankung mit höhergradiger Einschränkung der körperlichen Leistungsfähigkeit bei gewohnter Tätigkeit. Keine Beschwerden in Ruhe. Geringe körperliche Belastung verursacht Erschöpfung, Rhythmusstörungen, Luftnot oder Angina pectoris.	2,6 Jahre
IV	Herzerkrankung mit Beschwerden bei allen körperlichen Aktivitäten und in Ruhe. Bettlägerigkeit.	6 Monate

Die Herzinsuffizienz ist das weltweit am schnellsten zunehmende Herzkreislaufleiden. In der Gruppe der über 65jährigen ist sie in Deutschland die meist diagnostizierte Krankheit und der häufigste Grund für eine Hospitalisierung. Die 5-Jahres-Mortalitätsraten nach Diagnosestellung betragen 45 % bei weiblichen und 59 % bei männlichen Patienten [132]. Nahezu 40 % der Erkrankten versterben innerhalb eines Jahres nach der ersten Einweisung ins Krankenhaus. Die mittlere Überlebensrate (s. Tab. 1) liegt deutlich unter der vieler Krebserkrankungen. Die durch Herzinsuffizienz verursachten Kosten beliefen sich im Jahr 2004 in der BRD auf ca. 2,5 Mrd. € [217], dürften jedoch mit Blick auf die demografische Entwicklung in den nächsten Jahren weiter deutlich steigen.

Bei ca. einem Drittel der Fälle von Herzinsuffizienz lässt sich diese auf eine Kardiomyopathie zurückführen. Den Begriff der Kardiomyopathie prägte W. Bridgen im Jahr 1957 in einem Bericht über „ungewöhnliche Herzerkrankungen“ [19, 20], es wurden darunter akute, subakute oder chronische Dysfunktionen des Herzens – häufig mit endokardialer oder perikardialer Beteiligung, aber ohne arteriosklerotischen Ursprung – verstanden [76, 77, 79]. Nach der Definition der WHO/ISFC von 1995 [189] sind Kardiomyopathien Erkrankungen des Herzmuskels, die mit einer objektivierbaren kardialen Funktionsstörung einhergehen. Sie werden nach der vorherrschenden Pathophysiologie oder – wo möglich – nach ätiologischen bzw. pathogenetischen Faktoren klassifiziert.

Es werden fünf Kardiomyopathieformen unterschieden:

### 1. Nichtklassifizierbare Kardiomyopathien

Hier werden alle Fälle eingeordnet, die sich keiner der anderen Klassen hundertprozentig zuweisen lassen.

### 2. Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie

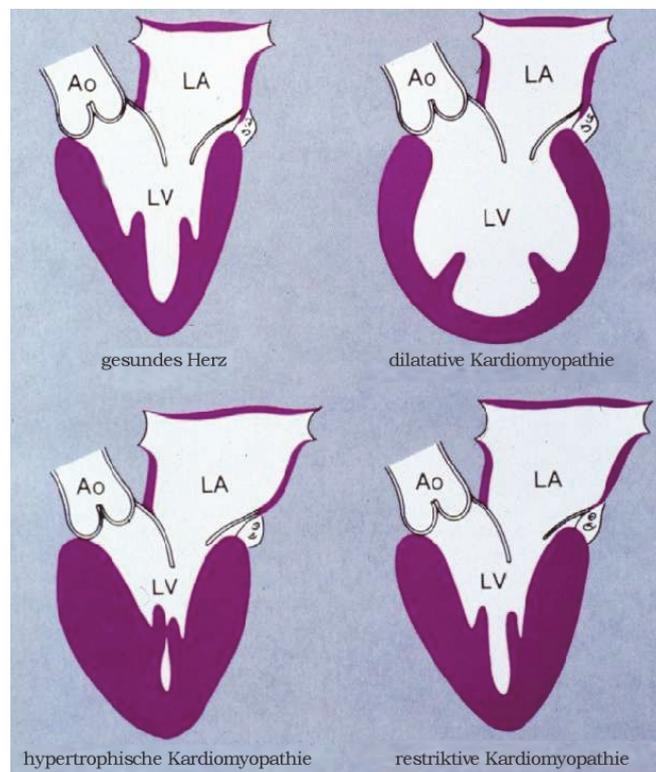
Die arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie ist eine Herzmuskelerkrankung, welche durch eine fortschreitende Atrophie des rechtsventrikulären Myokards mit gleichzeitiger Fettinfiltration gekennzeichnet ist. Die elektrische Erregungsleitung des Herzmuskels, die sich ausgehend vom Sinusknoten vorwiegend über die Muskulatur des rechten Herzens ausbreitet, ist gestört, was das Risiko von Herzrhythmusstörungen in sich trägt.

### 3. Restriktive Kardiomyopathie

Diese Kardiomyopathieform ist gekennzeichnet durch die eingeschränkte Füllung und ein herabgesetztes diastolisches Volumen eines oder beider Ventrikel bei normaler systolischer Funktion und Wanddicke. Eine verstärkte interstitielle Fibrose kann auftreten. Häufig ist die restriktive Kardiomyopathie mit anderen Krankheiten, wie z. B. mit Amyloidosis oder endomyokardialen Erkrankungen, assoziiert.

#### 4. Hypertrophische Kardiomyopathie

Kennzeichnend für die hypertrophische Kardiomyopathie ist eine besonders ausgeprägte, asymmetrische Verdickung des basisnahen Septums zwischen rechtem und linkem Ventrikel (s. Abb. 2) [247]. Dies führt zu einer dynamischen Einengung der Ausflussbahn des linken Ventrikels, wodurch die Pumpfunktion des Herzens behindert wird. Neben einer sporadisch auftretenden Form findet man auch eine Häufung in bestimmten Familien, es wird ein autosomal-dominanter Vererbungstyp beschrieben [143]. Oft sind Mutationen in den Genen sarkomerisch-kontraktiler Proteine nachweisbar. Mögliche Krankheitsfolgen sind Herzrhythmusstörungen, Synkopen und plötzlicher Herztod.



**Abb. 2: Schematische Darstellung der Kardiomyopathien,** [52], (Ao = Aorta, LA = Linkes Atrium, LV = Linker Ventrikel)

#### 5. Dilatative Kardiomyopathie

Die dilatative Kardiomyopathie (DCM) stellt – gemessen an Erkrankungsalter, natürlichem Verlauf und stark eingeschränkten Therapiemöglichkeiten – eine der schwersten Herzkrankheiten dar [53]. In ihrem Verlauf kommt es zu einem fortschreitenden Verlust an Herzmuskelzellen, dessen genaue

Ursachen bisher nicht ausreichend definiert werden konnten. Die den Muskelzell-Verlust kompensierende Zunahme an Fibroblasten führt zur Fibrosierung des Myokards (einem wesentlichen Kennzeichen der DCM) und zu einer wachsenden Einschränkung der Fähigkeit der Herzmuskelzellen, sich während des Herzschlages zu kontrahieren [159]. Dies, verbunden mit der Erweiterung des linken oder beider Ventrikel ohne gleichzeitige Dickenzunahme der Herzmuskulatur (s. Abb. 2), zieht eine stetig größer werdende Einschränkung der kardialen Pumpfunktion nach sich [50, 75].

## **2.2 Pathogenese der dilatativen Kardiomyopathie**

Bei circa 50 % aller Fälle von dilatativer Kardiomyopathie kann eine spezifische ätiologische Ursache nachgewiesen werden [64], es spielen familiär-genetische, infektiöse, (auto-)immunologische und toxische Faktoren eine Rolle. Die Formen unbekannter Ätiologie und Pathogenese werden als idiopathische dilatative Kardiomyopathie eingestuft.

Durch den langsamen Krankheitsverlauf wird die DCM häufig erst in einem relativ späten Stadium – meist durch das Auftreten erster Beeinträchtigungen – diagnostiziert. Typische Symptome sind – bedingt durch die zunehmende Herzinsuffizienz – allgemeine Schwäche, belastungsabhängige Dyspnoe und Ödeme in den Beinen [139]. Mit fortschreitender Krankheit kommen Herzrhythmusstörungen hinzu, welche die Gefahr des plötzlichen Herztodes in sich bergen [221]. Bei stärker ausgeprägten Formen der Krankheit ist das Auftreten von Embolien keine Seltenheit, Schlaganfälle können die Folge sein. Eine spontane Verbesserung oder zumindest Stabilisierung des Erkrankungszustandes tritt bei etwa einem Drittel der Patienten auf [65].

Im Endstadium einer DCM ist die Herztransplantation die einzige Therapiemöglichkeit, somit stellt die dilatative Kardiomyopathie die häufigste zur Herztransplantation führende Erkrankung dar [94, 140, 227].

Das Erkrankungsalter zum Zeitpunkt der Diagnose liegt im Mittel bei 45 Jahren, wobei Männer häufiger als Frauen (3:1) und Schwarze häufiger als Weiße betroffen sind. Mit einer Prävalenz von 36,5/100.000 und einer Inzidenz von 5–8/100.000 pro Jahr (bei einer sicher deutlich höheren

Dunkelziffer durch anfangs asymptomatische Verläufe) in den westlichen Industriestaaten [35, 40, 72, 183] stellt die DCM aufgrund der eingeschränkten Therapiemöglichkeiten nicht zuletzt ein bedeutendes finanzielles Problem dar. Die Mortalität liegt bei 5–15 % pro Jahr und bei 50–75 % in 5 Jahren [50, 53, 72, 128, 152].

### **2.2.1 Familiär-genetische Formen**

Angesichts der großen Bedeutung der DCM und der in vielen Fällen unklaren Genese war die Erkrankung in den letzten Jahren Mittelpunkt vieler Untersuchungen. Danach wird der Anteil familiärer Formen auf 20–35 % geschätzt [10, 81, 114, 152], niedrigere Werte resultieren aus dem Ausschluss symptomloser (aber möglicherweise genotypisch trotzdem betroffener) Familienmitglieder. Die genetischen Ursachen der familiären DCM sind sehr heterogen; es überwiegen autosomal dominante Erbgänge [152], aber auch autosomal rezessive, X-chromosomal gekoppelte und maternale (d. h., durch Mutationen in der mitochondrialen DNA verursachte) Vererbungswege wurden beschrieben [69, 133].

Das erste Protein, in welchem sich DCM-verursachende Veränderungen nachweisen ließen, war das Aktin [169]. Die im Herzen dominierende Form ist das kardiale  $\alpha$ -Aktin, welches einen Hauptbestandteil der dünnen Filamente im Sarkomer darstellt (s. Abb 3). Olson *et al.* beschrieben 1998 zwei Mutationen, die möglicherweise zu einer gestörten Interaktion des Aktins mit den Proteinen der Z-Scheibe führen und so die Kraftübertragung vom Sarkomer zum Zytoskelett und auf benachbarte Myozyten beeinträchtigen könnten [169]. Im Gegensatz dazu wirken sich Mutationen im Aktin-Gen, die zu hypertrophischer Kardiomyopathie führen, in der Proteindomäne aus, welche für die Aktin-Myosin-Interaktion und somit für die Krafterzeugung bedeutsam ist [58].

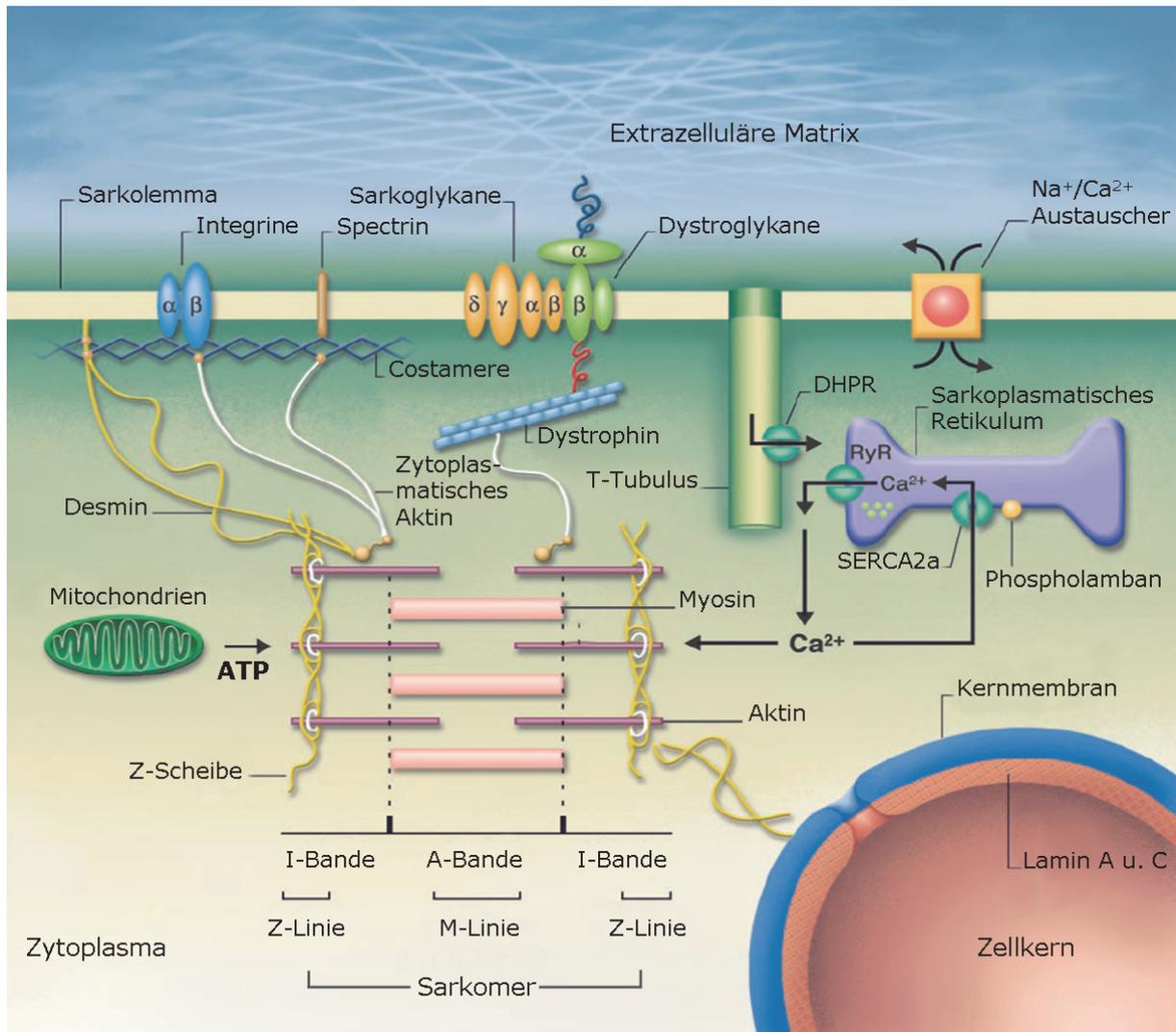
Weitere Proteine des Sarkomers, die bei Patienten mit familiärer DCM in einer veränderten Form nachgewiesen werden konnten, sind u. a. kardiales Troponin T,  $\alpha$ -Tropomyosin, Myosin und Titin [29, 38, 74, 103, 111, 168, 240].

Unter den Komponenten des Zytoskeletts finden sich drei, denen eine Bedeutung in der Pathogenese einer familiären dilatativen Kardiomyopathie zugeschrieben wird: Desmin, Metavinculin und Dystrophin. So können Mutationen im Desmin-Gen zum einen die strukturelle Integrität der Muskelfibrillen herabsetzen und zum anderen die durch die kontraktilen Filamente erzeugte Kraft vermindern, was zu einer fortschreitenden Schädigung der Myofibrillen durch erhöhten mechanischen Stress führt [48]. Veränderungen im Dystrophin (X-chromosomal rezessiver Erbgang) ohne Skelettmuskelbeteiligung stellen dagegen eine wahrscheinlich eher seltene Ursache dilatativer Kardiomyopathien dar [153, 165, 222]. Das Protein interagiert sowohl mit dem zytoskelettalen Aktin als auch mit dem Dystroglykan-Komplex im Sarkolemma und trägt dadurch vermutlich zur Ordnung intrazellulärer Strukturen, zur Kraftübertragung und zur Membranstabilität bei (s. Abb. 3). Mutationen könnten die Integrität der Muskelzellmembran oder die Affinität zu Proteinen des Zytoskeletts herabsetzen [171]. Da aber ein und derselbe Genotyp (z. B. Deletionen) zu sehr unterschiedlichen phänotypischen Ausprägungen führen kann, ist eine verallgemeinernde Einschätzung der Bedeutung von Dystrophin-Veränderungen nicht möglich [157].

Als Bestandteil des Sarkoglykankomplexes stabilisiert  $\delta$ -Sarkoglykan das Sarkolemma und dient wahrscheinlich gleichzeitig der Signalübertragung. Für den Menschen wurden Veränderungen in der Aminosäuresequenz des Proteins, die zu einer DCM führen können, beschrieben [228]. Mutationen in den evolutionär hochkonservierten Regionen von Stab-Domäne und Carboxyl-Schwanz der Lamine – Bestandteilen der Kernlamina – verändern die Ladung der Proteine und stören so deren physiologische Faltung [59]. Mögliche Folgen sind die Destabilisierung der Kernhülle, Beeinträchtigungen der Gen-Expression und – über die Degeneration des Desminnetzes – die Verschlechterung der Kraftweiterleitung in und zwischen den Myozyten [21, 158].

Nicht nur die Krafterzeugung im Sarkomer oder die Kraftübertragung auf die extrazelluläre Matrix mittels des Zytoskeletts können durch Mutationen beeinträchtigt sein – auch Gene, die für den Metabolismus der Zelle, in

Signalwegen oder für die Regulierung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase entscheidend sind, wurden mit einer familiären DCM in Zusammenhang gebracht.



**Abb. 3: Schematische Darstellung eines kardialen Myozyten**, nach [58], modifiziert. Es sind einige Strukturen und Komponenten dargestellt, die bisher als Ursachen für eine familiäre DCM identifiziert bzw. verantwortlich gemacht wurden. Dabei spielen folgende Mechanismen eine Rolle: gestörte Krafterzeugung durch Mutationen in den Genen für Sarkomer-Proteine, gestörte Kraftübertragung durch Mutationen in Genen der zytoskelettalen Proteine, Energiedefizite durch Mutationen in Genen ATP-regulierender Proteine und eine gestörte  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase durch Veränderungen in der  $\text{Ca}^{2+}$ -Bereitstellung und der  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensibilität der Myofibrillen. (DHPR = Dihydropyridin-Rezeptor, RyR = Ryanodin-Rezeptor, SERCA2a = kardiale Isoform der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums)

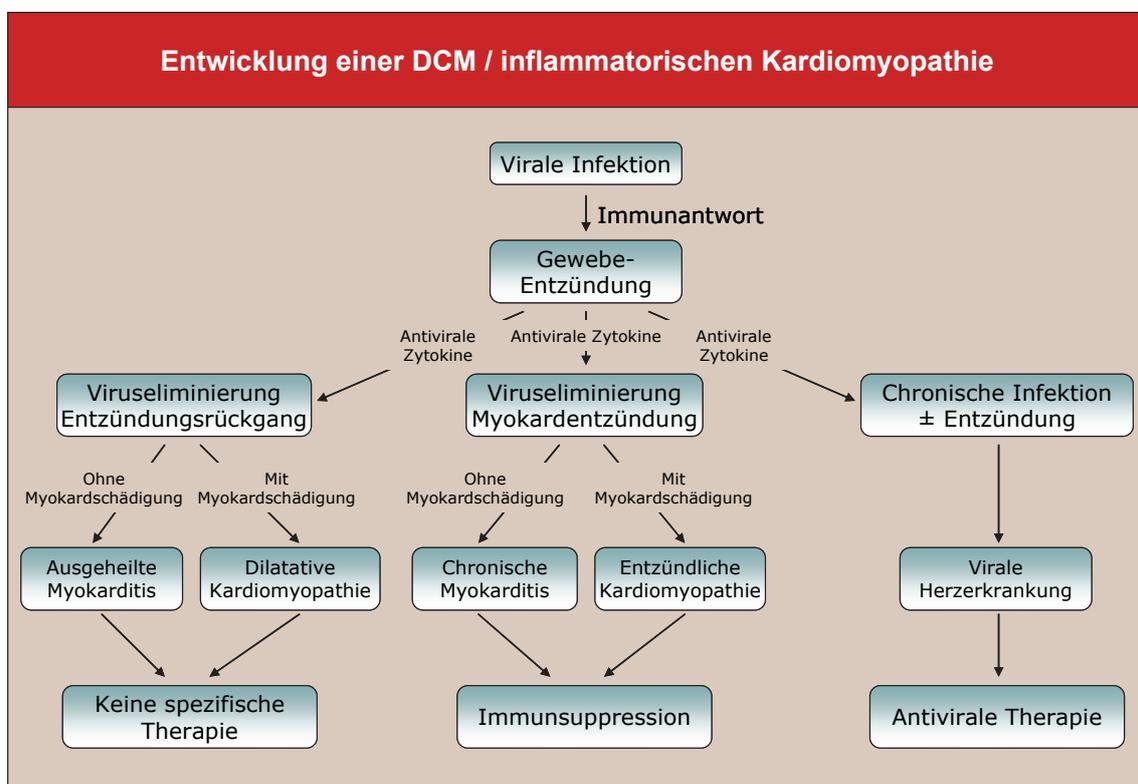
Bedingt durch das Fehlen eines effektiven DNA-Reparatursystems und durch das Vorhandensein freier Sauerstoffradikale ist die Mutationsrate mitochondrialer DNA deutlich höher als die nukleärer. Sind dabei Bestandteile der Atmungskette, Komponenten des mitochondrialen Replikationsapparates oder tRNAs betroffen, kommt es zu einer Störung der

zellulären Energieversorgung bzw. der Proteinsynthese in den Mitochondrien und zur Schädigung der Myozyten. Verschiedene Autoren haben Mutationen in der mitochondrialen DNA bei DCM-Patienten beschrieben (z. B. in den Genen für die NADH-Dehydrogenasen oder für Untereinheiten der Cytochrom c-Oxidase); ob diese Mutationen allerdings ursächlich für das Entstehen des Krankheitsbildes sind oder sekundäre Effekte einer bereits etablierten Kardiomyopathie darstellen, bleibt oft unklar [7, 133, 142, 237]. Die für die Sarkomerfunktion wichtige  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase in den Zellen wird u. a. durch das Protein Phospholamban gesteuert, das als Inhibitor der sarkoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA2a) fungiert [95]. Ein von Schmitt [200] dokumentierter Basenaustausch (C25T) im Phospholamban führt zu einer stärkeren Inhibierung der SERCA2a, welche eine verlangsamte Wiederaufnahme von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem Zytoplasma in das Sarkoplasmatische Retikulum und dadurch eine verzögerte Muskelrelaxation nach sich zieht.

## **2.2.2 Infektiöse Formen**

Neben den idiopathischen und den familiär-genetisch bedingten Formen gilt die entzündliche Kardiomyopathie – eine Myokarditis, assoziiert mit kardialer Dysfunktion – als eine der Hauptursachen der DCM [35, 64]. Eine Myokarditis ist ein entzündlicher Prozess, der von einer Vielzahl verschiedener Erreger hervorgerufen werden kann. Neben Viren spielen dabei Bakterien (z. B. *Corynebacterium diphtheriae*, *Mycobacterium tuberculosis*), Pilze (bspw. Aspergillus, Candida) und Parasiten (z. B. *Trypanosoma cruzi*, Plasmodien) eine Rolle. Die Erreger variieren vor allem mit der geographischen Region und mit zusätzlichen Begleiterkrankungen [139]. Die Mehrzahl der akuten und der chronischen Myokarditiden in Europa und Nordamerika gilt als virusinduziert [51, 62]. Bereits seit 1964 wird die Möglichkeit diskutiert, dass eine akute virale Myokarditis die Grundlage für das Entstehen einer dilatativen Kardiomyopathie darstellen könne (s. Abb. 4) [24, 78]. Inzwischen scheinen zahlreiche experimentelle und klinische Befunde die Entwicklung von einer (nicht dokumentierten) akuten Virusmyokarditis hin zur DCM zu belegen [9, 47, 134]. So führt im Mausmodell die Infektion mit dem Coxsackievirus B3 (CVB3) zu einem Krankheitsbild, das große Ähnlichkeit mit einer Myokarditis des Menschen

aufweist. Binnen zweier Wochen kommt es zur Ausbildung lokaler Läsionen im Myokard, die nekrotische Muskelzellen und zahlreiche Immunzellen enthalten. Während der folgenden sechs Monate zeichnen histopathologische Untersuchungen das Bild einer fortlaufenden Entzündung und einer anhaltenden Nekrose des Herzmuskels, die Fibrosierungen und die Hypertrophierung der verbleibenden Myozyten zur Folge haben. Innerhalb eines Jahres manifestiert sich ein pathophysiologischer Zustand, der mit Vernarbungen im Myokard ohne nachweisbare Entzündung und mit der Erweiterung beider Ventrikel einer humanen dilatativen Kardiomyopathie entspricht [120, 135, 188, 248]. Das folgende Schema zeigt den möglichen Verlauf einer viralen Infektion.



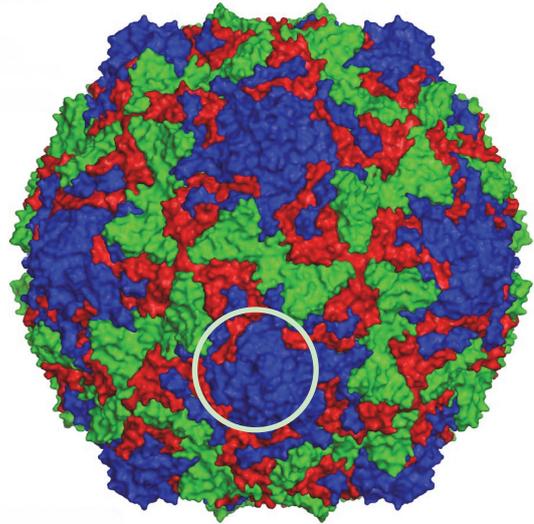
**Abb. 4: Natürlicher Verlauf von einer virusinduzierten Myokarditis hin zur DCM/ inflammatorischen Kardiomyopathie, nach [202]**

Unter den bisher identifizierten kardiotropen Viren sind die Enteroviren und hier speziell die Coxsackieviren vom Typ B3 am besten untersucht.

### 2.2.2.1 Coxsackieviren

Die Coxsackieviren, 1948 erstmals beschrieben [49], gehören der Familie der *Picornaviridae* an, welche insgesamt neun Genera und ca. 230 Serotypen umfasst und zahlreiche weitere tier- und humanpathogene Viren, wie z. B.

das Poliovirus, das Maul- und Klauenseuche-Virus oder das Hepatitis-A-Virus, enthält [66]. Die Picornaviren, deren Name sich aus „pikos“ (griech. für klein) und „RNA“ zusammensetzt, sind einfach aufgebaut. Sie bestehen aus einem ikosaedrischen, nicht umhüllten Kapsid von 27–30 nm Durchmesser, welches ein einzelsträngiges RNA-Genom in Plusstrang-Orientierung umschließt [92, 155]. Das Kapsid besteht aus 60 Protomeren, die sich aus den Strukturproteinen VP1–4 zusammensetzen. Dabei bilden die Proteine VP1, VP2 und VP3 die Kapsidoberfläche (s. Abb. 5), während VP4

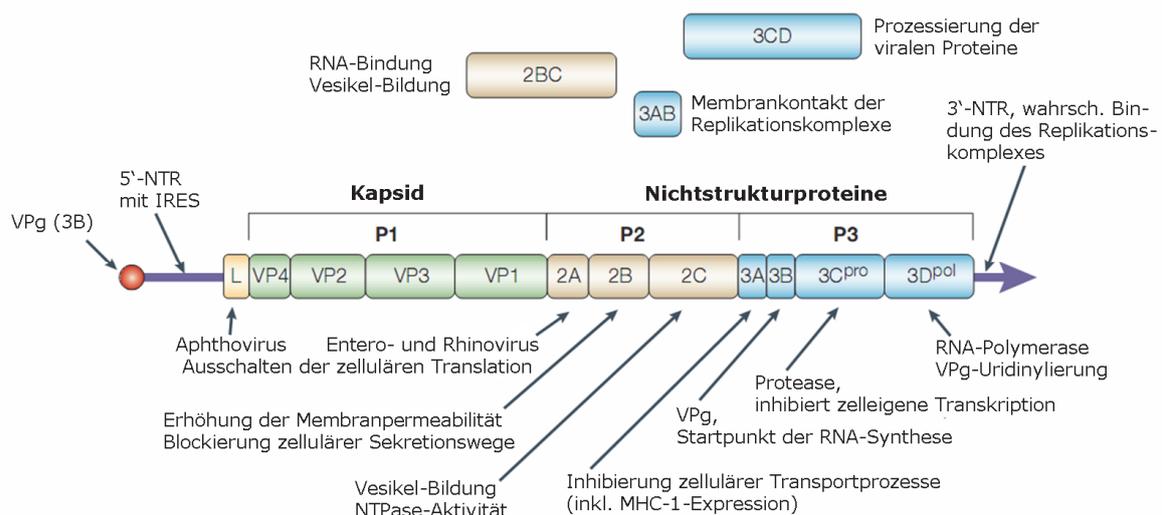


**Abb. 5: Modell von CVB3**, [210] nach [166], mit Markierung eines Canyons (heller Ring); blau: VP1, grün: VP2, rot: VP3

an der Innenseite des Partikels lokalisiert und mit dem RNA-Genom assoziiert ist. Die zwölf Ecken des Icosaeders, an denen sich jeweils fünf Protomere berühren, sind von einer grabenförmigen Struktur umgeben, die als Canyon bezeichnet wird. Die den Canyon auskleidenden Aminosäurereste von VP1 und VP3 bestimmen die Spezifität des Virus für einen zellulären Rezeptor. Durch die Bindung an diesen werden das Kapsid an der Basis des Canyons destabilisiert und eine Konformationsänderung induziert, welche das Einschleusen des viralen Genoms in die Zielzelle ermöglicht. Die Lokalisation der für die Rezeptorinteraktion notwendigerweise hoch konservierten Bindungsstellen innerhalb der schmalen Canyonstruktur verhindert deren Blockierung durch neutralisierende Antikörper. Im Gegensatz dazu verändern sich die exponierteren Strukturen der Kapsidoberfläche unter dem Druck des Wirts-Immunsystems relativ schnell [192]. Das in die Wirtszelle eingeschleuste Genom zeigt bei allen Picornaviren einen ähnlichen Aufbau. Der RNA-Einzelstrang, welcher zwischen 7,2 kb (Rhinovirus 14) und 8,5 kb (Maul- und-Klauenseuche-Virus) lang ist, kodiert für (je nach Virus) zehn bis zwölf Proteine – die viralen Kapsidproteine und die Nichtstrukturproteine. Es existiert ein einziger offener Leserahmen (ORF), das resultierende Polyprotein

wird durch die Aktivität der viralen Proteasen co- und posttranslational in die einzelnen Komponenten prozessiert [173].

Im viralen Polyprotein werden drei Bereiche unterschieden (s. Abb. 6), die Anordnung der Eiweiße darin ist bei allen Picornaviren ähnlich. Am N-Terminus liegt die P1-Region, welche die vier Strukturproteine des Kapsids (VP4, VP2, VP3 und VP1) enthält. Es schließen sich die P2-Region mit drei (2A, 2B, 2C) und die P3-Region mit vier Nichtstrukturproteinen (3A, 3B, 3C, 3D) an. Die Prozessierung erfolgt durch die viralen Proteasen 2A und 3C sowie das 3CD-Vorläuferprotein. Da das Genom der Viren als RNA in Plusstrang-Orientierung vorliegt, also prinzipiell einer mRNA entspricht, kann es direkt translatiert werden. Allerdings besitzt die virale RNA keine 5'-Cap-Struktur für die korrekte Bindung der ribosomalen Untereinheiten an den Translationsstartpunkt.



**Abb. 6: Picornavirus-Genom und Polyprotein-Produkte, schematisch,** nach [245]

Diese Funktion übernimmt eine stabile Sekundärstruktur in der nichttranslatierten Region am 5'-Ende (5'-NTR), die sogenannte „interne Ribosomen-Eintrittsstelle“ (IRES) [107]. Noch während der durch die Ribosomenbindung gestarteten Translation beginnt die Faltung in den einzelnen Proteindomänen, und es finden erste proteolytische Spaltungen statt. So faltet sich die 2A-Protease in ihre aktive Form und trennt die P1-Region vom P2-P3-Precursor. Alle weiteren Prozessierungen werden von der 3C-Protease bzw. dem 3CD-Vorläufer durchgeführt. Innerhalb der Strukturproteine erfolgt die Spaltung zwischen VP0 (Komplex aus VP4 und VP2) und VP3 sowie zwischen VP3 und VP1. Die Aufspaltung des VP4-VP2-

Komplexes ist entweder ein autokatalytischer oder ein RNA-katalysierter Vorgang unmittelbar vor Abschluss des Kapsidreifungsprozesses. Auch weitere Nichtstrukturproteine werden durch proteolytische Reaktionen aus dem Polyprotein heraus in ihre aktive Form überführt.

Die RNA-abhängige RNA-Polymerase (3D) ermöglicht durch die Uridinylierung des VPg (3B) zu VPg-pU-pU dessen Bindung an den 3'-Poly(A)-Schwanz der Plusstrang-RNA, wo es als Primer für die Synthese eines komplementären RNA-Minusstranges dient. Das dabei kurzzeitig entstehende Zwischenprodukt aus doppelsträngiger RNA wird wahrscheinlich mit Hilfe der viralen Proteine 2BC und 2C getrennt [11, 249]. Durch die sich anschließende Freilegung zweier Adenosinreste am 3'-Ende des Negativstranges (ebenfalls eine Aktivität von 2C), welche die Bindung von VPg-pUpU-OH-Primern ermöglicht, wird die Bildung neuer Positivstränge initiiert. Sobald in der infizierten Zelle genügend Komponenten für neue Viren vorhanden sind, erfolgt deren Zusammenbau zu infektiösen Viruspartikeln durch Selbstassemblierung. Jeweils fünf Aggregate aus den Strukturproteinen VP0, VP3 und VP1 lagern sich zu Pentameren zusammen, zwölf dieser Pentamere schließen als Kapsidvorläufer das RNA-Genom ein. Der letzte Reifungsschritt des Kapsids – die Spaltung des VP4-2-Komplexes (VP0) – wird durch die Enkapsidierung der RNA ausgelöst [154]. Ein 2B-Protein-verursachter Anstieg der  $Ca^{2+}$ -Konzentration im Zytoplasma führt zu einer Erhöhung der Membranpermeabilität, und es kommt zur Lyse der Wirtszelle und zur Freisetzung der infektiösen Virionen [233]. Der Replikationszyklus von der Bindung der Viren an die Zelloberfläche bis zur Freisetzung neu synthetisierter Partikel dauert sechs bis acht Stunden.

Die Coxsackieviren werden in Abhängigkeit von unterschiedlichen histopathologischen Befunden in Mäusen in die Gruppen A (CVA, 23 Serotypen, hauptsächlich Infektionen der quergestreiften und glatten Muskulatur) und B (CVB, sechs Serotypen, überwiegend Endomyokarditiden und Läsionen in Hirn und Pankreas) unterteilt [73]. Bei einer Infektion des Menschen sind nach einer Inkubationszeit von 10–14 Tagen in ca. 80 % der Fälle beschwerdefreie Verläufe zu beobachten; daneben treten jedoch auch klinische Symptome von grippeähnlichen Krankheitsbildern bis hin zu

schweren akuten und chronischen Erkrankungen wie Perikarditis, Meningitis, Enzephalitis oder Hepatitis auf [154, 244]. Außerdem werden CVB – vor allem CVB3 – zusammen mit anderen Enteroviren für bis zu 50 % der akuten Myokarditiden verantwortlich gemacht. Über eine Rolle der Coxsackieviren bei der Entstehung des juvenilen Diabetes mellitus (Typ I) wird diskutiert [80].

Die Viren sind weltweit verbreitet, Infektionen treten in den Tropen ganzjährig, in den gemäßigten Breiten gehäuft im Spätsommer und frühen Herbst auf. Die Übertragung erfolgt dabei fäkal-oral, durch ihre Säurestabilität erreichen die Erreger – von der Magenpassage nicht beeinträchtigt – den Darm. In den Peyerschen Plaques erfolgt die primäre Replikation, anschließend gelangen die Viren im Zuge der ersten Virämie über die ableitenden Lymphbahnen ins Blut und zu den Zielorganen. Die Art und die Schwere der dadurch hervorgerufenen Erkrankung hängen – neben Virulenz und Genetik des Erregers [121] – auch von einer Reihe wirtsspezifischer Faktoren wie Alter, Geschlecht und Immunstatus ab [100, 115].

Das Bild einer akuten Myokarditis zeigt sich in ca. 10 % aller Enterovirusinfektionen. Der überwiegende Teil der Patienten erholt sich von der Entzündung, eine vollständige Ausheilung ist bei 35 % der Erkrankten zu beobachten. In ungefähr 20 % der Fälle geht die akute Myokarditis jedoch in eine chronische Form über – es kann sich eine dilatative Kardiomyopathie entwickeln [145]. Der Nachweis enteroviraler RNA in den Endokardbiopsien von DCM-Patienten durch mehrere Arbeitsgruppen [108, 175] spricht für diesen Weg der Progression. In der Pathogenese spielen dabei sowohl direkte, virusbedingte als auch sekundäre, durch das Immunsystem des Infizierten hervorgerufene Schädigungen des Herzmuskels eine Rolle. Die Infektion der Kardiomyozyten, die anfänglich hämatogen erfolgt, breitet sich anschließend innerhalb des Gewebes aus, wobei neu gebildete Virionen durch die Lyse der Zellen freigesetzt werden [90]. Aber auch nicht-lysierte Zellen werden aufgrund des „host cell shut-off“-Effekts, des Abschaltens der Synthese zellulärer Proteine, und durch die von der viralen Protease 2A katalysierte Spaltung des Zytoskelett-Bestandteils Dystrophin geschädigt und zerstört [9,

118]. Durch das Einwandern von Zellen der unspezifischen Immunantwort (Natürliche Killerzellen, Makrophagen) und von T-Zellen (CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>) in das Gewebe kommt es zur Ausbildung einer starken Entzündungsreaktion und in deren Folge zur Eliminierung des Virus [86]. Allerdings kann das virale Genom durch die Bildung doppelsträngiger RNA-Moleküle in einigen Zellen persistieren und so – ohne die Bildung neuer infektiöser Virionen – einen chronischen Krankheitsprozess hervorrufen [220, 242].

Ein Aspekt CVB3-induzierter Myokardzerstörung, der zunehmend mehr Beachtung findet, ist die Apoptose. So konnten bei Patienten mit chronischer Myokarditis nachgewiesene Zellschädigungen auf apoptotische Vorgänge zurückgeführt werden [167]. Es bleibt zu klären, welche Rolle das Virus bei diesen Prozessen spielt und welche Bedeutung den durch die Immunantwort induzierten Zytokinen zukommt. Erste Hinweise zu den zugrunde liegenden Mechanismen könnten die Untersuchungen zu Wechselwirkungen zwischen dem viralen Kapsidprotein VP2 und dem proapoptischen Wirtszellprotein Siva liefern [87].

Zur Zeit gibt es keine zugelassene spezifische Prophylaxe oder Therapie der CVB3-induzierten Myokarditis. Es werden jedoch klinische Untersuchungen zum Einsatz von Pleconaril bei Picornavirusinfektionen durchgeführt. Diese Substanz bewirkt Konformationsänderungen des Viruskapsids durch Anlagerung in der Canyonstruktur und verhindert auf diese Weise die Bindung an zelluläre Rezeptoren [67, 230]. Daneben existieren verschiedene Ansätze, die auf die Unterstützung des wirtseigenen Immunsystems zielen. Sowohl die Verabreichung neutralisierender Antikörper als auch Versuche zur aktiven Immunisierung mit rekombinanten oder attenuierten Viren bzw. reinen DNA-Vakzinen lieferten im Mausmodell vielversprechende Ergebnisse [30, 89, 214, 256]. Weiter fortgeschritten sind Bestrebungen, Interferon- $\beta$  („Betaferon“) therapeutisch einzusetzen. Es fand bereits eine klinische Pilot-Studie mit 22 Patienten statt, in deren Verlauf sowohl die Eliminierung des viralen Genoms aus dem Myokard als auch eine Verbesserung der Herzfunktion beobachtet werden konnten [127]. Eine statistisch abgesicherte Bestätigung dieser Ergebnisse sowie die genaue Analyse möglicher Nebenwirkungen in einer Phase-III-Studie stehen noch aus. Ein weiterer Ansatz,

die Verwendung trunkierter, löslicher Virus-Rezeptormoleküle, konnte in der Zellkultur die Infektion von HeLa-Zellen verhindern [56]; im Mausmodell traten bei sinkenden CVB3-Titern im Myokard allerdings eine gesteigerte Entzündungsreaktion und verstärkte Gewebszerstörungen auf [55]. Eine Weiterentwicklung des Konzepts, z. B. durch Kopplung der Rezeptormoleküle an IgG-Bestandteile (Fc-Domäne) erscheint vielversprechend.

### **2.2.2.2 Andere Viren**

Das Krankheitsbild einer inflammatorischen Kardiomyopathie kann durch eine Vielzahl weiterer Viren (bspw. Adenoviren, Parvovirus B19, Herpesviren, Influenza-, Mumps-, Hepatitis-C-Virus) hervorgerufen werden. Hierbei spielen vor allem patientenspezifische Parameter eine Rolle, große Bedeutung kommt zum Beispiel der Leistungsfähigkeit des Immunsystems zu. So tritt bei 10–20 % aller HIV-Patienten eine dilatative Kardiomyopathie auf, welche in ca. einem Drittel der Fälle zum Tode führt [182]. Ätiologische Faktoren können sowohl der direkte Befall der Myozyten durch HI-Virionen als auch opportunistische Infektionen durch andere Viren (CMV, HSV, Adenoviren), Bakterien (*S. aureus*, *M. tuberculosis*), Pilze (*Histoplasma capsulatum*, *Aspergillus fumigatus*) und Protozoen (*Toxoplasma gondii*) sowie autoimmunologische Prozesse sein [12, 45, 187].

### **2.2.3 Immunologische Formen**

Bei der Erstinfektion eines Organismus mit einem bestimmten Krankheitserreger stellen die Mechanismen der angeborenen Immunität einen schnell wirkenden, unspezifischen ersten Eindämmungsschritt gegen die Ausbreitung des Pathogens dar. So können einige Proteine des Komplementsystems durch ihre Proteaseaktivität eingedrungene Mikroorganismen schädigen; andere fördern die lokale Entzündungsreaktion, indem sie die Permeabilität der Blutkapillaren steigern und sowohl chemotaktisch als auch aktivierend auf neutrophile Granulozyten und Monozyten/Makrophagen wirken. Diese sogenannten „Fresszellen“ (Phagozyten) beseitigen Krankheitserreger durch Phagozytose, und Makrophagen tragen außerdem durch die Prozessierung und Präsentation körperfremder Antigene auf ihrer Oberfläche zur Stimulierung der Komponenten der adaptiven Immunantwort bei. Darüber hinaus kommt es

zur Ausschüttung chemischer Mediatoren (Zytokine) durch die Phagozyten, die eine Verstärkung der immunologischen Reaktion zur Folge haben. Durch die Aktivität von T- und B-Lymphozyten, welche die Träger der spezifischen Abwehr sind und sowohl die Bereiche der zellulären als auch der humoralen Immunität abdecken, erreicht die Abwehrreaktion einen Höhepunkt. In den meisten Fällen können die eingedrungenen Erreger eliminiert werden, und die im Zuge der Immunantwort hervorgerufenen Veränderungen bilden sich zurück. Allerdings bleiben spezifische Antikörper und Gedächtniszellen erhalten, die bei einem erneuten Kontakt mit dem Pathogen binnen kürzester Zeit eine angemessene Abwehrreaktion ermöglichen. Um zu verhindern, dass sich Effektoren des Immunsystems gegen körpereigene Strukturen richten, existieren Sicherungssysteme wie die Doppelsektion der T-Lymphozyten im Thymus [106].

Trotzdem kann es vorkommen, dass Zellen und Mediatoren der Immunantwort eine den Organismus eher schädigende Wirkung entfalten. So beeinflussen zum Beispiel die während der Abwehrreaktion von verschiedenen Zellen sezernierten Zytokine die Genexpression mit ihnen in Kontakt kommender Zellen und können in diesen nekrotische oder apoptotische Prozesse auslösen [117, 129, 150, 185]. Des Weiteren wurde in verschiedenen Untersuchungen ein Zusammenhang zwischen der Zirkulation proinflammatorischer Zytokine und der Aktivierung einer induzierbaren Form der Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) belegt [122, 174, 251] – die gebildeten Stickoxide haben in hohen Konzentrationen (unselektiv) eine zytotoxische Wirkung, indem sie DNA-Schäden sowie Störungen der mitochondrialen Funktion, der Kalzium-Homöostase und des Energiestoffwechsels hervorrufen können [4, 16, 125]. Wenn die immunologischen Prozesse auch nach der Eliminierung des Erregers anhalten, kann die dadurch hervorgerufene Gewebszerstörung den durch das Pathogen direkt induzierten Schaden weit übersteigen.

Doch nicht nur diese eher unspezifischen Mechanismen sind von pathophysiologischer Bedeutung. In einigen Fällen kann es auch zur Auslösung einer Autoimmunerkrankung kommen. Diese Störungen können lokal beschränkt sein (z. B. autoimmune Hepatitis, Diabetes mellitus Typ I)

oder systemisch wirken (bspw. Rheumatoide Arthritis, Sklerodermie). Die Ursachen der Autoimmunerkrankungen sind noch immer weitgehend unbekannt, gegenwärtig wird jedoch davon ausgegangen, dass für viele dieser Leiden eine familiäre/genetische Prädisposition besteht und/oder Umwelt- bzw. Lebensfaktoren als Auslöser eine Rolle spielen [106]. Die Theorie einer Veranlagung für autoreaktive Immunprozesse wird durch das familiär gehäufte Auftreten von Krankheiten wie der Rheumatoiden Arthritis gestützt. Der bisher am besten belegte und charakterisierte genetische Marker ist der MHC-Genotyp – so wird zum Beispiel bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ I an einer bestimmten Position der MHC-II-Proteinsequenz überdurchschnittlich häufig Valin, Serin oder Alanin anstatt Asparaginsäure nachgewiesen [106]. Unter den von außen wirkenden, eine gegen den eigenen Organismus gerichtete Immunantwort induzierenden Faktoren nehmen Pathogene wie Viren und Bakterien eine prominente Stellung ein. Zum einen werden sowohl durch die Erreger selbst als auch durch physiologische immunologische Reaktionen körpereigene Zellen abgetötet. Die damit verbundene Freisetzung dem Immunsystem normalerweise verborgener Antigene kann zur Aktivierung von Effektorzellen (B- und T-Lymphozyten) mit einem wirtsspezifischen Rezeptorrepertoire führen. Zum anderen vermögen antigene Determinanten des Pathogens, die eine große Ähnlichkeit zu körpereigenen Strukturen aufweisen, kreuzreagierende Zellen und Antikörper zu aktivieren bzw. zu induzieren. Ein Beispiel stellt das akute rheumatische Fieber dar – hier interagieren ursprünglich gegen Zellwandantigene von Streptokokken gebildete Antikörper mit ähnlichen Epitopen von Herzmuskelzellen [91, 97, 106, 110].

Auch für das Entstehen und/oder die Progression einer dilatativen Kardiomyopathie wird Autoimmunreaktionen eine Bedeutung beigemessen. Der Nachweis entzündlicher Infiltrationen im betroffenen Myokardgewebe ohne Detektierbarkeit eines inflammatorischen Agens' legt das Wirken von autoimmunologischen Mechanismen nahe. Unterlegt wird diese These durch die bei Patienten mit DCM gefundenen, gegen körpereigene Antigene gerichteten Immunglobuline. Diese Antikörper sind zum Teil spezifisch für ubiquitär vorkommende Proteine, einige jedoch binden ausschließlich an

kardiale Epitope. Zur ersten Gruppe gehören beispielsweise die von Portig *et al.* nachgewiesenen Autoantikörper gegen die Hitzeschockproteine HSP-60, HSP-70 und HSC-70 (HSP-73) [181], die Immunglobuline gegen die Verzweigtketten-Ketosäuredehydrogenase (BCKD) [5] oder die von Schultheiß *et al.* gefundenen Antikörper gegen den Adenin-Nukleotid-Translokator (ANT) der inneren Mitochondrienmembran [204]. Letzterer exportiert ATP im Antiport gegen ADP und spielt somit eine wichtige Rolle im Energiestoffwechsel von Zellen. Im Tiermodell konnte eine deutliche Reduktion der für Kardiomyozyten verfügbaren ATP-Menge und eine damit einhergehende Abnahme der Herzleistung um 54 % durch ANT-bindende Immunglobuline beobachtet werden [203, 205]. Zu den myokardial exprimierten Proteinen, welche als Autoantigene identifiziert wurden, gehören die leichte Myosinkette Typ I, die schwere Myosinkette  $\alpha$ , das Tropomyosin, das Troponin I und das Aktin [26, 124, 162]. Ferner konnten Konstadoulakis *et al.* sowie Warraich *et al.* zeigen, dass die gefundenen Antikörper gegen die schweren Myosinketten  $\alpha$  und  $\beta$  ein Merkmal darstellen, welches DCM-Patienten sowohl gegenüber gesunden Probanden als auch gegen Patienten mit ischämischer Herzkrankheit abgrenzt [124, 238]. Neben den aufgezählten intrazellulären Antigenen existieren auch auf der Zelloberfläche lokalisierte, wie zum Beispiel der kardiale  $\beta$ -adrenerge Rezeptor [104]. Die Bindung von Antikörpern setzt die  $\beta$ -adrenerge Signalkaskade in Gang [138], und möglicherweise ist deren dauerhafte Aktivierung für die beobachtete Abnahme der linksventrikulären Funktion sowie das häufigere Auftreten von Arrhythmien verantwortlich [32, 105].

Die Entdeckung von Autoantikörpern und die sich mehrenden Hinweise auf deren Bedeutung in der Pathogenese der dilatativen Kardiomyopathie führten zu verschiedenen, zumindest teilweise erfolgreichen Therapieansätzen. Zum einen kamen Chemotherapeutika wie Prednison und Azathioprin zum Einsatz, die die Aktivität des Immunsystems herabsetzten und somit die selbstzerstörerische Wirkung bremsen konnten. Allerdings sprachen nicht alle behandelten Personen positiv auf die Therapie an [71, 146]. Zum anderen wurden Autoantikörper durch Immunadsorption bereits erfolgreich aus dem Blut von DCM-Patienten entfernt, was bei einem großen

Teil der Behandelten zu einer Verbesserung der Herzleistung führte und einer weiteren, durch das Immunsystem getriebenen Progression der Krankheit vorbeugte [63, 156, 199].

#### **2.2.4 Toxische Formen**

Die Häufigkeit der durch Toxine hervorgerufenen Fälle von DCM wird – z. B. im Vergleich zu viral induzierten – als gering eingestuft. Unter den toxischen Substanzen, die den Herzmuskel schädigen können, spielen Alkohol und sein Metabolit Acetaldehyd eine herausragende Rolle. Diese Verbindungen schädigen die Mitochondrien und das sarkoplasmatische Retikulum und verursachen eine Reduktion der Proteinsyntheserate im Myokard [1, 206].

Außerdem können Medikamente wie Barbiturate, Zytostatika (bspw. Doxorubicin und Fluorouracil) oder Chloroquin (Malariatherapie und -prophylaxe) sowie Schwermetalle, Zigarettenrauch, Anabolika, Amphetamine und Kokain über eine toxische Myokarditis zu einer dilatativen Kardiomyopathie führen. Auch hier sind häufig Mitochondrienschädigungen zu beobachten [54, 57, 137, 197, 201, 208, 239, 243].

#### **2.2.5 Idiopathische Formen**

Formen einer DCM, welche ätiologisch/pathologisch (noch) nicht in die bisher genannten Kategorien eingeordnet werden können, fasst man unter dem Begriff Idiopathische dilatative Kardiomyopathie (IDCM) zusammen. Es wird intensiv nach den in diesen Fällen bisher nicht bekannten Grundlagen und Ursachen für das Krankheitsbild gesucht; einen Schwerpunkt bildet dabei die Identifizierung neuer Gene, denen eine Rolle im Krankheitsgeschehen zugeschrieben werden kann. Dies erfolgt zum einen mit Hilfe der „Target-Gen-Methode“, welche die Untersuchung von Genen mit einer vermuteten Assoziation zum pathophysiologischen Prozess in den Mittelpunkt stellt. Zum anderen werden molekularbiologische und proteomanalytische Techniken angewendet, um bei DCM-Patienten differentiell exprimierte Gene bzw. Proteine zu identifizieren. Durch die Analyse der im Vergleich von „gesund“ und „krank“ ermittelten Unterschiede rücken DNA-Abschnitte in den Fokus, deren Bedeutung für die Entstehung

und Progression der Erkrankung neu einzuschätzen ist. So konnte mittels Differential Display mRNA-Analyse eine die kardiovaskuläre Integrität negativ beeinflussende Überexpression der extrazellulären Kollagenase nachgewiesen werden [229]. Weitere Gene, deren Rolle in der Pathogenese der IDCM allerdings noch genauer untersucht werden muss, wurden mit Hilfe der Suppressions-Subtraktions-Hybridisierung (SSH) identifiziert: brain Anion Exchanger 3 (bAE3), mitochondriale ATPase 6 und Cytochrom C-Oxidase 3 [46].

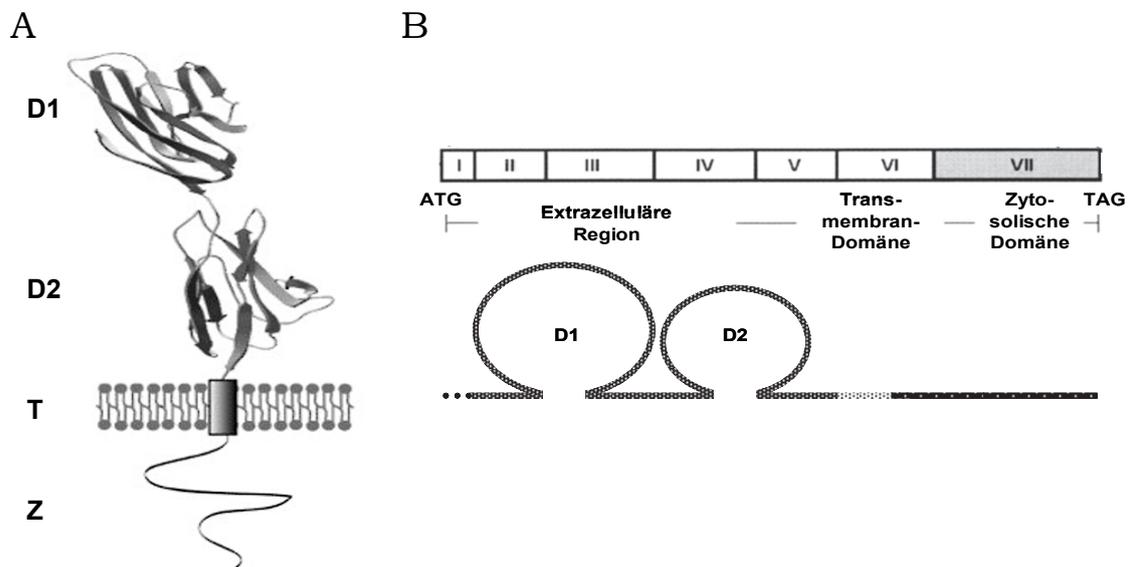
### **2.3 Der Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptor (CAR)**

Bereits 1965 stellten Zajac *et al.* fest, dass Enteroviren über einen extrazellulären, membranständigen Rezeptor an HeLa-Zellen binden [254]. Elf Jahre später zeigten Lonberg-Holm *et al.*, dass Coxsackieviren vom Typ B3 (und möglicherweise weitere Viren dieser Gruppe) dabei mit dem Adenovirus 2 um Kontaktstellen konkurrieren [136]. 1985 isolierten John Mapoles und Kollegen einen Coxsackievirus-Rezeptor-Komplex von der Oberfläche infizierter HeLa-Zellen. Das aufgereinigte Rezeptorprotein, als RP-a bezeichnet, interagiert mit Coxsackieviren der Typen B1 und B3, jedoch nicht mit dem Poliovirus Typ 1 [141]. 1997 wurde schließlich ein 46 kDa-Zelloberflächenprotein als gemeinsamer Rezeptor für Coxsackie- und Adenoviren beschrieben – der Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptor CAR [14]. Dieses Molekül wird von allen sechs Serotypen der Coxsackie-B-Viren sowie von Adenoviren der Gruppen A, C, D, E und F zur Bindung an ihre Zielzellen genutzt [14, 191].

#### **2.3.1 Aufbau**

CAR ist ein aus 365 Aminosäuren bestehendes transmembranales Glykoprotein aus der Immunglobulin-Superfamilie. Es besitzt eine aminoterminal extrazelluläre Domäne, welche sich aus zwei immunglobulinähnlichen Anteilen (D1 und D2) zusammensetzt, gefolgt von einer aus 22 AS bestehenden hydrophoben,  $\alpha$ -helikalen Transmembran-Domäne und einem hochkonservierten, 107 AS langen zytoplasmatischen Abschnitt am Carboxylende [14] (s. Abb. 7). Aufgrund der beiden extrazellulären Domänen D1 und D2 wird CAR der Immunglobulin-

Superfamilie zugerechnet, in die auch Proteine wie MHC I und II oder NCAM (**n**eural **c**ell **a**dhesion **m**olecule), welche eine Rolle in der Antigenpräsentation bzw. der Zelladhäsion spielen, eingeordnet werden [225].



**Abb. 7: Aufbau des Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptors, schematisch**

*Bild A:* Modell der CAR-Struktur; dargestellt sind die extrazellulären, Ig-ähnlichen Domänen 1 und 2 (D1, D2), die Transmembran-Region (T) und die zytoplasmatische Domäne (Z), aus [41].

*Bild B:* Schematische Darstellung des CAR-Gens und -Proteins. Exon I codiert das N-terminale Signalpeptid (\*\*), die Exons II und III verschlüsseln die Ig-ähnliche Domäne 1, während die Exons IV und V die Information für D2 enthalten. Der 1. Teil des Exons VI codiert die Transmembran-Region, der restliche Abschnitt des Gens die zytoplasmatische Domäne [56].

Nach der Beschreibung des humanen Rezeptors wurden CAR-Varianten mit einem zum Teil sehr ähnlichen Aufbau aus hydrophoben und hydrophilen Abschnitten auch in anderen Arten nachgewiesen, z. B. bei Mäusen, Ratten, Hunden, Rindern sowie Zebrafischen [60, 177, 223, 226]. Die Homologie der Aminosäuren innerhalb der Proteine schwankt zwischen den Spezies, eine besonders hohe Übereinstimmung zeigen humaner und muriner CAR (s. Abb. 8) mit 91 % Homologie in der extrazellulären Domäne sowie 77 % bzw. 95 % identischer Aminosäuren im Transmembran- und zytoplasmatischen Abschnitt [36].

Weitere Untersuchungen am CAR-Rezeptor der Maus führten zum Nachweis zweier Isoformen (CAR1/CAR2), welche sich am C-Terminus in insgesamt 26 AS unterscheiden: mCAR2 ist gegenüber mCAR1 um 13 Aminosäuren verkürzt; 13 weitere AS sind ausgetauscht [15]. Durch die Lokalisierung

dieser Modifikationen am intrazellulären Carboxylende unterscheiden sich mCAR1 und mCAR2 nicht in ihren Ad- bzw. CVB-Bindungseigenschaften.

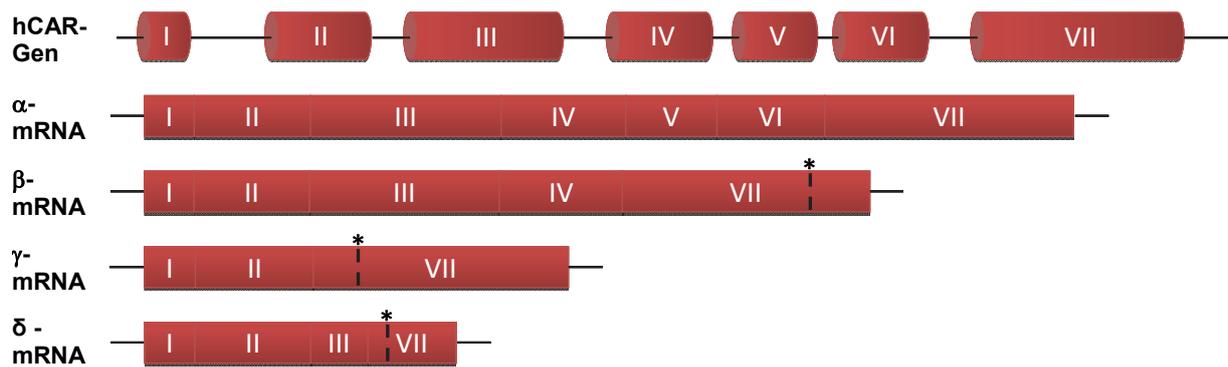
1	h	<u>MALLLCFVLLCGVVDFARSL</u> SITTP <del>EE</del> MI <del>E</del> KAKGETAYLPCKFTLSPEDQ
	m1,2	--R-----IA--TSG-----QR-----
51	h	GPLDIEWLISPADN <del>Q</del> KVDQVIILYSGDKIYDDYYPDLKGRVHFTSNDLKS
	m1,2	-----S---I-----N-----V--
		*
101	h	GDASINVTNLQLSDIGTYQCKVKKAPGVANKKIHLVVLVKPSGARC <del>Y</del> V <del>D</del> G
	m1,2	-----FL-T-----T--F---
151	h	SEEIGSDFKIKCEPKESLPLQYEWQKLSDSQKMPTSWLAEMTSSVISVK
	m1,2	-----N---L-----F-----T-----P-----
		*
201	h	<u>NASSEYSGTY</u> SCTV <del>R</del> NRVGS <del>D</del> QCLLR <del>L</del> NVPPSNKAGLIAGAIIGTLLAL
	m1,2	-----Q-----M---D-----R--T---V-----
251	h	<u>ALIGLIIFCC</u> RKKRREEKYEKEVHHDIREDVPPPKSRTSTARSYIGSNHS
	m1,2	V---A-L---HR-----
300	h	SLGSMSPSNMEGYSKTQYNQVPSEDFERTPQSPTLPPAKVAAPNLSRMGA
	m1	-----A-----A-----
	m2	-----A-----A---FKYAYKTDGIT
351	h	IPVMIPAQSKDGSIV
	m1	V-----
	m2	VV

**Abb. 8: Aminosäuresequenzen von humanem und murinem CAR, [15]**

Es sind die Aminosäure-Abfolgen des humanen CAR (h), des murinen Homologs (m1) sowie einer murinen Form mit einem veränderten C-Terminus (m2) dargestellt. Die Signal-Sequenz sowie die Transmembran-Domäne sind unterstrichen. (★): potentielle N-Glykosylierungsorte.

Auch bei Mensch und Ratte konnten entsprechende Isoformen mit C-terminalen Sequenzvariationen isoliert werden [60]. Cohen *et al.* führten das Auftreten von hCAR1 und hCAR2 auf alternatives Spleißen der prä-mRNA zurück [36]. Diese Theorie wird durch den Nachweis von drei Spleißvarianten ( $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ) des humanen CAR, welche zusätzlich zum alle sieben Exons umfassenden mRNA-Transkript ( $\alpha$ -Form) existieren, gestützt. Sie schließen unterschiedliche Teile des Gens ein und verfügen über verschiedene Stop-Signale im Exon 7 (s. Abb. 9) [224].

Neben dem humanen CAR-Gen, welches auf dem längeren Arm des Chromosoms 21 (21q11.2) lokalisiert ist, existieren mindestens vier verschiedene Pseudogene auf den Chromosomen 15, 18 und 21, deren Transkription und Translation aufgrund der starken Modifikationen gegenüber der Originalsequenz (Insertionen und Deletionen) jedoch nicht zu einem funktionellen Protein führen [27].



**Abb. 9: Spleißvarianten des humanen CAR-Gens,** nach [224]

Sequenzanalysen zeigen neben dem normalen Transkript ( $\alpha$ -mRNA) drei Spleißvarianten: die  $\beta$ -Form, der die Exons 5 und 6 fehlen, das  $\gamma$ -Transkript aus den Exons 1, 2 und 7 sowie die Variante  $\delta$ , welche sich aus den Exons 1 und 2, 21 Nukleotiden des Exons 3 und den letzten 97 Nukleotiden von Exon 7 zusammensetzt. Die Sternchen (\*) kennzeichnen verfrühte Stop-Signale für die Translation, die durch Leserasterverschiebungen beim Spleißen entstehen.

### 2.3.2 Biologische Funktion von CAR

Trotz zahlreicher Untersuchungen seit der Identifizierung des Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptors ist über dessen physiologische Bedeutung bisher nur wenig bekannt. Am schlüssigsten erscheinen verschiedene Befunde, die auf eine Rolle des CAR bei zellulären Adhäsionsprozessen hinweisen. So konnten van Raaij *et al.* mit Hilfe von Kristallisationsstudien zeigen, dass die immunglobulinähnliche Domäne D1 Homodimere ausbildet, welche mit dem CD2-D1-CD58-D1-Heterodimer vergleichbar sind und eine Dissoziationskonstante besitzen, die der anderer Zelladhäsionskomplexe entspricht [234]. Auch der Nachweis von CAR im Bereich wichtiger interzellulärer Verbindungen – wie zum Beispiel der epithelialen „tight junctions“ oder der kardialen *Disci intercalati* (Glanzstreifen) – sowie die Blockierbarkeit der Aggregation von Harnblasentumorzellen mit Hilfe eines CAR-spezifischen Antikörpers scheinen eine Funktion des Moleküls bei der Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten zu unterstreichen [37, 160, 164]. Durch die Generierung CAR-defizienter Mäuse konnte zudem die Wirkung des Proteins auf die normale Entwicklung verschiedener Organe bzw. Organsysteme genauer betrachtet werden. Dabei zeigte sich, dass CAR eine wichtige Rolle in der frühen Entwicklung des Herzens spielt, indem er sowohl die Proliferation als auch die Differenzierung des kardialen Gewebes beeinflusst. „Knock-out“-Embryonen

entwickelten einen Phänotyp mit schweren Fehlbildungen, wie z. B. einer Hyperplasie des linken Ventrikels und dem Fehlen der sinuatrialen Klappe, und verstarben in utero zwischen dem 12. und 13. Tag ihrer Entwicklung. Erfolgte das Abschalten des Gens (mit Hilfe des Cre-loxP-Systems) nach einem für die Entwicklung des Herzens kritischen Zeitpunkt, überlebte ein Großteil der Embryonen und entwickelte sich bis zum Erwachsenenalter; Angaben über nicht-letale anatomische oder funktionale Abnormitäten stehen bisher noch aus [8, 31]. Eine ähnlich große Bedeutung des murinen CAR wiesen Honda *et al.* für die Differenzierung neuronaler Gewebe während der Gehirnentstehung nach [93]. In anderen Organen konnten keine Fehlbildungen identifiziert werden, die mit einem gezielten Ausschalten der Rezeptor-Bildung assoziiert waren.

Die CAR-Expression ist stark reguliert und unterscheidet sich sowohl zwischen den Spezies als auch innerhalb verschiedener Entwicklungsstufen während der Ontogenese eines Individuums. Beim erwachsenen Menschen ließen sich die höchsten CAR-mRNA-Konzentrationen in Herz, Pankreas, Hoden und Prostata detektieren, adulte Mäuse dagegen wiesen die stärkste CAR-Expression in der Leber und deutlich geringere Transkriptionsraten in Herz, Lunge, Nieren und Gehirn auf [15, 60, 226]. Wie Tomko *et al.* sowie Mena *et al.* zeigen konnten, wird dabei der Rezeptor innerhalb eines bestimmten Organs nicht von allen Zellen in gleicher Stärke exprimiert, die CAR-Bildung scheint vielmehr auf bestimmte Zelltypen beschränkt zu sein [151, 225]. So ist beispielsweise bei hohen CAR-mRNA-Konzentrationen im humanen Pankreas eine Transkription des Gens in den Inselzellen nicht nachweisbar.

Die organspezifische CAR-Expression spiegelt sich auch in der unterschiedlichen Infizierbarkeit verschiedener Gewebe mit Coxsackieviren wider. Durch die Zu- oder Abnahme dieser CV-Empfindlichkeit im Laufe der Ontogenese wird die differentielle Regulation der CAR-Expression während der Entwicklung verdeutlicht. Mehrere Arbeitsgruppen konnten bei Untersuchungen an Mäusen und Ratten eine starke Reduktion der Rezeptor-Bildung in Herz und Gehirn vom neugeborenen hin zum erwachsenen Tier dokumentieren [102, 225]. Diese physiologische Verringerung der CAR-

Expression bei älteren Tieren führt z. B. zu einer signifikanten Abnahme der Erkrankungen an CVB3-induzierter Enzephalitis; auch die weiter oben bereits erwähnten deutlich geringeren phänotypischen Auswirkungen eines späten CAR-„knock-outs“ sind eine Konsequenz der sinkenden Bedeutung des Rezeptors während der Ontogenese [31, 252].

Die beschriebene, genetisch determinierte Reduktion der CAR-Transkription und -Translation innerhalb der Individualentwicklung kann jedoch infolge verschiedener (pathologischer) Prozesse und Reaktionen im Organismus beeinflusst bzw. umgekehrt werden. So steht die Induktion der CAR-Expression durch Entzündungsvorgänge und während der Geweberegeneration möglicherweise im Zusammenhang mit der Reaktivierung embryonaler Genexpressionsmuster [31, 102, 213]. Die diesem Phänomen zugrunde liegenden Abläufe sind noch nicht ausreichend untersucht. Es wäre jedoch vorstellbar, dass beim Verlust von Zellkontakten – z. B. durch die Gewebeerstörung im Zuge einer Entzündung oder in Folge eines Myokardinfarkts – bzw. beim Versuch, zerstörte Zellverbände zu ersetzen („tissue remodelling“), eine Signalkaskade ausgelöst wird, in deren Verlauf eine Aktivierung des CAR-Promotors erfolgt.

Untersuchungen von Okegawa *et al.* und weiteren Gruppen weisen dem Rezeptor auch eine Rolle bei der Beeinflussung der Expansion von Tumoren zu. Sowohl bei Harnblasen- als auch bei Prostata-Tumorzellen ließ sich eine negative Korrelation zwischen CAR-Expression und dem Wachstum der Karzinomzellen zeigen. Es wird vermutet, dass es durch den CAR-vermittelten Zellkontakt zur Auslösung einer Signalkaskade kommt, welche Regulatoren des Zellzyklus' in den Tumorzellen moduliert und somit zu einer Wachstumshemmung führt [163, 164].

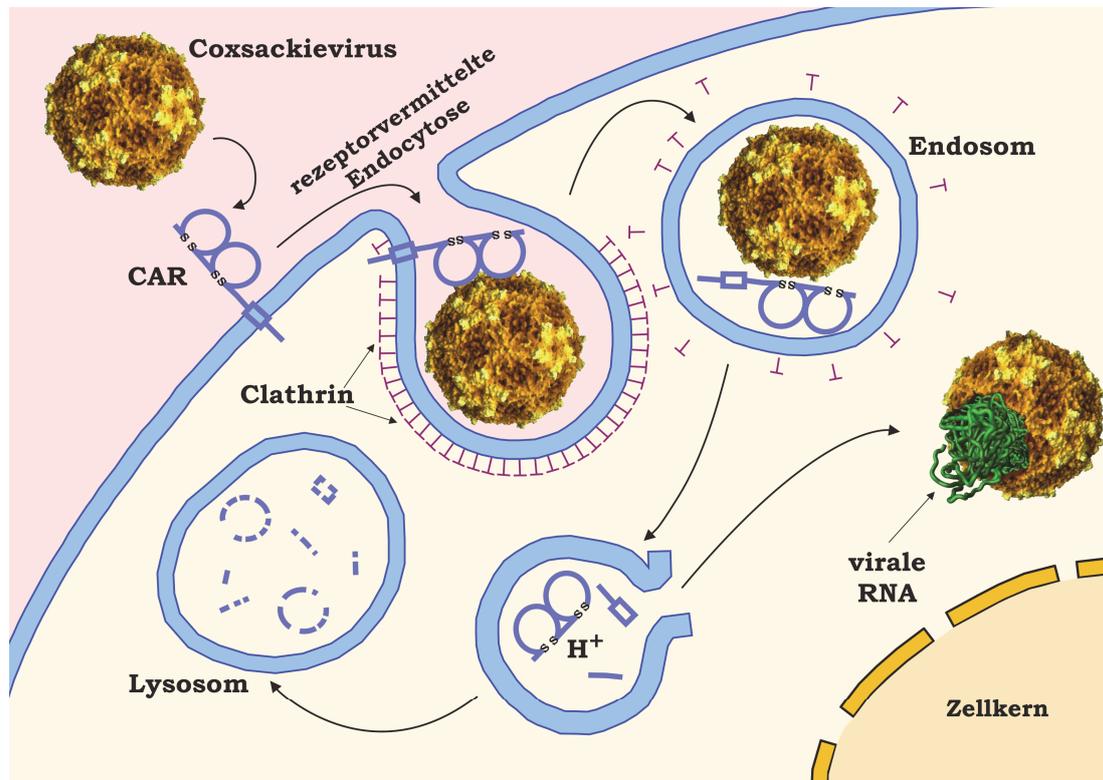
### **2.3.3 CAR als Virusrezeptor**

Der erste Schritt während der Infektion einer Zelle durch Viren ist deren Bindung an komplementäre Strukturen der Zelloberfläche („attachment“). Die Expression spezifischer Rezeptormoleküle ist häufig ein bestimmender Faktor für die Infizierbarkeit von Zellen und für den Gewebetropismus vieler Erreger. CAR wurde zuerst als ein Protein der Zellmembran beschrieben,

welches eine Rolle bei der Anlagerung und Aufnahme von Coxsackieviren der Gruppe B an bzw. in Zellen spielt. Später ließ sich seine Funktion als Bindungspartner auch für adenovirale Infektionen nachweisen [14, 141, 226]. Die Bedeutung von CAR im Infektionsverlauf sowie die neben dem Rezeptor an der Internalisierung der Erreger beteiligten Proteine weisen zwischen beiden Virusgruppen jedoch deutliche Unterschiede auf.

Für die Coxsackieviren der Gruppe B vermittelt CAR sowohl die Bindung an die Zelloberfläche als auch die Aufnahme ins Zellinnere. Die Interaktion findet zwischen dem distalen Ende der Domäne I von CAR und den Canyonstrukturen der Viruskapside statt. Die Lage der Rezeptorbindungsstelle innerhalb der engen Canyons könnte einen evolutionären Vorteil darstellen, da die Struktur auf diesem Weg dem Zugriff des Immunsystems über (die relativ großen) Antikörper fast vollständig entzogen ist. Dies erklärt auch die hohe Konservierung der für die komplementären Wechselwirkungen bedeutsamen geladenen Aminosäure-Reste innerhalb der sechs CVB-Serotypen. An der Rezeptorbindung sind alle externen Strukturproteine (VP1-3) des Viruskapsids beteiligt, die größte Bedeutung kommt jedoch VP1 zu, da es eine Vielzahl der geladenen AS bereitstellt [84]. Außerdem soll ein an VP1 gebundener Faktor, der sogenannte „pocket factor“, bei der Wechselwirkung zwischen Virus und Rezeptor freigesetzt werden und zur Destabilisierung des viralen Kapsids nach dem Eindringen in die Zielzelle beitragen. Wie Chung *et al.* zeigen konnten, lassen sich die ersten Virionen bereits 10 min p. i. innerhalb CAR-positiver Zellen nachweisen, als Infektionsweg wurde eine rezeptorvermittelte Endocytose mit Ausbildung Clathrin-umhüllter Vesikel („clathrin coated vesicles“, CCV) beschrieben. Nach dem Lösen der Clathrin-Hülle fusionieren diese Vesikel im Zytoplasma mit Endosomen [33]. Im sauren Milieu der Endosomen werden die viralen Kapside destabilisiert („uncoating“); es schließt sich die Translokation ins Zytoplasma an („viral escape“), wo die Virus-RNA freigesetzt wird und die viralen Replikationsvorgänge beginnen. Der Rezeptor CAR erfährt – im Gegensatz zu anderen Oberflächenmolekülen, die im Zuge einer Endocytose in die Zelle aufgenommen werden – keine

Wiederverwertung durch einen Rücktransport zur Zellmembran, sondern wird in den Endosomen/Lysosomen abgebaut (s. Abb. 10).



**Abb. 10: Rezeptorvermittelte Endocytose von CVB3, schematisch**

Dargestellt sind die Bindung des Virus an seinen Rezeptor CAR, die Bildung eines Clathrin-umhüllten Vesikels, die im Anschluss an die Fusion mit einem frühen Endosom erfolgende Ansäuerung des Milieus im Vesikel, welche die Destabilisierung des viralen Kapsids zur Folge hat, die Freisetzung der viralen RNA im Zytoplasma und der Abbau von CAR im Lysosom. (Viruspartikel von [209])

Neben CAR wird einem weiteren Protein der Zelloberfläche eine Rolle bei der Bindung von Coxsackieviren zugeschrieben – dem „decay accelerating factor“ (DAF/CD55) [211]. Die Expression dieses Glykophosphatidylinositol (GPI)-verankerten 70-kDa-Moleküls auf CAR-negativen Mausfibroblasten führte zwar nicht zu einer Infizierbarkeit mit CVB3 [27], allerdings konnte durch DAF-spezifische Antikörper die Infektion CAR-positiver Zellen verhindert oder zumindest eingeschränkt werden. DAF scheint somit die Funktion eines Co-Rezeptors zu erfüllen. Es wird spekuliert, dass über dieses Protein die erste Bindung der Erreger an die Zelloberfläche erfolgt, da der Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptor durch seine Lage in den „tight junctions“ nur eingeschränkt zugänglich ist, und dass die Viren anschließend an den eigentlichen Rezeptor „weitergereicht“ und mit diesem internalisiert werden [212].

Da *In vitro* z. T. auch CAR- und DAF-negative Zellen (bzw. mit CAR- und DAF-spezifischen Antikörpern inkubierte Zellen) durch CVB-Stämme infizierbar sind, wurden weitere Moleküle der Zellmembran als Infektionsvermittler beschrieben, so zum Beispiel Heparansulfate [170, 255].

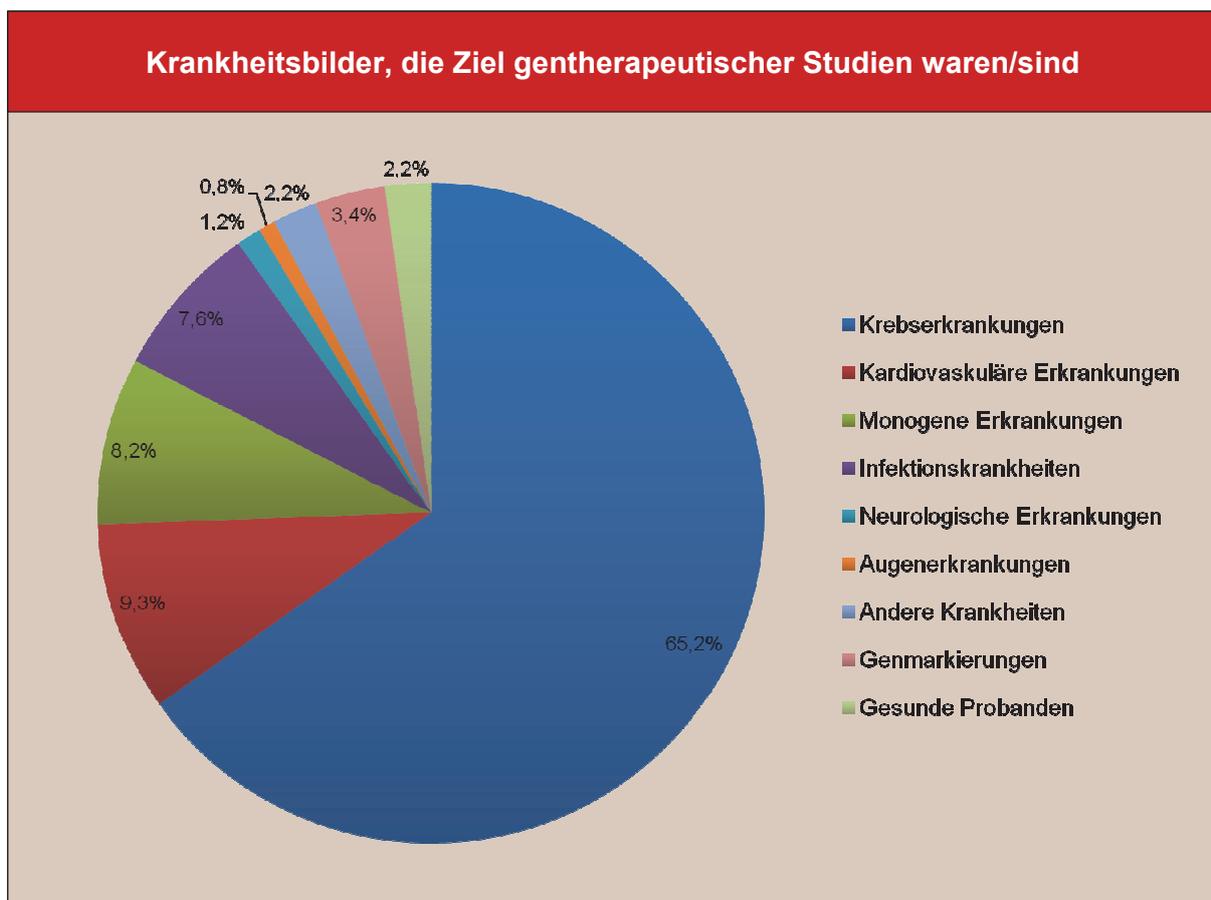
Die Bindung und Aufnahme von Adenoviren mehrerer Untergruppen erfolgt in zwei getrennten, aber zusammenwirkenden Schritten durch Interaktion mit verschiedenen Molekülen der Zelloberfläche. Das C-terminale Ende der antennenartigen Fibern (Fiberknopf) des Kapsids bindet über einige exponierte Aminosäurereste spezifisch an einen weiter proximal gelegenen Bereich der Domäne 1 des CAR. Durch die sich anschließende Wechselwirkung zwischen der RGD-Schleife des Pentonbasis-Proteins und zellulären  $\alpha_v$ -Integrinen (z. B.  $\alpha_v\beta_3$  und  $\alpha_v\beta_5$ ) wird die rasche Aufnahme der Virionen per rezeptorvermittelter Endocytose induziert [191]. Adenoviren nutzen CAR ausschließlich zur Bindung an die Zelloberfläche; die Bedeutung der Integrine für die eigentliche Infektion konnten Wickham *et al.* durch die Blockierung der Erregeraufnahme in die Zellen mit Hilfe Integrin-spezifischer Antikörper zeigen [246].

### **2.3.4 Bedeutung von CAR in der Gentherapie**

In den letzten Jahren rückt die Gentherapie bei verschiedenen Krankheiten und Krebsformen verstärkt in den Mittelpunkt des Interesses. Eine erfolgreiche Behandlung würde im Idealfall nach einmaliger Anwendung lebenslang wirken und somit einerseits die Lebensqualität des Patienten erhöhen, andererseits aber auch erhebliche Kosteneinsparungen mit sich bringen. Außerdem besteht die Hoffnung, auf diesem Weg Therapieansätze für bisher konventionell nicht behandelbare Krankheiten zu erschließen. Weltweit wurden und werden mehrere hundert klinische Studien durchgeführt – vor allem im Bereich der Krebserkrankungen (s. Abb. 11) – jedoch existieren bisher kaum etablierte, standardisierte Therapien.

Zur Einführung des therapeutischen Transgens werden nichtvirale und virale Verfahren angewandt. In die erste Gruppe gehören z. B. die Elektroporation, die Mikroinjektion sowie die Transfektion mit Protein-DNA-Komplexen und Liposomen; der Nachteil dieser Methoden liegt in ihrer

geringen Transfektionseffizienz oder in der Beschränkung auf wenige Zellen. In den meisten klinischen Gentherapie-Studien kommen daher virale Vektoren zum Einsatz. Die im Moment gebräuchlichsten Transfer-Viren sind Retro- und Adenoviren, Alternativen (bspw. Hepatitis-B-Viren, Influenzaviren [28, 172]) werden intensiv erforscht. Da Retroviren ins Wirtsgenom integrieren, besteht die Gefahr der Insertionsmutagenese von Tumorsuppressor- oder Onkogenen. Weitere Schwächen dieses Systems sind die Beschränkung der Transduktion auf sich teilende Zellen und die durch das Komplementsystem bedingte geringe Halbwertszeit der Viren im Blutkreislauf. Adenoviren dagegen gelten als für den Menschen nicht onkogen, können in hohen Titern präpariert werden, infizieren auch ruhende Zellen mit großer Effizienz und weisen eine enorme Verpackungskapazität auf. Die Expression des in die Zielzellen eingebrachten genetischen Materials beginnt innerhalb von 5 Stunden. Trotz der durch sie ausgelösten, z. T. heftigen Immunreaktionen stellen Adenoviren somit in vielen gentherapeutischen Ansätzen das Mittel der Wahl dar.



**Abb. 11:** Indikationen gentherapeutischer Studien, nach [109]

Der Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptor als primärer Bindungspartner der viralen Genföhren wird jedoch beim adulten Menschen nur in wenigen Geweben in nennenswerter Menge gebildet. Außerdem konnten mehrere Arbeitsgruppen zeigen, dass in verschiedenen, für eine Gentherapie besonders interessanten Tumoren die Rezeptorexpression noch weiter herabgesetzt ist, so dass eine effiziente Übertragung des genetischen Materials verhindert wird [25, 163, 193]. Dies verdeutlicht die Notwendigkeit, die Mechanismen, welche die Rezeptorexpression steuern, aufzuklären und Wege zu finden, die CAR-Synthese auch in primär nicht infizierbaren Geweben zu induzieren. Erste Fortschritte wurden bereits erzielt. So konnten u. a. Pong *et al.* Wirkstoffe mit einem expressionssteigernden Einfluss identifizieren [180]. Auch durch Manipulationen der CAR-Struktur (Deletion der cytoplasmatischen und der transmembranalen Domäne) oder durch die Transfektion der Zielzellen mit einem CAR-exprimierenden Vektor ließ sich eine Erhöhung der Rezeptordichte auf der Zelloberfläche hervorrufen [116, 231]. Einen weiteren Ansatz stellt die Generierung modifizierter Adenoviren mit einer verstärkten Affinität zu CAR oder mit der Fähigkeit, an andere Moleküle der Zellmembran zu binden, dar [43]. Zukünftige Arbeiten müssen zum einen darauf abzielen, die bereits gewonnenen Erkenntnisse in eine praktische Anwendung zu überführen und andererseits – unter anderem durch die genaue Begrenzung einer CAR-Überexpression auf die Zielgewebe – die Sicherheit und Effektivität einer Gentherapie zu erhöhen. In diesem Zusammenhang ist auch Befunden nachzugehen, dass eine gesteigerte CAR-Expression in Tumorzellen deren Überlebenswahrscheinlichkeit und Invasivität erhöhen kann [23]. Wenn es gelingt, die genannten Probleme zu lösen, steht in Zukunft mit der adeno-viral getragenen Gentherapie eine Behandlungsoption für viele, heute noch nicht beherrschbare Erkrankungen zur Verfügung.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Materialien

##### 3.1.1 Geräte

Tab. 2: Verwendete Geräte

Elektrophoresekammern	Agagel Mini	Biometra
	Agagel Midi	Biometra
	Mini Protean II	Bio-Rad
Gefriermikrotom	2800 Frigocut N	Leica
Geldokumentationssystem	HEROLAB	Herolab GmbH
Mikroskop	Telaval 3	Zeiss
PCR-Geräte	Personal Cyclor	Biometra
	UNO II	Biometra
	Mastercycler gradient	Eppendorf
	PTC-200	MJ Research
	Light Cyclor	Roche
Photometer	NanoDrop ND-1000	Kisker
	Photometer UV-160A	Shimadzu
Sequenzierer	CEQ-8000	Beckman Coulter

##### 3.1.2 DNA- und Proteinstandards

- $\phi$ X174HaeIII /  $\lambda$ HindIII Finnzymes
- HyperLadder I Bioline
- PageRuler Prestained Protein Ladder Fermentas

##### 3.1.3 Oligonukleotide

Die Sequenzen der in dieser Arbeit eingesetzten Oligonukleotidprimer wurden unter Verwendung der Oligo 6.0 Primer Analysis Software und von

Primer3 ermittelt. Die Herstellung der Primer erfolgte mit Hilfe der Phosphoamid-Methode mit dem Expetide Nr. 8909 (Firma PerSeptive Biosystems) durch Dr. E. Birch-Hirschfeld (Institut für Virologie und Antivirale Therapie, Universitätsklinikum Jena).

**Tab. 3: Verwendete Oligonukleotide**

Bezeichnung	Sequenz	Verwendung
GAPDH-F	5'-TGAAGGTCGGAGTCAACGGATTTGGTC-3'	Nachweis von hu-GAPDH, PCR-Kontrolle
GAPDH-R	5'-CATGTGGGCCATGAGGTCCACCAC-3'	
hu- $\beta$ -Aktin-F	5'-ATCTGGCACCACACCTTCTACAATGAGCTGCG-3'	Nachweis von hu- $\beta$ -Aktin, PCR-Kontrolle
hu- $\beta$ -Aktin-R	5'-CGTCATACTCCTGCTTGCTGATCCACATCTGC-3'	
mu- $\beta$ -Aktin-F	5'-ATGGATGACGATATCGCT-3'	Nachweis von mu- $\beta$ -Aktin, PCR-Kontrolle
mu- $\beta$ -Aktin-R	5'-ATGAGGTAGTCTGTCAGGT-3'	
CAR1-F	5'-CAGGAGCCATTATAGGAACTT-3'	Nachweis von hu-CAR-cDNA
CAR1-R	5'-CAGGTGGGAGAGTCGGA-3'	
mCAR-F	5'-ACGCAGAGAAGAGAAGTACGA-3'	Nachweis von mu-CAR-cDNA
mCAR-R	5'-AGGACATCACGGCTCA-3'	
LC7-F	5'-GCTTGCTCTAGCGCTCATTGGTCTTATC-3'	Real-time PCR von hu-CAR
LC7-R	5'-CCGATGTAGCTTCTGGCAGTGGACGTA-3'	
mCAR LC-F	5'-AGTGAAGAAAGCCCCTGGGGTTG-3'	Real-time PCR von mu-CAR
mCAR LC-R	5'-GTGGAAGGGAGCCTTCCTTG-3'	
$\beta$ -Aktin LC-F	5'-TGGGCGACGAGGCCAGAGCAAGAGA-3'	Real-time PCR von mu- $\beta$ -Aktin
$\beta$ -Aktin LC-R	5'-GCTCATTGTAGAAGGTGTGGTGCCAG-3'	
CARE1-F	5'-CGGAAGTGACGCGAGTT-3'	PCR, Sequenzierung von Exon 1
CARE1-R	5'-CACGCCCCATTGTTTC-3'	
CARE2-F	5'-CCGTCCTGTATCCCTCG-3'	PCR, Sequenzierung von Exon 2
CARE2-R	5'-GCCTTCCTCACCCAGACCATA-3'	
CARE3-F	5'-TTGTTTTTCCTCCTGTCTA-3'	PCR, Sequenzierung von Exon 3
CARE3-R	5'-CTTCTTACTTTTCCTATCC-3'	
CARE4-F	5'-AATGAGTCAGTGGTTGTGTAC-3'	PCR, Sequenzierung von Exon 4
CARE4-R	5'-CCCCTACTAGATCTTA-3'	

**Tab. 3: Verwendete Oligonukleotide (Fortsetzung)**

CARE5-F	5'-ATTTGGAGAGGACTATGTTTA-3'	PCR, Sequenzierung von Exon 5
CARE5-R	5'-GAACTAAAGGAGGTGGTA-3'	
CARE6-F	5'-AAATGTATAGCCTACCTTCAGTAT-3'	PCR, Sequenzierung von Exon 6
CARE6-R	5'-GCAGTGGTTCTTAAATGGGGTAC-3'	
CARE7-F	5'-ATTCTCTTGACATGTATTGG-3'	PCR, Sequenzierung von Exon 7
CARE7-R	5'-GGAACACGGAGAGCA-3'	
CAR-P1-F	5'-GGAAGAGCAGCCGACAACA-3'	PCR, Sequenzierung der Promotorregion
CAR-P1-R	5'-CACATACTGAAATTGCGTTGG-3'	
Oligo-dT <sub>18</sub>	5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'	Reverse Transkription

### 3.1.4 Klinische Proben

#### 3.1.4.1 Gewebe

Als Probenmaterial dienten im Zuge einer Transplantation entnommene Herzen bzw. während einer Endomyokardbiopsie gewonnene Gewebestücke. Die Untersuchungen erfolgten an linksventrikulärem Gewebe von männlichen Patienten im Alter zwischen 39 und 71 Jahren mit diagnostizierter DCM und nachgewiesener Enterovirus-RNA. Als Kontrolle fungierte linksventrikuläres Gewebe von Organspendern, deren Herzen nicht zur Transplantation verwendet werden konnten. Für die geplanten Versuche lag ein positives Votum der Ethikkommission des Universitätsklinikums Jena zur Verwendung des humanen Materials vor.

Das Myokard wurde aus der freien linksventrikulären Wand gewonnen und nach Spülen in physiologischer NaCl-Lösung unmittelbar in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

Eine DCM wurde nach den Kriterien der WHO [189] unter Ausschluss folgender Erkrankungen diagnostiziert:

- koronare Herzerkrankung (Koronarangiographie)
- Vitium (2D- und Doppler-Echokardiographie, Ventrikulographie, Druckmessung in beiden Kreisläufen)

- Speicherkrankheit (histologisch, einschließlich Elektronenmikroskopie)
- floride Myokarditis (histologisch)
- Hypertonie (anamnestisch, echokardiographischer Ausschluss einer linksventrikulären Hypertrophie)
- Alkoholabusus

Die histologischen Diagnosen wurden am Städtischen Klinikum Darmstadt (Prof. Dr. Mall) im Rahmen der routinemäßigen Evaluierung ausgeführt.

Der Enterovirus-Status der DCM-Patienten wurde am Institut für Virologie und Antivirale Therapie des UKJ durch PCRs mit Plus- und Minusstrang-spezifischen Primern bestimmt.

Kardiochirurgische Kooperationspartner waren einerseits das Herz- und Diabeteszentrum NRW, Klinik für Herzchirurgie (Prof. Dr. Körfer) sowie die Klinik für Kardiochirurgie am UKJ (Prof. Dr. T. Wahlers).

#### **3.1.4.2 Blutproben**

Für die Isolation von genomischer DNA aus dem Vollblut von DCM-Patienten und gesunden Probanden wurde dieses nach Abnahme (in EDTA-beschichteten Röhrchen) eine halbe Stunde auf Eis gestellt und anschließend bei -20 °C gelagert.

#### **3.1.5 Versuchstiere**

Die für quantitative Untersuchungen im Mausmodell verwendeten Gewebeproben stammten von zwei bis drei Monaten alten, männlichen BALB/c- bzw. C57BL/6-Mäusen. Die Inzucht-Tiere wurden vom Institut für Versuchstierkunde der Friedrich-Schiller-Universität Jena zur Verfügung gestellt.

#### **3.1.6 Viren**

Die Infektionsversuche in der Zellkultur und im Mausmodell erfolgten unter Verwendung folgender Variante des Virusstammes „Nancy“:

- CVB3H3 (Variante Woodruff [232])

### 3.1.7 Software

- BioEdit 7.0 T. Hall (Ibis Biosciences, Carlsbad, CA, USA)
- CEQ-8000-Software inkl. CEQuence Investigator Beckman Coulter
- E.A.S.Y.Win 32 Herolab GmbH
- MEGA 3.1 S. Kumar, K. Tamura, M. Nei, (Center for Evolutionary Functional Genomics, Tempe, USA)
- Oligo 6.0 Molecular Biology Insights (Cascade, CO, USA)
- ScanPack II Biometra biomedizinische Analytik GmbH
- Vector NTI Advance 10 Invitrogen Corporation

### 3.1.8 Datenbanken

Der Datenbankabgleich der sequenzierten PCR-Produkte erfolgte unter Zuhilfenahme der blast-Programme auf der Internetseite des National Center for Biotechnology Information (NCBI), USA.

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>

Außerdem wurden folgende Internetressourcen genutzt:

- <http://frodo.wi.mit.edu/> (Primer3)
- <http://bimas.dcrct.nih.gov/molbio/proscan> (Promoter Scan)
- <http://www.expasy.ch> (ExpASy Proteomics Server)
- <http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php> (NEBcutter V2.0)

## 3.2 Zellbiologische Methoden

Die Experimente zur Beeinflussung der CAR-Expression wurden in folgenden Zelllinien durchgeführt:

- HeLa-Zellen: humane epitheliale Karzinomzelllinie, etabliert aus einem Zervixkarzinom (durch HPV18 hervorgerufen), adhärent;

- 293-Zellen: humane embryonale Nierenzellen (HEK-), transformiert mit Adenovirus-Typ 5-DNA, adhären, mit epithelialer Morphologie;
- L-929-Zellen: murine Bindegewebsfibroblasten, etabliert aus einer männlichen C3H/An-Maus, adhären, mit epithelialer Morphologie;
- GMK-Zellen: Nierenzellen der Afrikanischen Grünen Meerkatze („**g**reen **m**onkey **k**idney“), adhären, mit epithelialer Morphologie.

### 3.2.1 Zellkultivierung

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Plastik-Gewebekulturflaschen (25, 75 cm<sup>2</sup>) oder Plastik-Gewebekulturschalen (Ø 10 cm) bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt und 95 % Luftfeuchtigkeit. Für eine Passage wurden die Zellen bei konfluentem Wachstum nach dem Abnehmen des Kulturmediums durch die Inkubation mit einer Trypsinlösung vom Kulturgefäßboden gelöst, in frischem Medium resuspendiert und nach Bedarf neu ausgesät.

Sollten Zellen über einen längeren Zeitraum gelagert werden, erfolgte dies in Form von Kryokulturen. Hierfür wurde den resuspendierten Zellen 10 % DMSO zugesetzt und die Suspension anschließend erst bei -80 °C und dann bei -170 °C in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Zum Weiterführen einer Kryokultur wurde diese zügig aufgetaut, in frischem Medium aufgenommen und für 10 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Nach Resuspendieren des Zellpellets in Medium erfolgte die weitere Kultivierung der Zellen wie oben beschrieben.

- Medium für 293- und GMK-Zellen: DMEM-Medium („**D**ulbecco’s **m**odified **E**agle’s **m**edium“ [SIGMA-ALDRICH]) mit Zusatz von 10 % fetalem Kälberserum (SIGMA-ALDRICH, inaktiviert bei 56 °C für 30 min); 0,075 % NaHCO<sub>3</sub>; 100 U/ml Penicillin/100 µg/ml Streptomycin (CAMBREX: PEN-STREP [10000 U/ml Penicillin, 10000 µg/ml Streptomycin])
- Medium für HeLa-Zellen: EMEM-Medium („**E**agle’s **m**inimum **e**ssential **m**edium“ [CAMBREX]) mit Zusatz von 10 % fetalem Kälberserum, 100 U/ml Penicillin/100 µg/ml Streptomycin und 2 mM Glutamin

- Medium für L-929-Zellen: RPMI 1640-Medium („Roswell Park Memorial Institute“ [BIOCHROM AG]) mit Zusatz von 10 % fetalem Kälberserum und 100 U/ml Penicillin/100 µg/ml Streptomycin

### 3.2.2 Infektion und/oder Inkubation mit Zytokinen

Je nach Experiment erfolgten die Aussaat von Zellen in Gewebekulturschalen und die Kultivierung mit oder ohne Zusatz von Zytokinen bis zu einer ca. 90%igen Konfluenz. Vor der Viruszugabe wurden die Zellzahl bestimmt und das Medium gewechselt. Dann erfolgte die Infektion der Zellen mit einer „multiplicity of infection“ (m.o.i.) von 5, d. h., es wurde eine dem Fünffachen der Zellzahl entsprechende Menge an infektiösen Einheiten hinzupipettiert. Anschließend wurden – abhängig vom Versuchsaufbau – Zytokine zugegeben, Kontrollproben (0 h-Proben) entnommen und die infizierten Zellen bis zur Probennahme im Brutschrank inkubiert. Sowohl für Protein- als auch für RNA-Isolierungen schlossen sich an die Ernte der Zellen zu den geplanten Zeitpunkten eine Zentrifugation (5 min bei 5000 rpm) und die Lagerung der Zellpellets bei -80 °C an.

**Tab. 4: Verwendete Zytokine**

Zytokin	eingesetzte Konzentration	Anbieter
IL-1 $\alpha$	20 ng/ml	R&D Systems
IL-1 $\beta$	20 ng/ml	R&D Systems
IL-4	10 ng/ml	Endogen
IL-10	35 ng/ml	Bachem
IFN- $\alpha$	2000 U/ml	Santa Cruz Biotechnology
IFN- $\beta$	500 U/ml	Jena Bioscience
IFN- $\gamma$	1000 U/ml	Jena Bioscience

## 3.3 Virologische Methoden

### 3.3.1 Virusvermehrung

Die Vermehrung der Viren erfolgte in konfluenten GMK-Zellen. Nach Zugabe der Viruslösung und einer 45-minütigen Inkubation der Zellen im

Brutschrank unter regelmäßigem Schwenken, die die Adhäsion der Viren ermöglichte, wurden frisches Medium zugegeben und die Zellen bis zur deutlichen Ausbildung eines zytopathischen Effekts (ZPE) weiterkultiviert. Zur Gewinnung der Viren aus den Zellen wurden die Kulturflaschen dreimal bei -80 °C eingefroren und wieder aufgetaut. Es schlossen sich eine 10-minütige Zentrifugation bei 5000 rpm und die Portionierung des virushaltigen Überstandes an, welcher bis zur Verwendung (nach Bestimmung der Viruskonzentration) bei -80 °C aufbewahrt wurde.

### **3.3.2 Bestimmung der Viruskonzentration**

#### **3.3.2.1 Plaque-Test**

Für diesen Test wurden konfluente GMK-Zellkulturen in 6-well-Zellkulturplatten mit einem definierten Volumen (333 µl) der Viruslösung in verschiedenen Verdünnungsstufen (1:10) infiziert. Nach einer 45-minütigen Inkubation der Platten im Brutschrank unter regelmäßigem Schwenken wurden der Überstand mit den nicht adhären Viren abgenommen und die Zellen mit Agar-haltigem Medium (Overlay) überschichtet, um die vertikale Ausbreitung der Viruspartikel zu verhindern. Es schloss sich die – in der Regel dreitägige – Inkubation der Zellen im Brutschrank bis zur Ausbildung von Lysehöfen (Plaques) an. Nach dem Anfärben der lebenden Zellen mit Kristallviolett-Formaldehyd und der Entfernung des Overlays war das Auszählen der (nichtgefärbten) Plaques in den einzelnen wells möglich. Die Viruskonzentration wurde – bezogen auf das Volumen (333 µl) und die Verdünnungsstufe – in infektiösen Einheiten (plaque forming units) je ml errechnet [pfu/ml].

- Overlay: doppelt konzentriertes MEM („**M**inimal **e**ssential **m**edium Eagle“, [SIGMA-ALDRICH]; 47,95 g gelöst in 2,5 l Aqua dest.; sterilfiltriert) mit Zusatz von 10 % fetalem Kälberserum und 100 U/ml Penicillin/100 µg/ml Streptomycin sowie 0,5 % Agar („Purified Agar“ [DIFCO LABORATORIES]; Stammlösung: 1 % in sterilem Aqua dest.), temperiert auf 42 °C
- Kristallviolett-Formaldehyd-Lösung: 0,2 % Kristallviolett; 3,5 % Formaldehyd; 20 % Ethanol

### **3.3.2.2 TCID<sub>50</sub>-Test**

In die Vertiefungen von 96-well-Zellkulturplatten wurden je 100 µl einer GMK-Zellsuspension ( $2 \times 10^5$  Zellen/ml) pipettiert. Nach einer zweistündigen Inkubation im Brutschrank erfolgte das Auftragen der Virusverdünnungen (10-fach) auf die Zellen in vier Parallelen à 50 µl/well. Es schlossen sich eine vier- bis fünftägige Inkubationsphase, das mikroskopische Untersuchen der Zellen auf das Vorhandensein eines ZPEs und die Berechnung der Viruskonzentration nach Reed und Muench (Verdünnung, in welcher im Durchschnitt noch eine infektiöse Einheit pro eingesetztem Volumen vorhanden ist) [186] an.

## **3.4 Molekularbiologische und -genetische Methoden**

### **3.4.1 Untersuchungen zur CAR-Expression bei DCM-Patienten**

#### **3.4.1.1 RNA-Gewinnung aus humanem Herzgewebe**

Die Isolierung der zellulären Gesamt-RNA aus humanem linksventrikulärem Myokard (explantiertes Gewebe oder Biopsiestücke) erfolgte unter Verwendung des RNeasy Mini Kits (QIAGEN) und der mitgelieferten Pufferlösungen nach dem zugehörigen Protokoll für RNA-Minipräparationen (20 bis 50 mg Gewebe).

#### **3.4.1.2 Reverse Transkription der mRNA**

Auf die Isolierung folgte – mit Hilfe einer retroviralen Reversen Transkriptase („AMV Reverse Transcriptase“ [PROMEGA]) – die Umschreibung der RNA in DNA. Durch den Einsatz eines oligo-d(T)-Primers wurden dabei gezielt die zellulären mRNA-Spezies mit ihren 3'-Poly-A-Sequenzen erfasst.

Nach der Bestimmung der RNA-Konzentration mit dem NanoDrop-Photometer wurden 2 µg RNA (auf 10 µl aufgefüllt mit nukleasefreiem Wasser) für 10 min bei 70 °C im Heizblock inkubiert. Nach 3 min auf Eis erfolgte die Zugabe folgender Reagenzien:

4 µl	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)
2 µl	10x Reverse Transcription Buffer
2 µl	dNTPs (10 mM)
1 µl	oligo-d(T)-Primer (0,5 µg/µl)
1 µl	Reverse Transcriptase

Anschließend durchliefen die Proben folgendes Programm im Thermocycler:

50 min 42 °C  
 5 min 95 °C  
 5 min 4 °C

Die cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

### **3.4.1.3 Qualitativer Nachweis der hCAR-Transkription**

Für den Nachweis von CAR-mRNA in humanem Myokardgewebe wurde die aus 2 µg Gesamt-RNA synthetisierte cDNA in einer PCR nach folgendem Ansatz und Temperaturregime amplifiziert:

1 µl cDNA  
 18,9 µl H<sub>2</sub>O  
 2,5 µl 10x Puffer  
 0,5 µl dNTP-Mix  
 0,5 µl CAR1-F-Primer (10 µM)  
 0,5 µl CAR1-R-Primer (10 µM)  
 0,1 µl DNA-Polymerase (10 U/µl; BIOMETRA)

5 min 95 °C  
 30 s 95 °C  
 30 s 55 °C  
 30 s 72 °C  
 5 min 72 °C.

} 30 x

Die Auftrennung und Überprüfung des resultierenden PCR-Produkts (294 bp) erfolgte in einem 1,5%igen Agarosegel.

### **3.4.1.4 Equilibrierung der cDNA-Proben**

Um die Expression des CAR-Gens im Myokard von DCM-Patienten auf der einen Seite und von gesunden Probanden auf der anderen Seite vergleichen zu können, wurden die entsprechenden cDNA-Proben unter Zuhilfenahme des Haushaltsgens GAPDH durch kompetitive PCR equilibriert. Hierfür kam ein Kompetitorfragment bekannter Größe und Konzentration (352 bp, 1000 attomol/µl) zum Einsatz, welches Bindungsstellen für GAPDH-Primer besitzt (PCR MIMIC Construction Kit, CLONTECH [34, 130]). In der kompetitiven PCR konkurrieren das Kompetitorfragment und die cDNA,

welche aus der mRNA der Myokardzellen synthetisiert wurde und so auch das Transkript des Haushaltgens GAPDH enthält, um die Primer. Durch das Wiederholen der PCR mit unterschiedlichen Kompetitorverdünnungen konnte für jede cDNA-Probe eine Angleichung der Konzentrationen von GAPDH und Kompetitor erzielt werden.

1 µl	cDNA
1 µl	Kompetitorfragment
18,9 µl	H <sub>2</sub> O
2,5 µl	10x Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1,5 mM MgCl <sub>2</sub> )
0,5 µl	dNTP-Mix (200 µM)
0,5 µl	GAPDH-F-Primer (200 nM)
0,5 µl	GAPDH-R-Primer (200 nM)
0,1 µl	DNA-Polymerase (10 U/µl; BIOMETRA)

Die PCR-Bedingungen waren wie folgt:

3 min	95 °C	} 29 x
30 s	95 °C	
45 s	66 °C	
30 s	72 °C.	

Die resultierenden zwei PCR-Produkte (472 bzw. 352 bp) wurden nach Auftrennung in einem 1,5%igen Agarosegel sichtbar gemacht. Es schlossen sich die videodensitometrische Analyse der Produkt-Banden mit Hilfe des ScanPack II-Programms (BIOMETRA) und das Einstellen der cDNAs auf eine Konzentration von 0,25 attomol relativ zum Kompetitorfragment an.

#### **3.4.1.5 Semiquantitative PCR**

Die equilibrierten cDNA-Proben wurden nun nach folgendem Ansatz auf die Expression des CAR-Gens hin untersucht:

2 µl	cDNA (eingestellt mit H <sub>2</sub> O, s. o.)
18,9 µl	H <sub>2</sub> O
2,5 µl	10x Puffer (s. o.)
0,5 µl	dNTP-Mix (200 µM)
0,5 µl	GAPDH-F- bzw. CAR1-F-Primer (200 nM)
0,5 µl	GAPDH-R- bzw. CAR1-R-Primer (200 nM)
0,1 µl	Dynazyme-Polymerase (10 U/µl)

Die PCR-Bedingungen entsprachen denen der kompetitiven PCR (3.4.1.4). Durch die anschließende elektrophoretische Auftrennung im Agarosegel und die computergestützte Analyse mittels ScanPack II konnten Werte für die Expression von CAR erfasst werden.

### **3.4.2 Untersuchungen zur CAR-Expression im Mausmodell**

Zur Untersuchung der Expression des murinen CAR wurden männliche BALB/c- bzw. C57BL/6-Mäuse mit CVB3H3 (je 10000 pfu) i. p. infiziert. Als Kontrollen dienten nicht-infizierte Tiere. Drei Tage p. i. wurden die Mäuse getötet und Herz, Milz sowie Pankreas entnommen.

#### **3.4.2.1 RNA-Gewinnung aus murinen Gewebeproben**

Die gesamte RNA-Isolierung wurde auf Eis durchgeführt, die Lösungen 1 (Lsg. 1) und 2 (Lsg. 2) wurden jeweils frisch angesetzt. Anschließend erfolgte die Zerkleinerung des gefrorenen Organgewebes in 1 ml der Lösung 1 mittels einer Kugelmühle. Nach der Zugabe von 2x 650 µl Lsg. 2 wurden die Proben 30 s gevortext und anschließend 30 min auf Eis gestellt. Es schloss sich eine 15-minütige Zentrifugation bei 10000 rpm und 4 °C an; die dabei entstandene wässrige Phase wurde im Verhältnis 1:1 mit kaltem Isopropanol gemischt. Die Fällung der RNA vollzog sich durch die Inkubation der Proben bei -20 °C für 2–4 h. Es folgte eine erneute Zentrifugation für 15 min bei 10000 rpm und 4 °C, der Überstand wurde entfernt und das Pellet in 300 µl Lsg. 1 und 300 µl eiskalten Isopropanols durch Vortexen gelöst. An die folgende Inkubation der Proben bei -20 °C über Nacht schlossen sich eine 30-minütige Zentrifugation bei 13000 rpm und 4 °C, das Entfernen des Überstandes und das zweimalige Waschen des RNA-Pellets mit je 500 µl 70%igem eiskaltem Ethanol an. Das für 15 min im Vakuum getrocknete RNA-Pellet wurde – je nach Größe – in 30, 60 oder 100 µl DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst, 30 min auf Eis inkubiert und anschließend (1:200 bzw. 1:500 verdünnt) im Photometer zur Konzentrationsbestimmung analysiert.

- Lösung D: 4 M Guanidinisothiocyanat in Aqua dest.; 17 mM Na-N-Laurylsarcosine; 25 mM Na-Citrat-Dihydrat; pH 7,0 (mit NaOH eingestellt)
- Lösung 1 (für 14 Proben): 19,5 ml Lösung D; 141 µl β-Mercaptoethanol

- Lösung 2 (für 14 Proben): 15 ml Phenol; 1,8 ml 3 M Na-Acetat; 3 ml Chloroform
- DEPC-H<sub>2</sub>O: 1 ml DEPC auf 1 l Aqua dest., 24 h bei RT rühren, 2x autoklavieren

### **3.4.2.2 Reverse Transkription der murinen Gesamt-RNA**

Die Umschreibung der RNA in cDNA fand nach folgendem, von dem unter 3.4.1.2 beschriebenen Ablauf abweichenden Protokoll unter Verwendung der „SuperScript II RNase H-Reverse Transcriptase“ (INVITROGEN) statt.

Nach der Bestimmung der RNA-Konzentration mit dem Photometer wurden 5 µg RNA (auf 10 µl aufgefüllt mit DEPC-H<sub>2</sub>O) und 1 µl oligo-d(T)-Primer (0,5 µg/µl) für 10 min bei 70 °C im Heizblock inkubiert. Nach 3 min auf Eis erfolgte die Zugabe folgender Reagenzien:

4 µl	5x FSB ( <b>F</b> irst <b>s</b> trand <b>b</b> uffer)
2 µl	dNTPs (10 mM)
2 µl	DTT (0,1 M)
0,5 µl	Reverse Transcriptase

Anschließend durchliefen die Proben im Thermocycler die Temperaturabfolge

10 min	25 °C
50 min	42 °C
5 min	95 °C.

Die cDNA wurde bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

### **3.4.2.3 Semiquantitative PCR**

Die Untersuchung der murinen cDNA-Proben auf die Expression des CAR-Gens hin fand nun nach folgendem Ansatz statt:

2 µl	cDNA
18,9 µl	H <sub>2</sub> O
2,5 µl	10x Puffer (s. o.)
0,5 µl	dNTP-Mix (200 µM)
0,5 µl	mu-β-Aktin-F- bzw. mCAR-F-Primer (10 µM)
0,5 µl	mu-β-Aktin-R- bzw. mCAR-R-Primer (10 µM)
0,1 µl	Dynazyme-Polymerase (10 U/µl)

Das PCR-Programm wurde an die Annealingtemperatur der murinen Primer angepasst:

5 min	95 °C	} 30 x
30 s	95 °C	
30 s	57 °C	
30 s	72 °C	
5 min	72 °C.	

Während der sich anschließenden computergestützten Analyse der im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennten PCR-Produkte konnten mit dem Haushaltsgen  $\beta$ -Aktin abgegliche Werte für die Expression von CAR erfasst werden.

#### **3.4.2.4 Real-time PCR**

Zur genaueren Ermittlung des Expressionsgrades des murinen CAR-Gens kamen das Real-time-Gerät der Firma Roche (LightCycler) sowie das QuantiTect SYBR Green PCR Kit (QIAGEN) zur Anwendung. Dabei konnte die Konzentration des PCR-Produktes während der Amplifikation durch die Bindung des Farbstoffs SYBR Green I an doppelsträngige DNA und die Detektion des resultierenden Fluoreszenzsignals direkt vermessen werden. Die Auswertung der PCR (LightCycler3 Run, Version 5.32) erfolgte unter Verwendung der zum Gerät mitgelieferten Software.

Je Probe wurden

1 $\mu$ l	cDNA
10 $\mu$ l	2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix
6 $\mu$ l	DEPC-H <sub>2</sub> O
1,5 $\mu$ l	mCAR LC-F-Primer (10 $\mu$ M) und
1,5 $\mu$ l	mCAR LC-R-Primer (10 $\mu$ M)

gemischt und in PCR-Kapillaren überführt. Die anschließende PCR folgte dem Schema:

- 1) Aktivierung der HotStar Taq-Polymerase
  - 2) Denaturierung
  - 3) Anlagerung der Primer
  - 4) Synthese
  - 5) Abschmelzen von Primer-Dimeren.
- } 35 Wiederholungen

Durch den Abgleich mit einer zuvor etablierten Standardkurve konnten die cDNA-Konzentrationen der Proben bestimmt werden. Für die Erstellung der Standardkurve wurden ein mCAR-Fragment in das Plasmid pcDNA3.1 kloniert, dieses anschließend linearisiert und in einer Verdünnungsreihe von  $10^1$ – $10^8$  Kopien/ $\mu\text{l}$  amplifiziert. Außerdem diente das Plasmid in jedem Lauf als interne Kontrolle. Um sicherzustellen, dass die in den Untersuchungen eingesetzten Mengen an cDNA zwischen den einzelnen Proben vergleichbar waren, erfolgte zusätzlich die parallele Amplifikation der Proben mit  $\mu\text{-}\beta$ -Aktin-Primern im Real-time-Gerät.

### **3.4.3 Mutationsanalyse im humanen CAR-Gen**

#### **3.4.3.1 DNA-Isolierung**

Unter Verwendung des QIAamp Blood Mini Kits (QIAGEN) wurde die genomische DNA von 30 Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie sowie von vier gesunden Kontrollpersonen aus den Leukozyten des peripheren Blutes isoliert.

#### **3.4.3.2 PCR-Amplifikation**

Vor der Sequenzierung erfolgte die Amplifikation der zu untersuchenden Genbereiche. Um die für das korrekte Spleißen der mRNA wichtigen Exon-Intron-Grenzen mit zu erfassen, mussten Primer gewählt werden, welche genügend weit innerhalb der Introns banden (s. Tab. 3). Die PCR wurde dann nach folgendem Ansatz:

2 $\mu\text{l}$	DNA (25 – 35 ng)
39,5 $\mu\text{l}$	H <sub>2</sub> O
5 $\mu\text{l}$	10x Puffer
1 $\mu\text{l}$	dNTP-Mix (10 mM)
1 $\mu\text{l}$	F-Primer (10 $\mu\text{M}$ )
1 $\mu\text{l}$	R-Primer (10 $\mu\text{M}$ )
0,5 $\mu\text{l}$	HF-Polymerase-Mix (10 U/ $\mu\text{l}$ , CLONTECH)

mit diesem Programm durchgeführt (yy = primerabhängige Annealingtemperatur):

5 min	95 °C	} 35 x
30 s	95 °C	
30 s	yy °C	
30 s	72 °C	
5 min	72 °C.	

Die Kontrolle der PCR erfolgte über die Auftrennung der Proben in einem 1,5–2%igen Agarosegel.

Nach der anschließenden Aufreinigung unter Verwendung des QIAquick PCR Purification Kits von QIAGEN und unter Befolgung des zugehörigen Protokolls lagen die PCR-Produkte in 30 µl H<sub>2</sub>O vor.

### 3.4.3.3 Cycle Sequencing

Für die Sequenzierungs-PCR nach der Kettenabbruchmethode von Sanger *et al.* [194] wurde ein DTCS („Dye Terminator Cycle Sequencing“) Quick Start Kit (BECKMAN COULTER) eingesetzt. Dabei sind die im Mastermix enthaltenen Didesoxyribonucleotidphosphate mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, so dass bei der Detektion der Sequenzierungsprodukte mit einem Laser während der Kapillarelektrophorese das jeweils zum Kettenabbruch führende (dd)Nukleotid genau identifiziert werden kann. Das Ansetzen der PCR erfolgte nach folgendem Schema:

3 µl	gereinigtes PCR-Produkt (50 – 100 ng)
13 µl	H <sub>2</sub> O
1 µl	F- bzw. R-Primer (10 µM)
3 µl	DTCS Quick Start Master Mix

Das PCR-Programm orientierte sich an Standardwerten, allerdings fand in wenigen Fällen eine – primerabhängige – Anpassung der Annealingtemperatur (\*) statt:

2 min	95 °C	} 30 x
30 s	95 °C	
30 s	55 °C *	
4 min	60 °C	

Durch Zugabe einer Lösung aus jeweils 2 µl NaOAc, 2 µl EDTA und 1 µl Glycogen wurde die Sequenzierungsreaktion gestoppt.

Anschließend mussten die Proben gereinigt werden, um Komponenten der Sequenzierungs-PCR und vor allem Salze, die die folgende Kapillarelektrophorese stören würden, zu entfernen. Die Sequenzierungsprodukte wurden nach Zugabe von 60 µl eiskalten 95%igen Ethanol 20 min bei 14000 rpm und 4 °C zentrifugiert, danach zweimal mit eiskaltem 70%igen Ethanol gewaschen (5 min, 14000 rpm, 4 °C) und nach Abnehmen des Überstandes ca. 10 min vakuumgetrocknet. Durch 10-minütige Inkubation in 30 µl Sample Loading Solution (SLS) bei RT wurden die Pellets resuspendiert, dann erfolgte das Auftragen der Proben auf eine 96-well-Platte und ihre kapillarelektrophoretische Auftrennung und Detektion in einem CEQ 8000 Genetic Analysis System (BECKMAN COULTER). Die Parameter des Laufes waren:

- 120 s Denaturierung der Proben bei 90 °C
- 15 s Aufnahme der DNA in die Kapillaren bei 2 kV
- 60 min Auftrennung der DNA bei 4,2 kV

Bei schlecht aufzutrennenden Sequenzierungsprodukten (GC-Reichtum, Sekundärstrukturen) wurden die Denaturierungszeit verlängert und/oder die Injektionszeit variiert.

#### **3.4.3.4 Sequenzanalyse**

Die Analyse der ermittelten Sequenzen erfolgte durch Abgleich mit den in der NCBI-Gendatenbank gespeicherten Wildtyp-Daten unter Zuhilfenahme des NCBI-BLAST-Programmes, des CEQsequence Investigators (BECKMAN COULTER) und von MEGA 3.1. Außerdem wurden die Sequenzierergebnisse der DCM-Patienten mit denen der gesunden Probanden verglichen.

#### **3.4.4 Mutationsanalyse in der CAR-Promotor-Region**

Zum Zeitpunkt dieser Arbeiten war der CAR-Promotor noch nicht identifiziert. Unter Zuhilfenahme des Promotor-Suchprogramms des NIH unter <http://bimas.dcrn.nih.gov/molbio/proscan> wurden die dem CAR-Gen vorgelagerte Region auf promotortypische Strukturen untersucht und Primer für die Amplifikation einer Sequenz ca. 50–600 bp stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes erstellt. Die weiteren Schritte zur Analyse der Basensequenz verliefen analog zu denen unter 3.4.3.

### **3.4.5 Untersuchungen zur Beeinflussung der CAR-Expression im Zellmodell**

Um Aussagen über die Steuerung der Expression des Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptors treffen zu können, wurde der Einfluss verschiedener Faktoren auf die Transkription des CAR-Gens und die Translation der gebildeten mRNA untersucht.

#### **3.4.5.1 Kultivierung der Zellen**

Die Zellen wurden, wie unter 3.2.2 beschrieben, ausgesät und je nach Fragestellung infiziert bzw. mit Zytokinen inkubiert (zur eingesetzten Zytokinkonzentration s. Tab. 4).

Um den Einfluss der Zelldichte auf die Rezeptorexpression zu bestimmen, wurden ca.  $8 \times 10^5$  Zellen (HeLa) in Petrischalen ausgesät, anschließend erfolgte aller 12 h eine Probennahme, bis die Zellen annähernd konfluent gewachsen waren.

Bei allen Experimenten wurden jeweils zwei Parallelansätze durchgeführt und pro Kulturschale immer zwei Proben genommen – je eine für RNA- und Proteinisolierung.

#### **3.4.5.2 RNA-Extraktion aus Zellkulturen**

Für die Isolierung der Gesamt-RNA wurden die bei der Ernte pelletierten Zellen mit Hilfe des RNeasy Mini Kits (QIAGEN) entsprechend den Herstellerangaben aufgearbeitet.

#### **3.4.5.3 Reverse Transkription der Gesamt-RNA**

Die Synthese von cDNA aus der isolierten Gesamt-RNA fand nach dem unter 2.4.2.2 angegebenen Protokoll statt.

#### **3.4.5.4 Real-time PCR**

Die unter 3.4.2.4 beschriebenen Bedingungen für die Amplifikation des murinen CAR wurden folgendermaßen angepasst:

Je Probe wurden

1 $\mu$ l	cDNA
10 $\mu$ l	2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix
6 $\mu$ l	DEPC-H <sub>2</sub> O

1,5 µl LC7-F-Primer (10 µM) und

1,5 µl LC7-R-Primer (10 µM)

gemischt und in PCR-Kapillaren überführt. Die anschließende PCR durchlief 30 Zyklen.

Für die Erstellung der Standardkurve wurden ein hCAR-Fragment in das Plasmid pcDNA3 kloniert, dieses wiederum linearisiert und in einer Verdünnungsreihe von  $10^1$ – $10^8$  Kopien/µl amplifiziert. Auch dieses Konstrukt diente außerdem der internen Kontrolle jedes Laufs.

#### **3.4.5.5 Proteinisolierung**

Zur Gewinnung von Proteinextrakten wurden die geernteten und zentrifugierten Zellen in einer von der Größe des Zellpellets abhängigen Menge NTE-Puffer resuspendiert. Durch die Zugabe von 0,5 % NP-40 und anschließendes Vortexen für 30 s erfolgte die Lyse der Zellen. Nach einer 20-minütigen Zentrifugation bei 14000 rpm und 4 °C wurde der proteinhaltige Überstand bis zur Verwendung bei -80 °C aufbewahrt.

- NTE-Puffer: 10 mM Tris/HCl, pH 7,4; 100 mM NaCl
- NP-40 (**N**onionic detergent-**P40** [SIGMA]): 10%ige Stammlösung

#### **3.4.5.6 Konzentrationsbestimmung**

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Methode von Bradford [18] unter Verwendung des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G250 (BIO-RAD). Je 100 µl der (1:200 – 1:1500) verdünnten Proben wurden in einer 96-well-Platte in Parallelansätzen mit 100 µl des Farbstoffs versetzt und die OD<sub>570</sub> mit Hilfe des Microplate Reader Dynatech MR5000 gemessen. Zur Ermittlung der Proteinkonzentration diente eine Eichgerade, die in Parallelansätzen mit 2,5; 5; 7,5; 10; 12,5 und 15 µg/ml BSA (**b**ovine **s**erum **a**lbumin) erstellt wurde.

- Farbstoff: BIO-RAD-Farbstoffkonzentrat, mit Aqua dest. 1:5 verdünnt und filtriert
- BSA: Stammlösung von 1,4 mg/ml, verdünnt mit Aqua dest., Lagerung der Aliquots bei -20 °C

### 3.4.5.7 SDS-Page

Um die Proteine entsprechend ihren molaren Massen auftrennen zu können, wurden aus zwei Teilen – dem Sammelgel und dem Trenngel – bestehende SDS-Gele unter Zuhilfenahme einer Mini-PROTEAN-Gelapparatur (BIO-RAD) gegossen. Da das zu detektierende CAR-Protein eine Größe von 46 kDa aufweist, wurden 10%ige Trenngele hergestellt. Die jeweils eingesetzten Chemikalienmengen sind in Tabelle 5 aufgeführt.

**Tab. 5: Zusammensetzung der SDS-Gele**

Komponente	Sammelgel (5 %)	Trenngel (10 %)
Acrylamid (30 %)	0,27 ml	1,6 ml
Aqua dest.	0,93 ml	2,0 ml
4x running buffer		1,2 ml
4x stacking buffer	0,40 ml	
APS (10 %)	20 µl	22,0 µl
TEMED	2 µl	5,0 µl

Durch die Zugabe des Probenpuffers und 5-minütiges Erhitzen auf 95 °C erfolgte die Denaturierung der Proben. Daran schlossen sich das Auftragen von 50 µg Gesamtprotein je Probe auf das SDS-Gel und die elektrophoretische Auftrennung bei 80–120 V an. Als Größenstandard kam der PageRuler-Marker zum Einsatz.

- Acrylamidlösung: 30 % Acrylamid; 0,8 % N,N'-Methylenbisacrylamid
- running buffer: 1,5 M Tris/HCl pH 8,8; 0,4 % SDS
- stacking buffer: 0,5 M Tris/HCl pH 6,8; 0,4 % SDS
- Probenpuffer (2x): 100 mM Tris/HCl pH 6,0; 4 % SDS; 10 % β-Mercaptoethanol; 20 % Glycerol; 0,1 % Bromphenolblau
- Elektrophoresepuffer (10x): 250 mM Tris/HCl pH 8,3; 1,92 M Glycin; 1 % SDS

### 3.4.5.8 Western Blot

Um Proteine spezifisch mittels Western Blot nachweisen zu können, mussten diese nach der elektrophoretischen Auftrennung im SDS-Gel auf eine Nitrozellulose-Membran (PROTRAN, Porengröße 0,45 µm [SCHLEICHER & SCHUELL]) übertragen werden. Dies geschah unter Kühlung bei einer konstanten Spannung von 12 V über Nacht. Um freie Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren, wurde diese anschließend für eine Stunde in TBST-Puffer mit 3 % Magermilch (MM) inkubiert. Es folgten die Bindung des primären Antikörpers (Verdünnung s. Tab. 6) in TBST-Puffer mit 1 % MM über 1–1,5 h bei RT und ein dreimaliges Waschen für je 10 min mit TBST. Daran schloss sich eine einstündige Inkubation mit dem sekundären, Alkalische Phosphatase-gekoppelten Antikörper in TBST-Puffer mit 1 % Magermilch an. Die Membran wurde erneut dreimal für je 10 min in TBST gewaschen und dann bis zur gewünschten Stärke der Farbreaktion (im Allgemeinen 5–15 min) in der Färbelösung unter Lichtausschluss inkubiert. Das Spülen des Blots mit Wasser stoppte die Reaktion. Nach dem Trocknen auf Filterpapier konnten die auf der Membran sichtbar gewordenen Banden ausgewertet werden.

- TBST-Puffer: 10 mM Tris/HCl pH 8,0; 150 mM NaCl; 0,05 % Tween 20
- Färbelösung für 2 Blots: 1 Tablette NBT/BCIP ready-to-use (ROCHE), aufgelöst in 15 ml Aqua dest.

**Tab. 6: verwendete Antikörper**

<b>primäre Antikörper:</b>		
CAR (H300)	rabbit-anti-human; polyklonales IgG, 200 µg/ml, 1:300	Santa Cruz Biotechnology
β-Aktin *	rabbit-anti-β-actin (hu, mu, rat, mk); monoklonales IgG, 1:200	Cell Signaling
anti-VP2	rabbit-anti-CVB3; ungereinigtes Antiserum, 1:100	Dr. A. Härtl, Hans-Knöll-Institut Jena

\* Das aufgeführte anti-β-Aktin-IgG diente – neben der Proteinbestimmung am Photometer – der Kontrolle eines für alle Proben äquivalenten Proteinauftrags auf das SDS-PAA-Gel. Hierzu wurden zusätzliche Gele mit korrespondierenden Probenmengen beladen und anschließend geblottet. Bei der Entwicklung der Blotmembran kam der genannte Antikörper zum Einsatz – die sichtbar werdenden spezifischen Banden sollten für alle Proben gleich stark sein.

**Tab. 6: verwendete Antikörper (Fortsetzung)**

<b>sekundäre Antikörper:</b>		
swine- $\alpha$ -rabbit-AP	swine-anti-rabbit; AP-gekoppelt, polyklonales IgG, 360 $\mu$ g/ml, 1:500	DakoCytomation
goat- $\alpha$ -rabbit-AP	goat-anti-rabbit; AP-gekoppelt, polyklonales IgG, 1 mg/ml, 1:500	Acris Antibodies

### 3.5 *Histologische Methoden*

Um die Stärke der Expression und die Verteilung des humanen CAR im Herzen zu ermitteln, wurden Aceton-fixierte Schnitte von kryokonserviertem Myokard immunhistochemisch farbmarkiert. Als Referenz für die Herzmuskelproben von DCM-Patienten diente linksventrikuläres Gewebe von Organspendern.

Es wurden 5- $\mu$ m-Kryostatschnitte angefertigt, auf poly-L-Lysin-beschichtete Objektträger aufgebracht und für 1,5 h bei RT getrocknet. Bis zur Weiterverwendung erfolgte die Lagerung der mit Parafilm abgedeckten Schnitte bei -80 °C.

An eine Trocknung für 1,5 h bei RT schlossen sich eine 10-minütige Fixierung mit 100%igem Aceton und ein weiterer Trocknungsschritt (30 min, RT) an. Danach wurden die Schnitte 5 min in PBS gewaschen und zur Blockierung der endogenen Peroxidase weitere 5 min mit der DAKO Peroxidase Block-Lösung [DAKO CYTOMATION] inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS folgte die Bindung des primären Antikörpers (rabbit-anti-human-CAR, s. Tab. 6) in einer feuchten Kammer über 1–1,5 h bei RT und ein erneutes dreimaliges Waschen mit PBS. Es schlossen sich eine 1,5-stündige Inkubation mit dem Sekundär-Antikörper (goat-anti-rabbit-IgG+HRP; EnVision Kit [DAKO CYTOMATION]) in einer feuchten Kammer und ein weiterer Waschschrift mit PBS an. Die Schnitte wurden dann für 5–30 min in einer 3-Amino-9-Ethylcarbazol-Lösung (AEC<sup>+</sup>, EnVision Kit) gefärbt, was zur Bildung eines rötlichen Präzipitats führte, und 2–3 min mit Aqua bidest. gewaschen. Nach der Gegenfärbung mit Hämatoxylin für 1,5 min, dreimaligem Waschen mit Aqua bidest. und 10-minütigem Bläuen

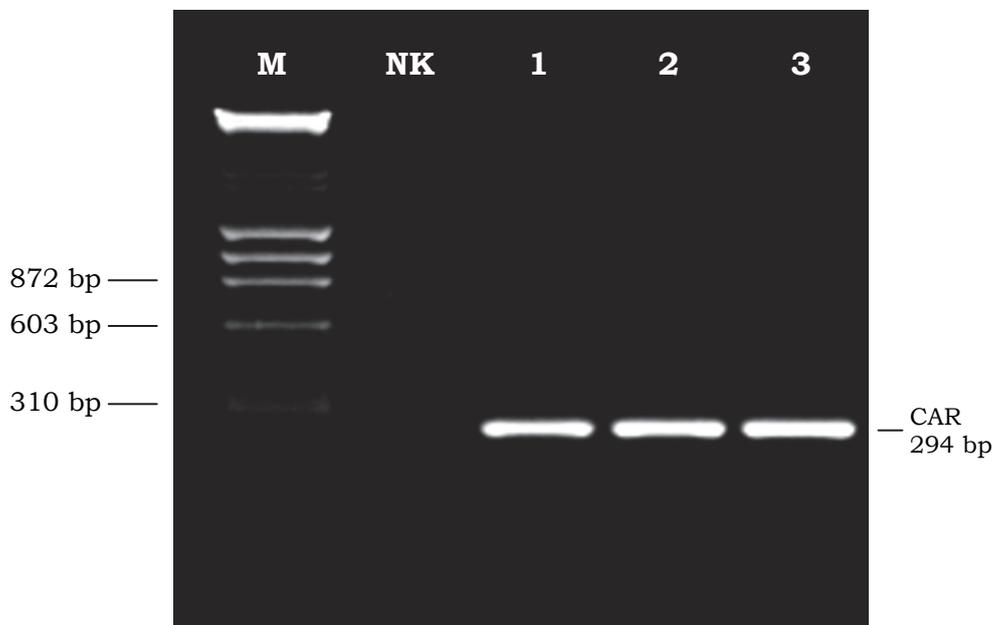
unter Verwendung von Leitungswasser konnten die Schnitte mit Gelatine abgedeckt und anschließend am Durchlichtmikroskop ausgewertet werden.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Qualitative und quantitative Untersuchungen auf mRNA-Ebene im humanen Myokard

#### 4.1.1 Qualitativer Nachweis der hCAR-Transkription

Zur Vorbereitung der nachfolgenden semiquantitativen Analyse wurde zunächst die Nachweisbarkeit der mRNA für den hCAR in menschlichem Myokardgewebe untersucht. Dafür erfolgten die Isolierung der Gesamt-RNA, die Umschreibung der mRNA in cDNA und deren Amplifikation in einer PCR mit CAR-spezifischen Primern (CAR1-F/R). Der Nachweis von hCAR gelang in allen untersuchten Proben.



**Abb. 12: Qualitativer Nachweis der CAR-mRNA-Expression in humanem Myokard mittels PCR am Beispiel von drei DCM-Proben**

Aus linksventrikulärem Myokardgewebe von DCM-Patienten durch Reverse Transkription gewonnene cDNA wurde mit CAR-spezifischen Primern (CAR1-F/R) amplifiziert.

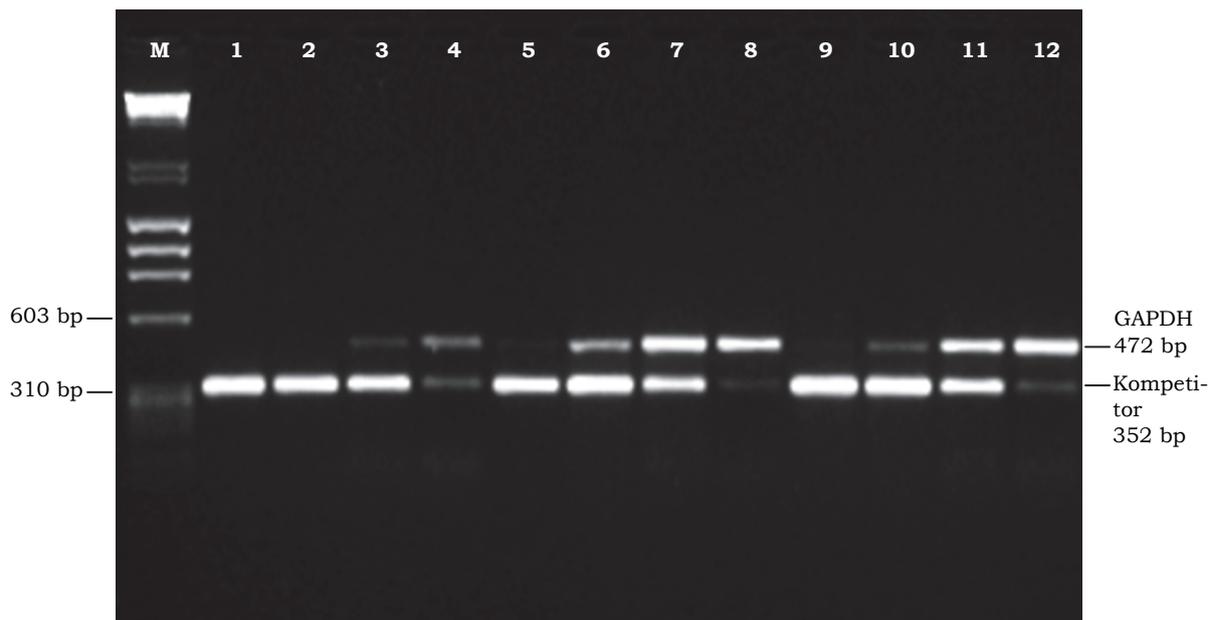
M = DNA-Größenstandard ( $\lambda$ DNA *Hind*III +  $\phi$ X174DNA *Hae*III);

NK = Negativkontrolle (Ansatz ohne Zugabe von cDNA); 1-3 = Patienten 1-3 (1,5%iges Agarosegel)

#### 4.1.2 Equilibrierung der cDNA-Proben aus Myokardgewebe

Um die hCAR-mRNA-Expression im Herzen zwischen DCM-Patienten und gesunden Probanden vergleichen zu können, wurde zunächst die cDNA-Konzentration der Proben unter Zuhilfenahme des Kontrollgens GAPDH normalisiert. Je 2  $\mu$ g isolierter Gesamt-RNA aus humanem Myokardgewebe –

im Einzelnen handelte es sich um 8 DCM- sowie 4 Kontrollproben – wurden zur Synthese von komplementärer DNA eingesetzt. Durch die Amplifizierung von GAPDH in Gegenwart eines Kompetitorfragments bekannter Konzentration konnte die GAPDH-Konzentration bestimmt werden. Die Analyse erfolgte über die elektrophoretische Auftrennung von Kompetitorkonzentrationsreihen und die Quantifizierung der Banden mit Hilfe des ScanPack II-Programms (BIOMETRA). Anhand der ermittelten Werte wurden die einzelnen Proben auf eine gleiche cDNA-Ausgangskonzentration relativ zum Kompetitorfragment eingestellt, so dass für die folgenden Untersuchungen von einem annähernd gleichwertigen Transkriptionsstatus ausgegangen werden konnte. Abbildung 13 zeigt an drei Beispielen den Anstieg der GAPDH-Konzentration bei simultan abnehmender Konzentration des Kompetitors.



**Abb. 13: Kompetitive PCR von cDNA aus Myokardgewebe am Beispiel von drei DCM-Proben**

Aus linksventrikulärem Myokardgewebe von DCM-Patienten durch Reverse Transkription gewonnene cDNA wurde mit GAPDH/Kompetitor-spezifischen Primern amplifiziert.

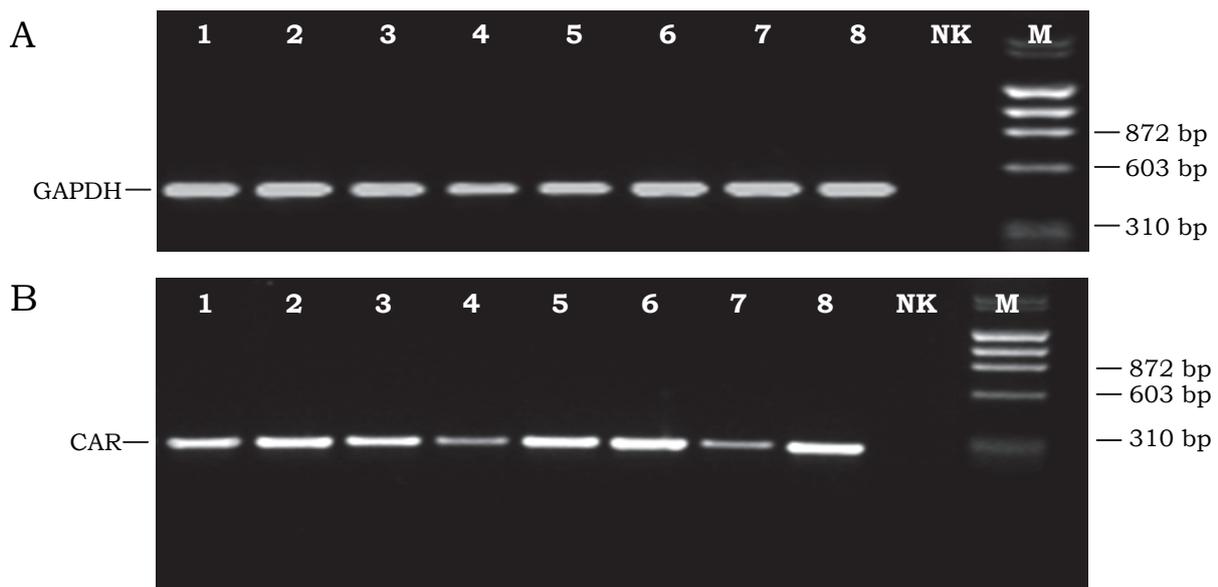
M = DNA-Größenstandard ( $\lambda$ DNA *Hind*III +  $\phi$ X174DNA *Hae*III);

1-4 = cDNA-Probe 1; 5-8 = cDNA-Probe 2; 9-12 = cDNA-Probe 3

(1,5%iges Agarosegel)

### 4.1.3 Quantifizierung der cDNA-Proben durch semiquantitative RT-PCR

Die durch die Verwendung des Kompetitorfragments equilibrierten cDNAs der 8 DCM- sowie 4 Kontroll-Proben wurden mittels semiquantitativer RT-PCR auf den Expressionsstatus des CAR-Gens hin untersucht. Die Amplifizierung des GAPDH-Gens, welche unter gleichen PCR-Bedingungen stattfand und noch in der exponentiellen Phase abgebrochen wurde, diente dabei zur Überprüfung der durch die kompetitive PCR erfolgten Normalisierung aller Proben (Abb. 14 und 15). Die genaue quantitative Auswertung erfolgte wiederum unter Zuhilfenahme des ScanPack II-Programms, wobei die im Agarosegel ermittelten densitometrischen Werte der CAR-Banden ins Verhältnis zu denen der GAPDH-Banden gesetzt wurden.



**Abb. 14: Semiquantitative RT-PCR der DCM-Proben**

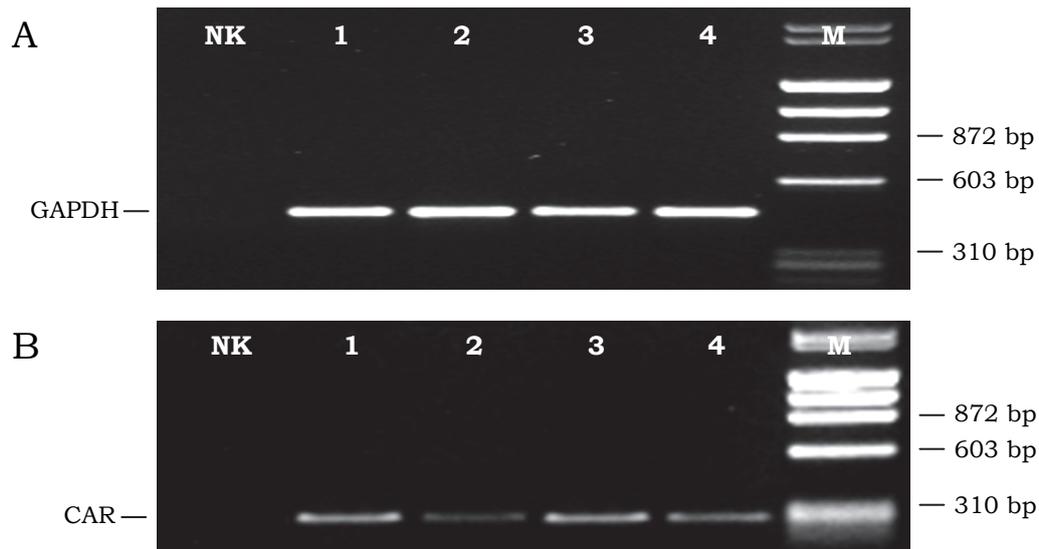
Aus linksventrikulärem Myokardgewebe von DCM-Patienten durch Reverse Transkription gewonnene cDNA wurde mit GAPDH- bzw. CAR-spezifischen Primern amplifiziert.

M = DNA-Größenstandard ( $\lambda$ DNA *Hind*III +  $\phi$ X174DNA *Hae*III);

NK = Negativkontrolle (Ansatz ohne Zugabe von cDNA); 1-8 = cDNA aus dem Myokardgewebe der DCM-Patienten 1-8

*Bild A:* PCR mit GAPDH-spezifischen Primern; *Bild B:* PCR mit CAR-spezifischen Primern

(jeweils 1,5%iges Agarosegel)



**Abb. 15: Semiquantitative RT-PCR der Kontroll-Proben**

Aus linksventrikulärem Myokardgewebe von gesunden Probanden durch Reverse Transkription gewonnene cDNA wurde mit GAPDH- bzw. CAR-spezifischen Primern amplifiziert.

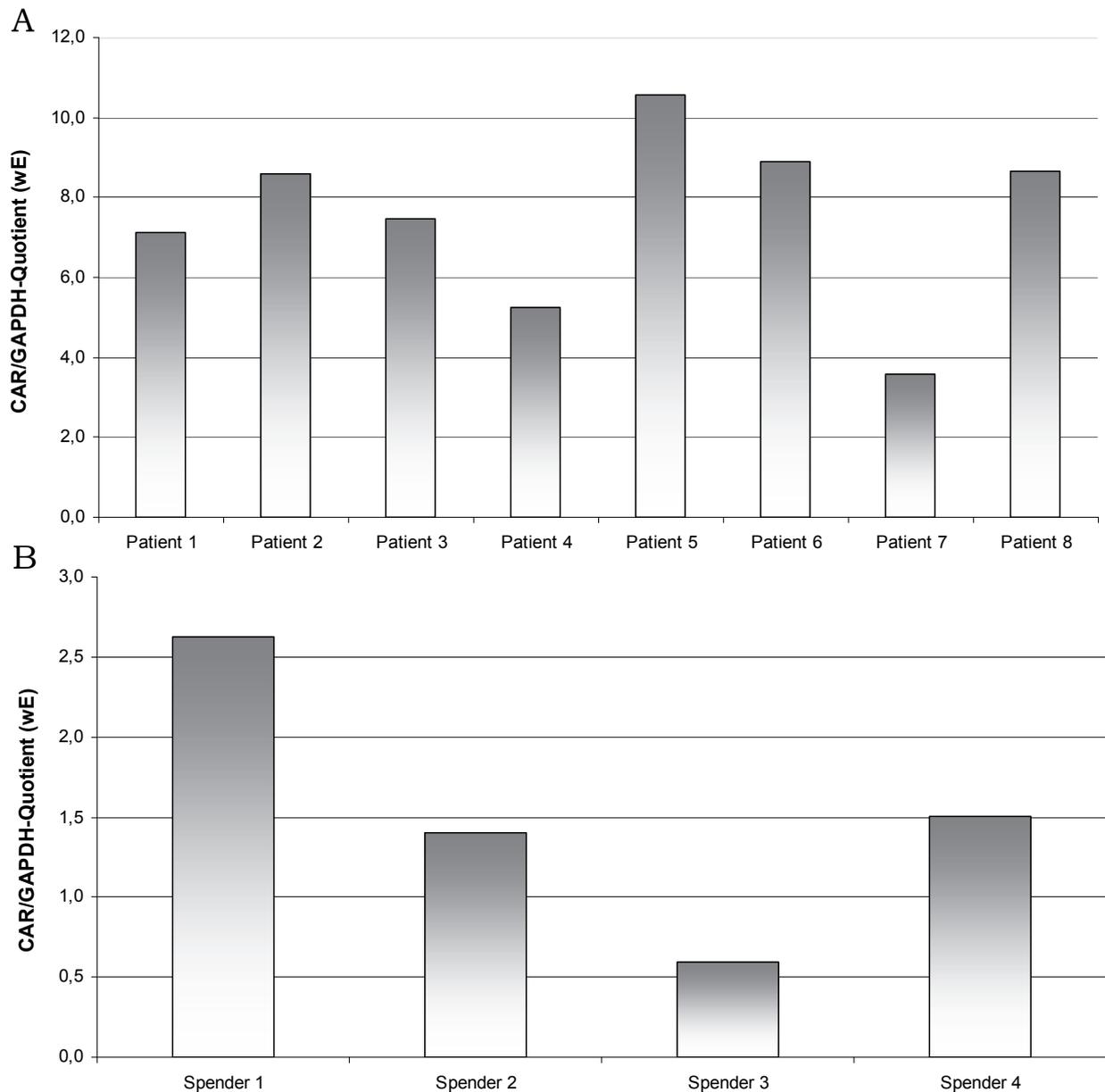
M = DNA-Größenstandard ( $\lambda$ DNA *Hind*III +  $\phi$ X174DNA *Hae*III);

NK = Negativkontrolle (Ansatz ohne Zugabe von cDNA); 1-4 = cDNA aus dem Myokardgewebe der gesunden Probanden 1-4

*Bild A:* PCR mit GAPDH-spezifischen Primern; *Bild B:* PCR mit CAR-spezifischen Primern

(jeweils 1,5%iges Agarosegel)

Das Transkriptionsniveau des CAR-Gens wies zwischen DCM-Patienten und gesunden Kontrollen einen signifikanten Unterschied auf. In Abbildung 16 ist das Verhältnis zwischen CAR- und GAPDH-Werten dargestellt. Dieser Quotient war bei Patienten mit DCM ( $7,5 \pm 2,2$ ) im Vergleich zu den Kontrollen mit normaler Herzfunktion ( $1,5 \pm 0,8$ ) deutlich erhöht. Die CAR-mRNA-Konzentration in den untersuchten DCM-Geweben lag somit im Mittel um den Faktor 4,9 über der in den Kontrollgeweben. Abbildung 17 fasst diese Ergebnisse zusammen.

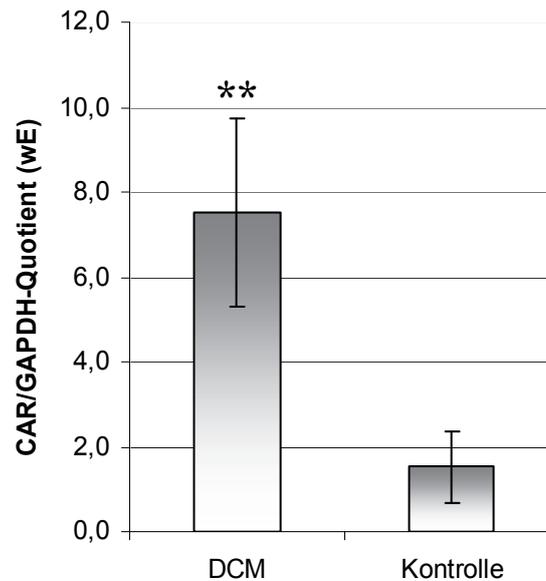


**Abb. 16: Vergleich der CAR/GAPDH-Quotienten in Myokardgewebeproben**

Aus linksventrikulärem Myokardgewebe von DCM-Patienten und gesunden Probanden durch Reverse Transkription gewonnene cDNA wurde mit GAPDH- bzw. CAR-spezifischen Primern amplifiziert. Anschließend erfolgte in einem Agarosegel die videodensitometrische Analyse der CAR-Banden im Verhältnis zu den GAPDH-Banden.

*Diagramm A:* DCM-Patienten 1-8

*Diagramm B:* gesunde Probanden 1-4



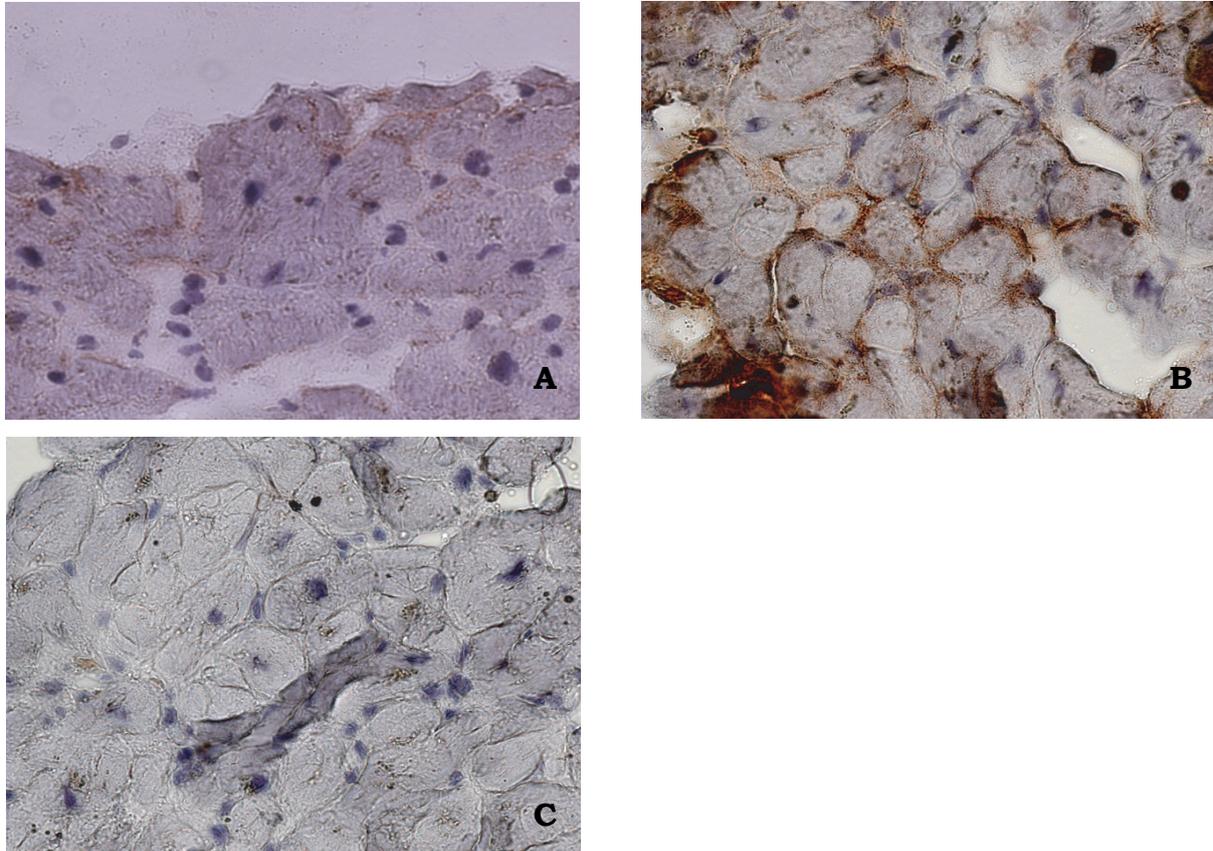
**Abb. 17: Zusammenfassung der durch semiquantitative PCR ermittelten Werte für die CAR-Expression in Myokardgewebe von DCM-Patienten und gesunden Probanden**

Aus linksventrikulärem Myokardgewebe von DCM-Patienten (n=8) und gesunden Probanden (n=4) durch Reverse Transkription gewonnene cDNA wurde mit GAPDH- bzw. CAR-spezifischen Primern amplifiziert. Das videodensitometrisch ermittelte CAR/GAPDH-Verhältnis repräsentiert den Status der CAR-mRNA-Expression im linksventrikulären Myokard. Dargestellt sind der Mittelwert aller individuellen Proben (s. Abb. 16) der jeweiligen Gruppe und die Standardabweichung. (\*\*:  $P < 0,01$  im Vergleich zur Kontrolle im Student'schen t-Test)

#### 4.1.4 Darstellung der CAR-Expression im humanen Myokard durch Immunhistochemie

Um die Expression des Rezeptors nicht nur auf RNA-, sondern auch auf Proteinebene untersuchen zu können, wurden Gewebeproben von DCM-Patienten und Myokard von Organspendern unter Verwendung eines CAR-spezifischen Antikörpers immunhistologisch untersucht. Zum Ausschluss einer unspezifischen Reaktion durch den Zweitantikörper erfolgte in einer mitgeführten Negativkontrolle die Substitution des Primärantikörpers durch Wasser. Die acetontfixierten Schnitte wurden durch die Reaktion der mit dem sekundären Antikörper über ein Polymer verknüpften Meerrettich-Peroxidase mit einem speziellen Substrat (3-Amino-9-Ethylcarbazol) gefärbt – an den Bindungsstellen des CAR-Antikörpers bildete sich ein rotbraunes Präzipitat. In Abbildung 18 sind exemplarisch eine DCM- und eine Kontrollprobe sowie eine Negativkontrolle dargestellt. Deutlich erkennbar existieren im Gewebe des DCM-Patienten wesentlich mehr Bindungsstellen (CAR) für den Primärantikörper als im Normalgewebe. Außerdem sind die

Zell-Zell-Kontaktareale als Hauptorte der Rezeptor-Expression hervorgehoben, die Zelloberflächen erscheinen ansonsten relativ CAR-frei. Die Negativkontrolle stellt sich ungefärbt dar, die Bindung des Sekundärantikörpers erfolgte also spezifisch.



**Abb. 18: Beispiel der immunhistochemischen Darstellung von CAR in Myokardgewebe**

Die Färbung (rotbraun) erfolgte unter Verwendung eines Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpers und des Chromogens 3-Amino-9-Ethylcarbazol. Die Zellkerne (blau) wurden mit Hämatoxylin gegengefärbt. (5- $\mu$ m-Kryostatschnitte, Durchlicht, 200-fache Vergrößerung)

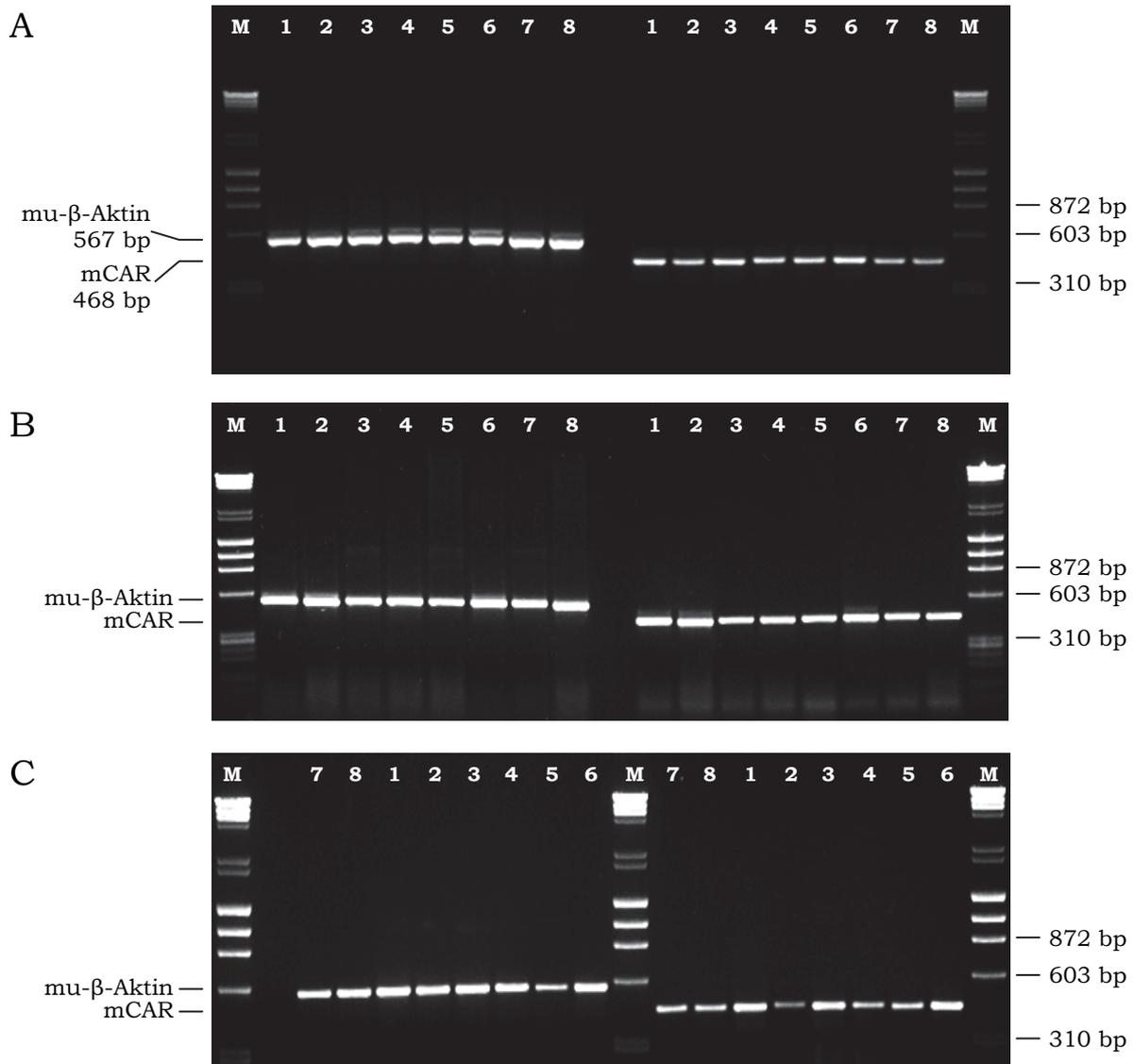
A = Kontrollgewebe; B = DCM-Gewebe; C = Negativkontrolle ohne CAR-Antikörper

## 4.2 **Quantitative Untersuchungen auf mRNA-Ebene im murinen Myokard**

### 4.2.1 **Quantifizierung der cDNA-Proben unter Zuhilfenahme des Haushaltsgens $\beta$ -Aktin**

Die aus Herz, Milz und Pankreas männlicher, CVB3-infizierter BALB/c-Mäuse (n=16) und nicht-infizierter Kontrolltiere (n=4) isolierte RNA wurde in cDNA umgeschrieben und anschließend unter Verwendung mCAR- bzw.  $\mu$ - $\beta$ -Aktin-spezifischer Primer amplifiziert. Es schloss sich die quantitative Auswertung unter Zuhilfenahme des ScanPack II-Programms an, wobei die im Agarosegel ermittelten densitometrischen Werte der CAR-Banden ins

Verhältnis zu denen der mu- $\beta$ -Aktin-Banden gesetzt wurden. Die Abbildung 19 zeigt am Beispiel sechs infizierter Mäuse und zweier Kontrollen die gemeinsam in einem Gel aufgetrennten PCR-Produkte für murines  $\beta$ -Aktin (links) und den murinen Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptor (rechts); dabei ist jedes der drei untersuchten Organe (Herz, Milz sowie Pankreas) durch ein Agarosegel-Foto repräsentiert.



**Abb. 19: Semiquantitative PCR von cDNA aus murinem Gewebe**

Aus verschiedenen Organen CVB3-infizierter BALB/c-Mäuse und nicht-infizierter Kontrolltiere durch Reverse Transkription gewonnene cDNA wurde mit mu- $\beta$ -Aktin- bzw. mCAR-spezifischen Primern amplifiziert.

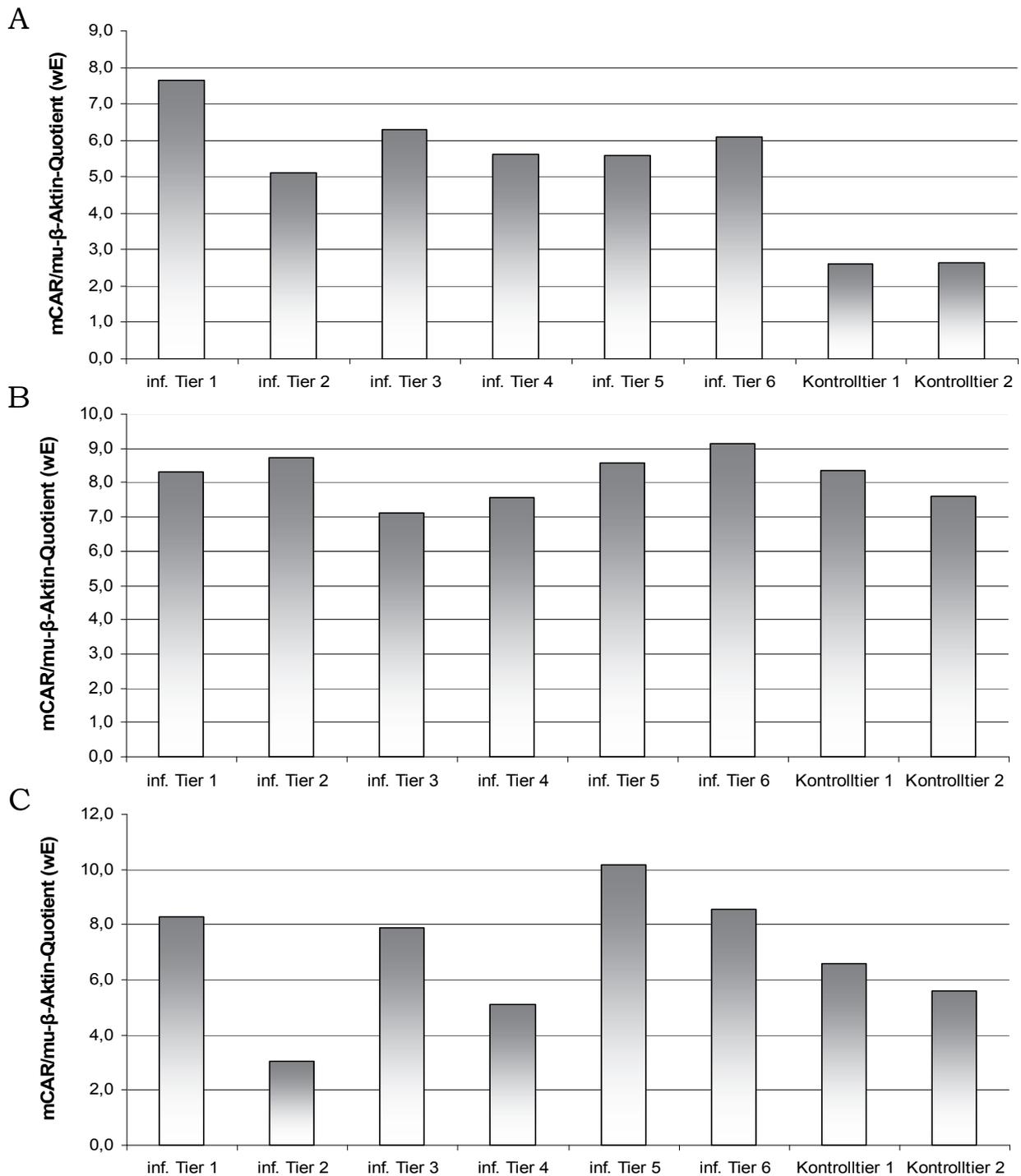
M = DNA-Größenstandard ( $\lambda$ DNA *Hind*III +  $\phi$ X174DNA *Hae*III);

1-6 = cDNA aus den Organen der infizierten Tiere 1-6; 7-8 = cDNA aus den Organen der Kontrollen 1 und 2

*Bild A:* murines Herzgewebe; *Bild B:* murines Milzgewebe; *Bild C:* murines Pankreasgewebe

(jeweils 1,5%iges Agarosegel)

In der Abbildung 20 sind die zugehörigen CAR/ $\beta$ -Aktin-Quotienten grafisch dargestellt.

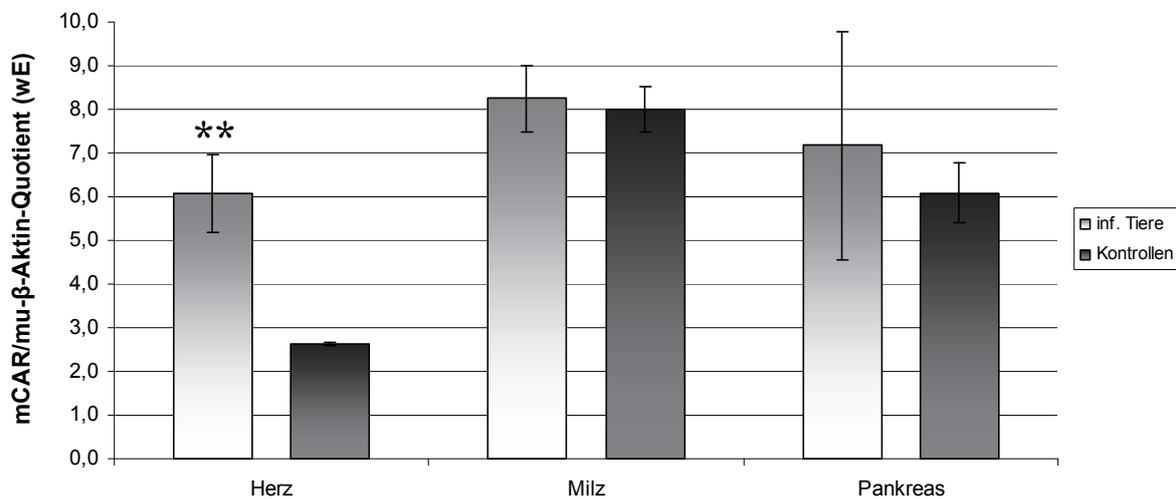


**Abb. 20: Vergleich der mCAR/mu- $\beta$ -Aktin-Quotienten in verschiedenen Organen infizierter und nicht-infizierter Mäuse**

Aus verschiedenen Organen CVB3-infizierter BALB/c-Mäuse und nicht-infizierter Kontrolltiere durch Reverse Transkription gewonnene cDNA wurde mit mu- $\beta$ -Aktin- bzw. mCAR-spezifischen Primern amplifiziert. Anschließend erfolgte in Agarosegelen die videodensitometrische Analyse der mCAR-Banden im Verhältnis zu den mu- $\beta$ -Aktin-Banden.

*Diagramm A:* Werte für murines Herzgewebe; *Diagramm B:* Werte für murines Milzgewebe; *Diagramm C:* Werte für murines Pankreasgewebe

Das Transkriptionsniveau des murinen CAR-Gens wies zwischen infizierten und nicht-infizierten Tieren in Abhängigkeit vom untersuchten Gewebe Unterschiede auf. So war die Expression von CAR im Herzen CVB3-infizierter Mäuse ( $6,1 \pm 0,9$ ) gegenüber der im Herzen von Kontrolltieren ( $2,6 \pm 0$ ) um den Faktor 2,3 (signifikant) erhöht. Weniger deutliche Abweichungen zwischen der dem Virus ausgesetzten Gruppe und der Kontrollgruppe ließen sich in Milz ( $8,2 \pm 0,8$  gegenüber  $8,0 \pm 0,5$ ) und Pankreas ( $7,2 \pm 2,6$  gegenüber  $6,1 \pm 0,7$ ) nachweisen. In der folgenden Abbildung (Abb. 21) sind die Ergebnisse für alle drei Organe zusammengefasst.



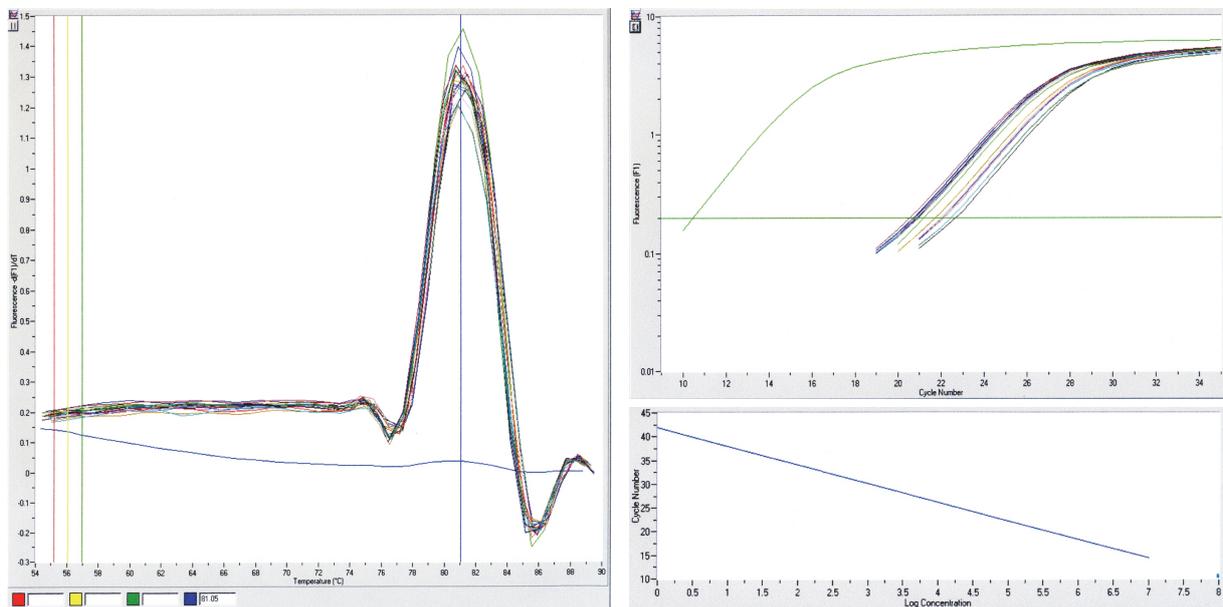
**Abb. 21: Zusammenfassung der durch semiquantitative PCR ermittelten Werte für die mCAR-Expression in verschiedenen Organen infizierter und nicht-infizierter Mäuse**

Aus verschiedenen Organen CVB3-infizierter BALB/c-Mäuse und nicht-infizierter Kontrolltiere durch Reverse Transkription gewonnene cDNA wurde mit mu- $\beta$ -Aktin- bzw. mCAR-spezifischen Primern amplifiziert. Das videodensitometrisch ermittelte mCAR/mu- $\beta$ -Aktin-Verhältnis repräsentiert den Status der mCAR-mRNA-Expression im angegebenen Organ. Dargestellt sind die Mittelwerte der zusammengehörigen individuellen Proben und die Standardabweichung. (\*\*:  $P < 0,01$  im Vergleich zur Kontrolle im Student'schen t-Test)

#### 4.2.2 Quantifizierung der cDNA-Proben mittels Real-time PCR

Zur Verifizierung der durch semiquantitative PCR für murines Herzgewebe ermittelten Unterschiede in der mCAR-Expression zwischen Coxsackievirus-infizierten und nicht-infizierten Tieren wurden männlichen BALB/c- und C57BL/6-Mäusen je 10000 pfu CVB3H3 i. p. gespritzt. Als Kontrollen dienten wiederum nicht-infizierte Tiere. Drei Tage p. i. wurden die Mäuse getötet, die Herzen entnommen und die daraus isolierte RNA in cDNA

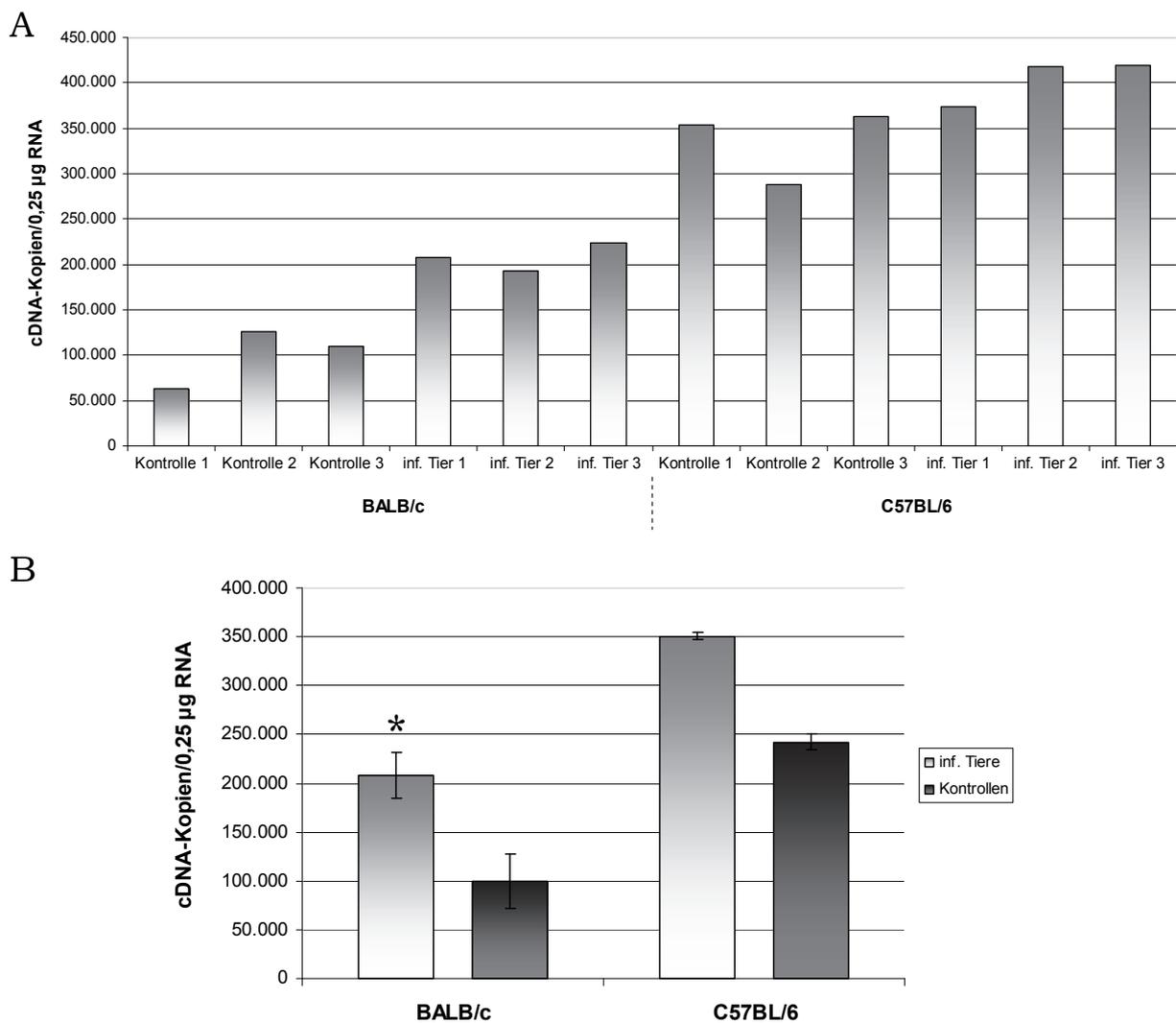
umgeschrieben. Es schloss sich die Amplifikation einer kurzen Sequenz (153 bp) des mCAR-Transkripts in einem Real-time PCR-Gerät der Firma Roche an; dieses Gerät ermöglicht es, die Expressionsrate eines untersuchten Gens aus nur wenigen Zyklen innerhalb der exponentiellen Phase der PCR zu ermitteln. Die Zunahme des PCR-Produkts konnte mit Hilfe des fluoreszierenden Farbstoffes SYBR Green I, welcher nach der Bindung an doppelsträngige DNA ein bis zu 1000-mal stärkeres Fluoreszenzsignal abgibt als ungebundener Farbstoff, verfolgt werden. Dabei wurde die Detektion unspezifischer PCR-Produkte durch die Wahl einer möglichst hohen Temperatur zum Zeitpunkt der Messung vermieden. Der Abgleich der so ermittelten Werte mit der etablierten Standardkurve eines linearisierten Plasmids ermöglichte die Quantifizierung der eingesetzten cDNA. Der internen Kontrolle diente das bei jedem Lauf in den Konzentrationen  $10^7$  und  $10^8$  Kopien/ $\mu\text{l}$  mitgeführte Standardplasmid (s. Abb. 22).



**Abb. 22: mCAR-Real-time PCR von cDNA aus murinem Herzgewebe**

Aus den Herzen CVB3-infizierter BALB/c- und C57BL/6-Mäuse und nicht-infizierter Kontrolltiere durch Reverse Transkription gewonnene cDNA wurde mit mCAR-spezifischen Primern (s. Tab. 3) im LightCycler amplifiziert. Die Abbildung zeigt Schmelzkurven (links), PCR-Verlaufskurven (rechts oben) und die Standardkurve (rechts unten) am Beispiel von 18 murinen Proben. Für die Standardkurve diente die Verdünnungsreihe ( $10^1$ - $10^8$  Kopien/ $\mu\text{l}$ ) eines in das Plasmid pcDNA3.1 klonierten mCAR-Fragments.

Um den Einfluss von Fehlern zu reduzieren, wurden die Gewebeproben von 24 verschiedenen Individuen (zwölf BALB/c- und zwölf C57BL/6-Mäuse) in die Untersuchung eingeschlossen und die Real-time PCRs mehrfach (n=4) wiederholt. Die parallele Amplifikation der Proben mit mu- $\beta$ -Aktin-Primern stellte eine Vergleichbarkeit der eingesetzten cDNA-Mengen sicher. Abbildung 23 zeigt beispielhaft die in einem PCR-Lauf ermittelte Anzahl der mCAR-cDNA-Kopien bei je sechs BALB/c- und C57BL/6-Mäusen.



**Abb. 23: mCAR-Echtzeit-PCR von cDNA aus murinem Herzgewebe**

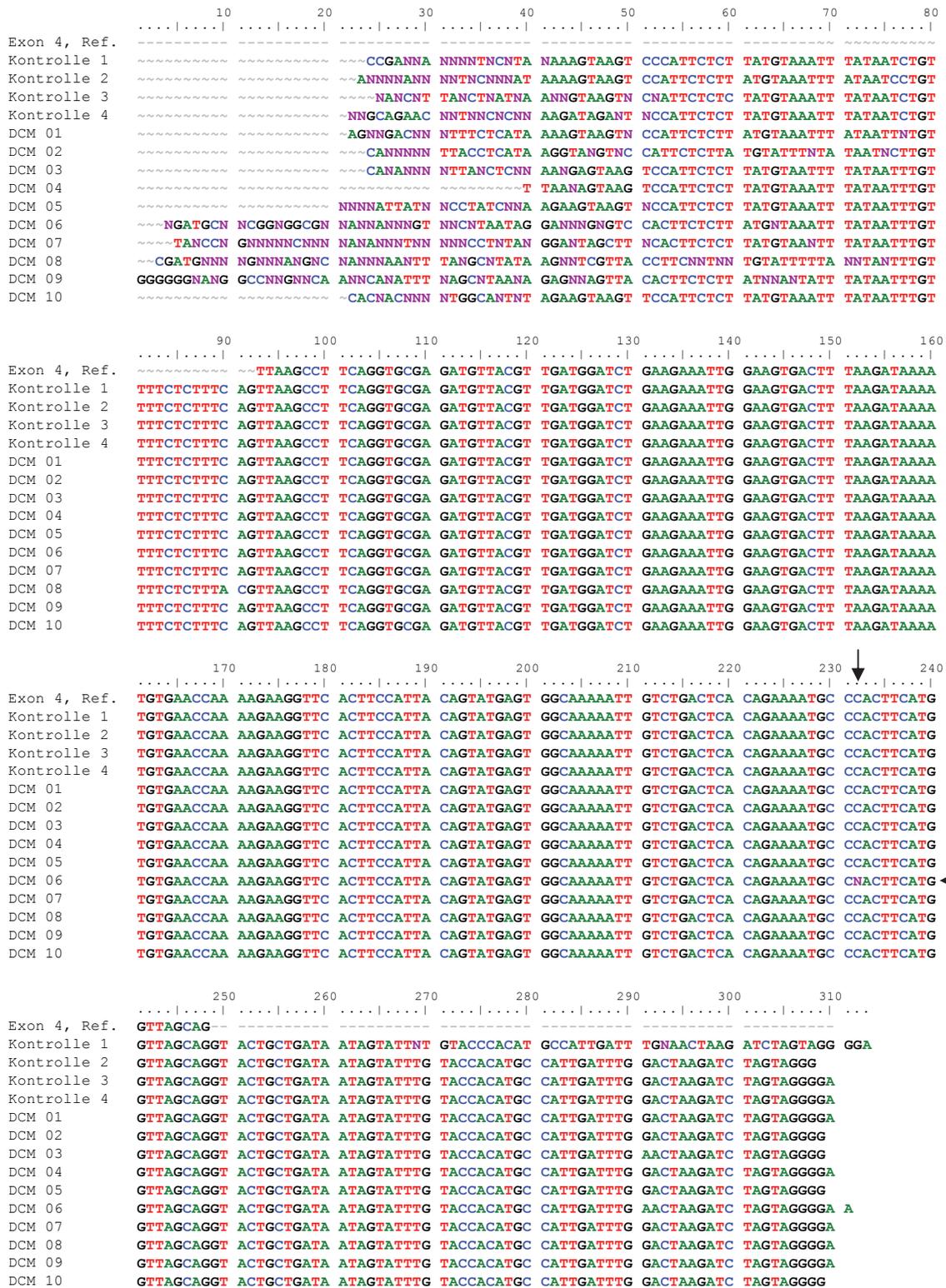
Aus den Herzen CVB3-infizierter BALB/c- und C57BL/6-Mäuse und nicht-infizierter Kontrolltiere durch Reverse Transkription gewonnene cDNA wurde mit mCAR-spezifischen Primern im Real-time PCR-Gerät amplifiziert.

*Diagramm A:* ermittelte cDNA-Kopienzahlen bei jeweils drei infizierten und drei nicht-infizierten Tieren beider Mausstämme; *Diagramm B:* Mittelwerte der cDNA-Kopienzahlen bei infizierten und nicht-infizierten Tieren aus allen PCR-Läufen, nach Mausstämmen getrennt, mit Standardabweichung (\*:  $P < 0,05$  im Vergleich zur Kontrolle im Student'schen t-Test)

Die aus den Werten sämtlicher Tiere (nach Stämmen getrennt) und aller PCR-Läufe gebildeten Mittelwerte sind in Diagramm B (Abb. 23) veranschaulicht. Es wird deutlich, dass der Einfluss einer CVB3-Infektion auf die CAR-Expression im Herzen von BALB/c- und C57BL/6-Mäusen unterschiedlich ist. So war das Transkriptionsniveau von mCAR im Herzen infizierter BALB/c-Mäuse gegenüber dem im Herzen von Kontrolltieren um den Faktor 2,1 signifikant erhöht – womit das durch semiquantitative PCR gewonnene Ergebnis (Faktor 2,3; Abb. 21) bestätigt werden konnte; bei C57BL/6-Mäusen betrug der Quotient infiziert : nicht-infiziert jedoch nur 1,2.

### **4.3 Mutationsanalyse im humanen CAR-Gen**

In den oben beschriebenen Untersuchungen wurde im Myokard von DCM-Patienten und bei Mäusen mit einem ähnlichen, CVB3-induzierten Krankheitsbild eine gesteigerte Expression von CAR nachgewiesen. Als Nächstes sollte der Frage nachgegangen werden, ob Mutationen im Rezeptorgen existieren, welche die Virusanfälligkeit von Patienten erhöhen (bspw. durch eine stärkere Erregerbindung) und somit einen prädisponierenden Faktor für eine viral induzierte DCM darstellen könnten. Auch die direkte Beeinflussung der Genexpression (z. B. durch Mutationen im Promotorbereich) war nicht von vornherein auszuschließen. Für die Suche nach Mutationen im Gen des humanen Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptors wurde die aus den Leukozyten des peripheren Blutes isolierte DNA von 30 Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie sowie von vier Kontrollpersonen mit Hilfe eines Kapillarsequenzierers analysiert. Durch eine entsprechende Auswahl der Primer konnten dabei neben den sieben Exons auch die Exon-Intron-Grenzen, die für das korrekte Spleißen der mRNA von Bedeutung sind, untersucht werden. Um methodische Artefakte auszuschließen, wurden alle analysierten Bereiche in beiden Richtungen und mehrfach sequenziert. Zum Sequenzvergleich, der mit Hilfe des BioEdit Alignment Editors erfolgte (s. Abb. 24), dienten neben den internen Kontrollen folgende Referenzen der NCBI-Datenbank: gi:45827793 (Exons 1-7), gi:9858566 (gesamtes CAR-Gen) sowie gi:157697894 (Chromosom 21, Alternativ-Sequenz, HuRef-basiert).



**Abb. 24: Sequenzabgleich zwischen Referenz, Kontrollen und zehn DCM-Proben mit dem Alignment Editor am Beispiel von Exon 4**

Die durch Sequenzierung ermittelten Basenfolgen der vier Kontroll- und von zehn DCM-Proben wurden im Alignment Editor mit der Referenzsequenz für das Exon 4 zur Deckung gebracht. Auf diese Weise ist die heterozygote Basensubstitution in der DCM-Probe 6 (Zeile und Spalte durch Pfeile markiert) leicht zu erkennen. Die beiden Nukleotidaustausche an der Intron-Exon-Grenze der DCM-Probe 8 (C→A und A→C) konnten durch die Gegenstrangsequenzierung als Lesefehler identifiziert werden.

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über Lage und Art der identifizierten Genotypveränderungen.

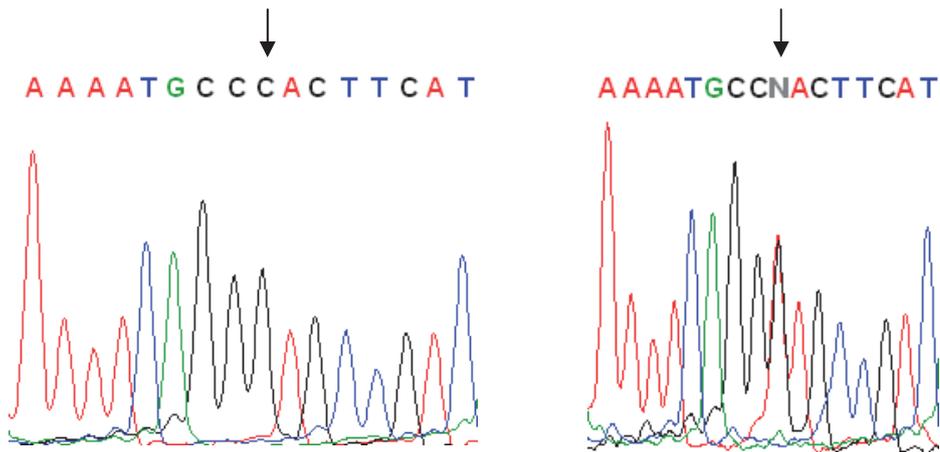
**Tab. 7: Zusammenfassung der gefundenen Genotypveränderungen**

sequenzierte Region	Genotypveränderungen
Promotorregion	k. V.
Exon 1	k. V.
Exon 2	k. V.
Exon 3	k. V.
Exon 4	C555A, heterozygot
Exon 5	k. V.
Exon 6	k. V.
Exon 7	A837G, A846G

Die Angaben zu den Genotypveränderungen stellen die Substitution des ursprünglichen Nukleotids (Wildtyp, li) durch ein neues Nukleotid (Mutation, re) dar; die eingeschlossene Zahl bezeichnet die Stelle in der Nukleotidsequenz der mRNA (ab Startkodon stromabwärts gelesen), an welcher die Sequenzveränderung zu finden ist. k. V. = keine Veränderung, d. h., in diesen Regionen wurden keine Abweichungen von der Datenbank-Sequenz nachgewiesen.

Im Exon 4 fand sich in zwei von 30 DCM-Proben eine C→A-Substitution (C555A), welche keinen Aminosäureaustausch bewirkt (Pro→Pro; stille Mutation). Da sich sowohl Wildtyp als auch Mutation gleichzeitig nachweisen ließen (s. Abb. 25), müssen die Träger für dieses Merkmal heterozygot sein.

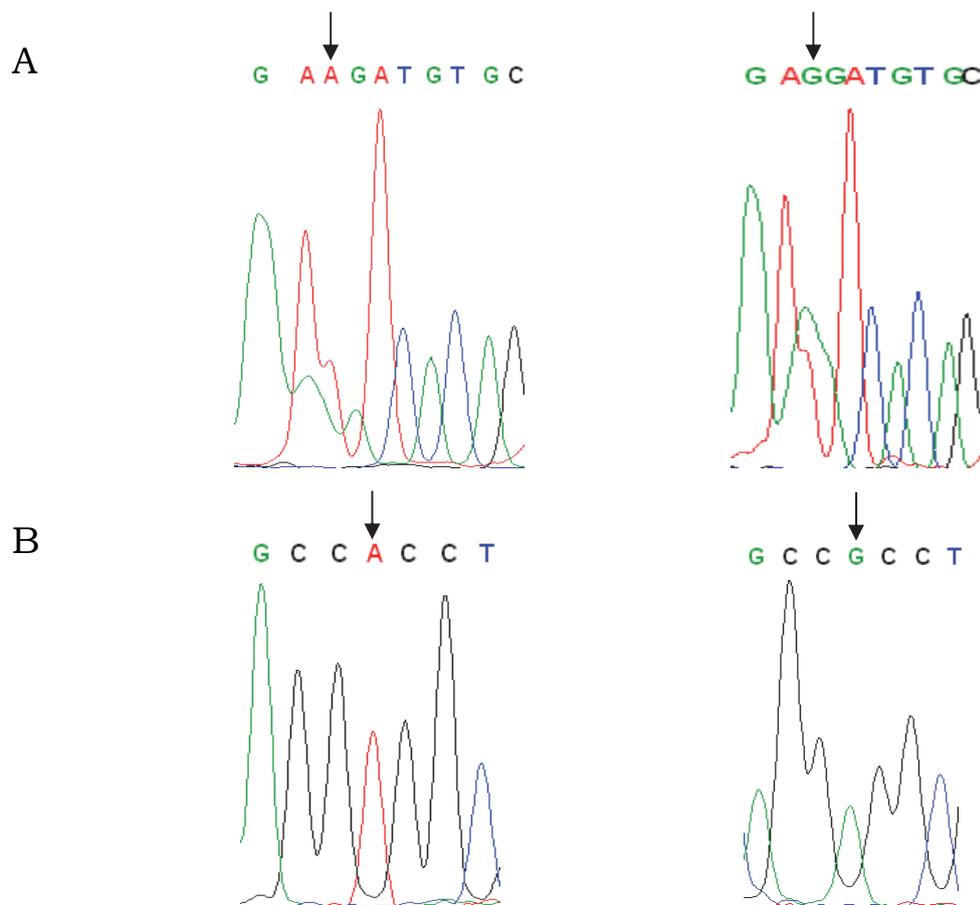
Im Exon 7 traten an zwei Loci Basensubstitutionen auf. Der Austausch A837G (s. Abb. 26 A) war bei drei DCM-Patienten und einer Kontrollprobe zu beobachten, es handelt sich um eine stille Mutation (Glu→Glu). Auch die A→G-Substitution an Position 846 (Abb. 26 B), welche sich bei einem DCM-Patienten nachweisen ließ, führt nicht zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz (Pro→Pro).



**Abb. 25: Sequenzausschnitt mit Basenveränderung im Exon 4**

Durch Sequenzierung mit dem Kapillarsequenzierer CEQ 8000 nachgewiesene C→A-Substitution an Position 555 (Pfeile) der codierenden Sequenz des CAR-Gens (Exon 4)

*links: Wildtyp; rechts: Mutation, heterozygot*



**Abb. 26: Sequenzausschnitte mit Basenveränderungen im Exon 7**

Durch Sequenzierung mit dem Kapillarsequenzierer CEQ 8000 nachgewiesene A→G-Substitutionen (Pfeile) in der codierenden Sequenz des CAR-Gens (Exon 7)

*Bild A: A837G; Bild B: A846G; jeweils links Wildtyp und rechts Mutation*

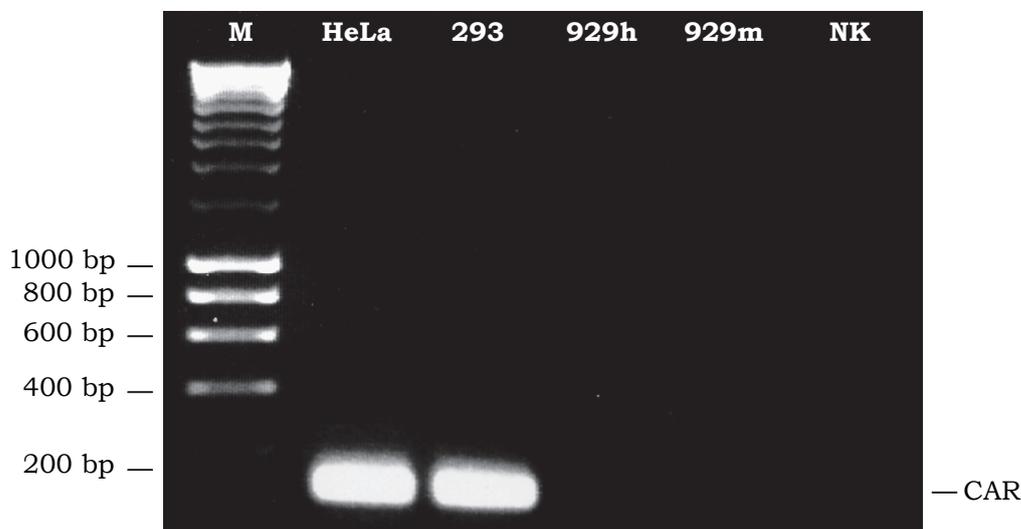
Die Basenfolgen in unmittelbarer Nähe der Intron-Exon-Grenzen entsprachen den in der NCBI-Datenbank gespeicherten Sequenzen (s. Abb. 24).

In der potentiellen Promotorregion – entsprechende Strukturen waren zum Zeitpunkt dieser Arbeiten noch nicht identifiziert bzw. beschrieben – wurden keine Veränderungen der Nukleotidfolge gefunden.

#### **4.4 Untersuchungen im Zellmodell zur Beeinflussung der Expression des humanen CAR**

##### **4.4.1 Qualitativer Nachweis der CAR-Transkription in den verwendeten Zelllinien**

Für die Experimente zum Einfluss verschiedener Faktoren auf die CAR-Expression wurden die humanen Zelllinien HeLa und 293 eingesetzt. Murine L929-Zellen dienten bei Bedarf als Negativkontrolle. Durch eine mit CAR-spezifischen Primern durchgeführte PCR von aus den Zellen mit Hilfe Reverser Transkription gewonnener cDNA erfolgte die Eignungsprüfung der gewählten Zelltypen.



**Abb. 27: Qualitativer Nachweis der CAR-mRNA-Expression in drei verschiedenen Zelllinien mittels PCR**

Aus HeLa-, 293- und L929-Zellen durch Reverse Transkription gewonnene cDNA wurde mit CAR-spezifischen Primern (LC7-F / R bzw. mCAR LC-F / R ) amplifiziert. M = DNA-Größenstandard (HyperLadder I);

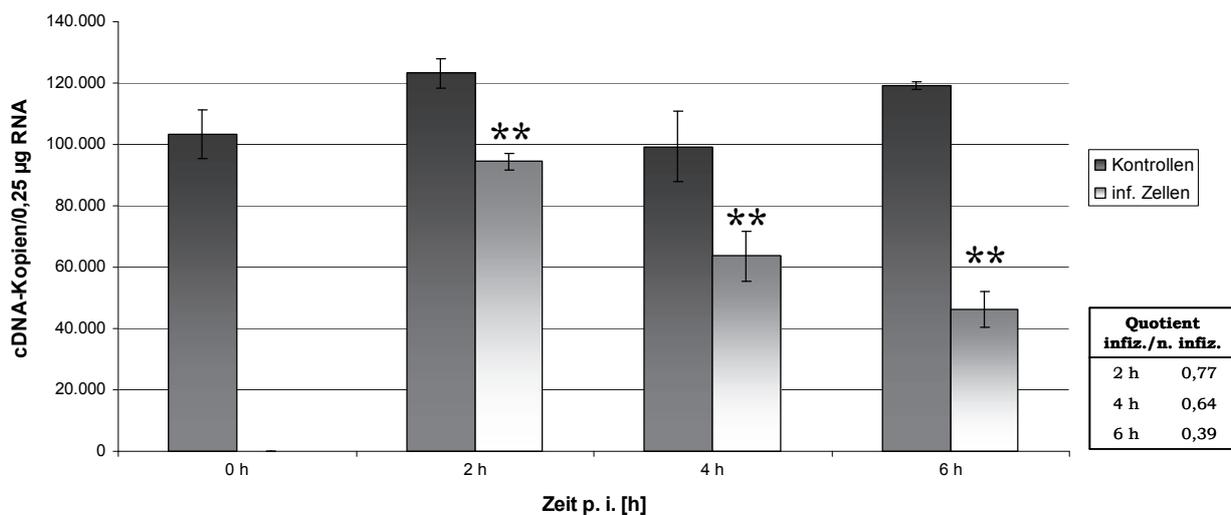
NK = Negativkontrolle (Ansatz ohne Zugabe von cDNA); HeLa, 293 = cDNA aus HeLa- und 293-Zellen, amplifiziert mit LC7-F / R; 929h = cDNA aus L929-Zellen, amplifiziert mit LC7-F / R; 929m = cDNA aus L929-Zellen, amplifiziert mit mCAR LC-F / R

(1,5%iges Agarosegel)

Die Transkription des Virusrezeptor-Gens konnte sowohl in HeLa- als auch in 293-Zellen nachgewiesen werden (s. Abb. 27). Dagegen war die Bestätigung einer CAR-Expression in L929-Zellen weder mit humanen noch mit murinen Primern möglich, diese Zelllinie eignete sich somit als Negativkontrolle für die sich anschließenden Experimente.

#### 4.4.2 Untersuchungen zum Einfluss der Virusinfektion

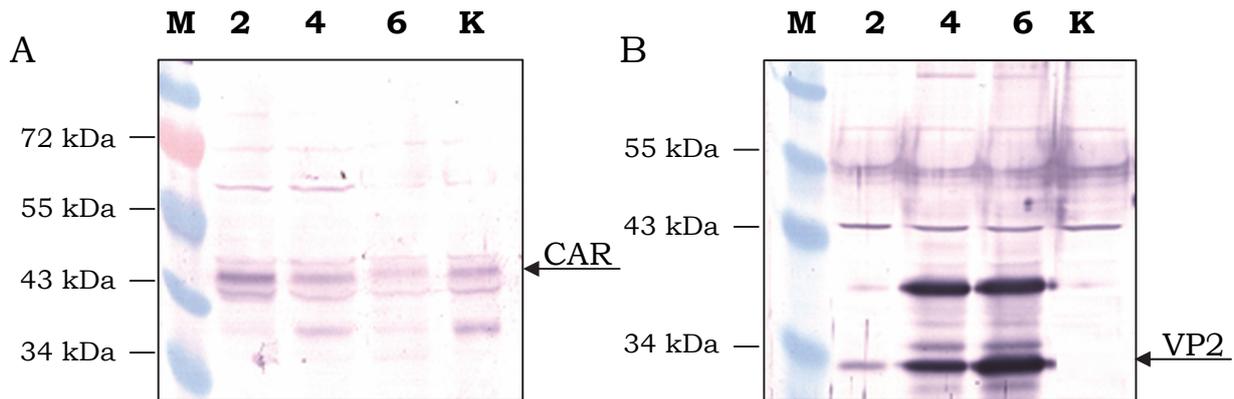
Zunächst sollte der direkte Einfluss einer Coxsackievirus-Infektion auf die zelluläre CAR-Synthese untersucht werden. Dazu wurden HeLa-, 293- und L929-Zellen mit CVB3H3 (m.o.i. 5) inkubiert, nicht-infizierte Zellen stellten die Kontrollen dar. Nach 0, 2, 4, und 6 h erfolgte die Probennahme mit anschließender Isolierung von mRNA und Proteinen. Die gewonnene RNA diente nach ihrer Umschreibung in cDNA als Grundlage für eine Real-time PCR, die Proteine wurden per SDS-Page aufgetrennt und der humane CAR im Western Blot detektiert.



**Abb. 28: CAR-Echtzeit-PCR von cDNA aus HeLa-Zellen**

HeLa-Zellen wurden mit CVB3H3 infiziert (m.o.i. 5), zu den angegebenen Zeiten erfolgte die Probennahme. Nicht-infizierte Zellen dienten als Kontrollen. Dargestellt sind die aus drei Versuchsdurchführungen mit jeweils 2 Proben/Zeitpunkt gewonnenen Mittelwerte und Standardabweichungen für die Anzahl der cDNA-Kopien (\*\*:  $P < 0,01$  im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle im Student'schen t-Test)

Mit Hilfe der Real-time PCR konnte im Verlauf einer CVB3-Infektion von HeLa-Zellen die Abnahme der CAR-Expression im Vergleich zu den nicht-infizierten Kontrollen und absolut beobachtet werden (Abb. 28).



**Abb. 29: Nachweis von CAR (A) und VP2 (B) nach Infektion von HeLa-Zellen mit CVB3 mittels Western Blot**

HeLa-Zellen wurden mit CVB3H3 infiziert (m.o.i. 5), nach 0, 2, 4 und 6 h erfolgte die Probennahme. Je Probe wurden 50 µg Protein in einem 10%igen SDS-PAA-Gel analysiert.

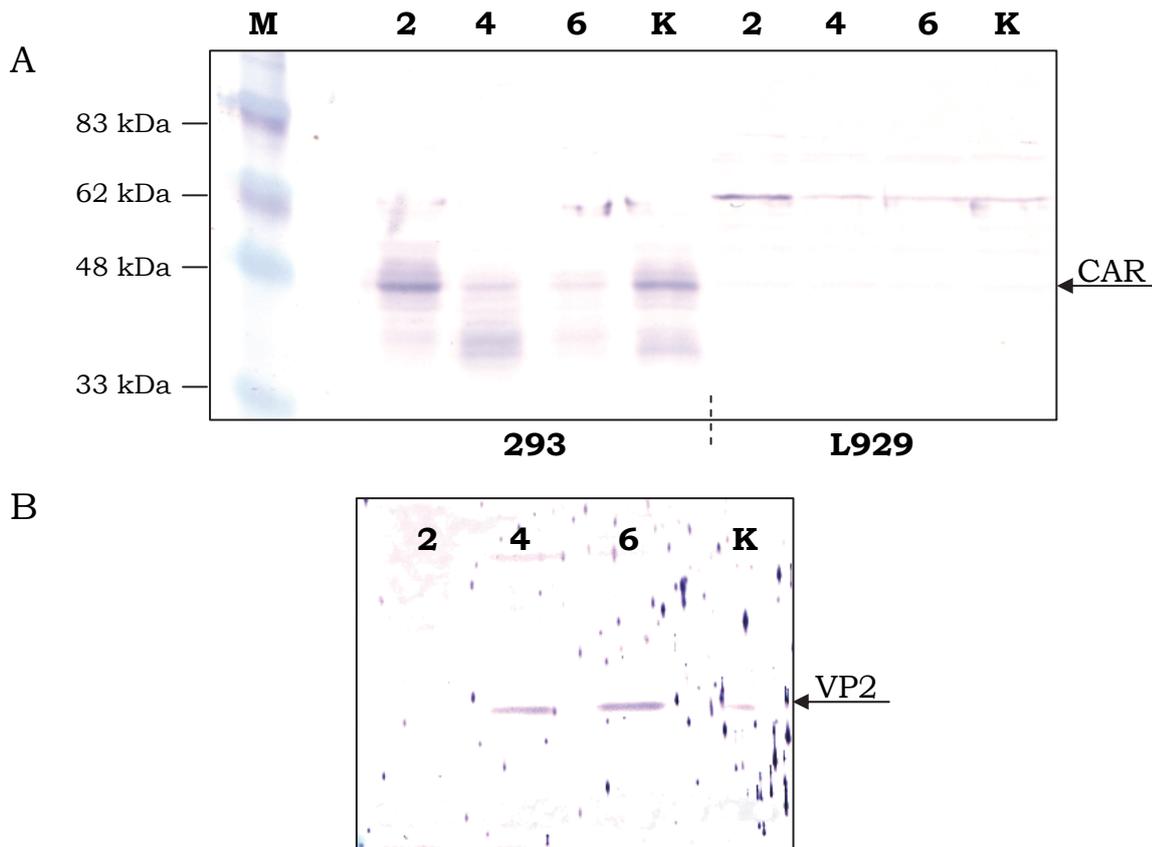
M = Größenstandard (PageRuler Prestained Protein Ladder);

K = Kontrolle (0-h-Probe); 2, 4, 6 = 2, 4 und 6 h p. i. genommene Proben

Abbildung 29 A zeigt, dass es auch auf Proteinebene zu einer Reduzierung der nachweisbaren Rezeptormenge kam. Da parallel dazu der Anteil detektierbaren viralen Kapsidproteins (VP2) anstieg (s. Abb. 29 B), ist die Inhibierung der CAR-Synthese nicht als spezifischer Vorgang anzusehen, sondern in den „host cell shut-off“, das Abschalten der Bildung zellulärer Proteine, eingebettet.

Die Ergebnisse der quantitativen PCR für die 293-Zellen entsprachen den für HeLa-Zellen gewonnenen. Der Western Blot lieferte ebenfalls ein vergleichbares Bild – sowohl hinsichtlich der CAR-Expression (Abb. 30 A) als auch im Anstieg der VP2-Menge (nicht dargestellt).

Unter den aus L929-Zellen isolierten RNA-Spezies ließen sich mit Hilfe der Real-time PCR erwartungsgemäß keine Transkripte des CAR-Gens nachweisen. Daraus folgte das Fehlen der Rezeptor-Bande bei 46 kDa im Proteingel (Abb. 30 A). Im VP2-Blot (Abb. 30 B) war dennoch virales Kapsidprotein detektierbar, wenn auch nur in geringem Maße.



**Abb. 30: Nachweis von CAR und VP2 nach Infektion von 293- und L929-Zellen mit CVB3 mittels Western Blot**

293- und L929-Zellen wurden mit CVB3H3 infiziert (m.o.i. 5), nach 0, 2, 4 und 6 h erfolgte die Probennahme. Je Probe wurden 50 µg Protein in einem 10%igen SDS-PAA-Gel analysiert.

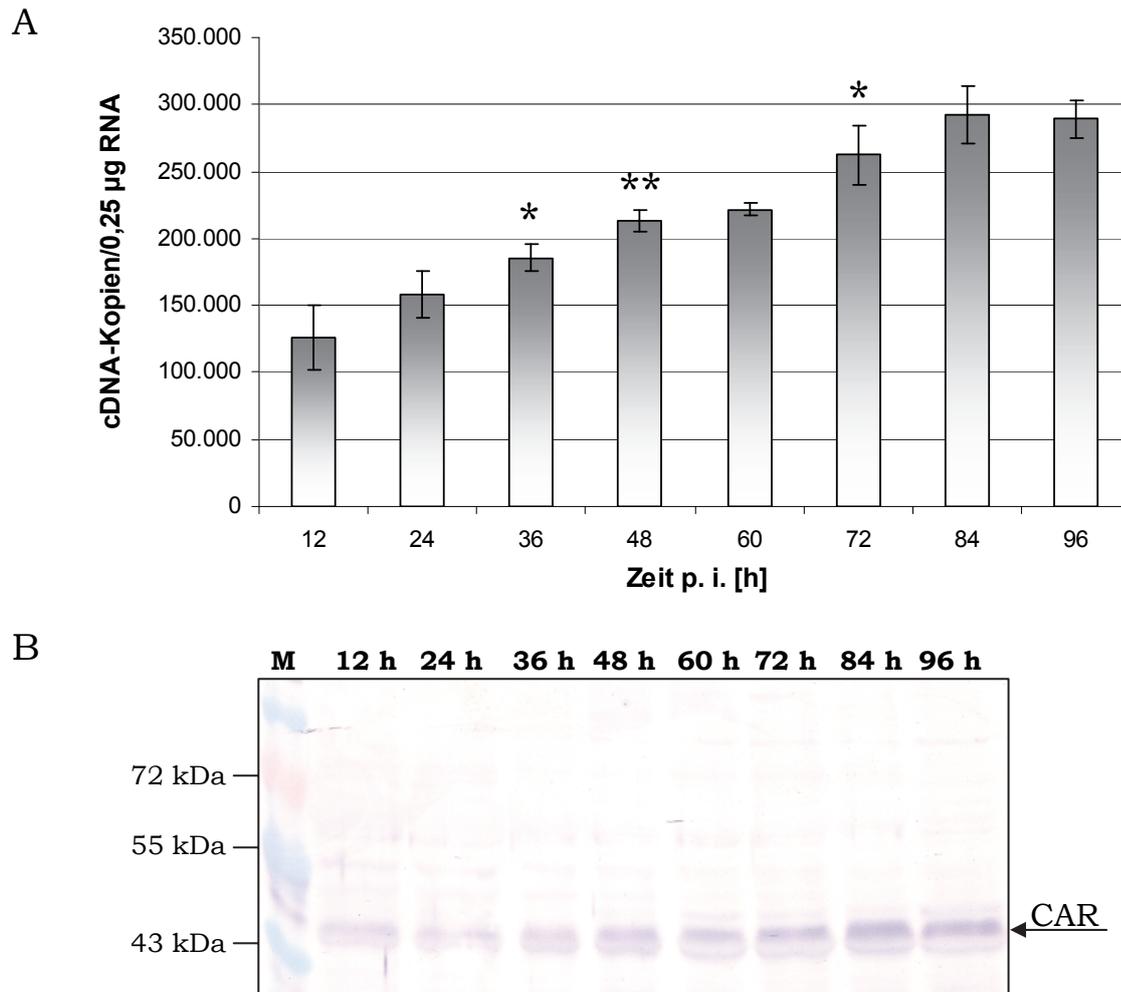
M = Größenstandard (PageRuler Prestained Protein Ladder);

K = Kontrolle (0-h-Probe); 2, 4, 6 = 2, 4 und 6 h p. i. genommene Proben

*Bild A:* Western Blot von 293- und L929-Zellen mit α-CAR; *Bild B:* Western Blot von L929-Zellen mit α-VP2

#### 4.4.3 Untersuchungen zum Einfluss der Zelldichte

Da der CAR in den „tight junctions“, den Zell-Zell-Kontaktstellen, lokalisiert ist [37, 41] und ihm für die Kontaktaufnahme zwischen den Zellen – z. B. bei der Gewebebildung – eine Bedeutung beigemessen wird [31, 184], stellte sich die Frage, ob die CAR-Expression durch die Zelldichte beeinflusst wird. Um dies zu untersuchen, wurden HeLa-Zellen in Petrischalen ausgesät, im Brutschrank inkubiert und während der Zellvermehrung in regelmäßigen Abständen zur Isolierung von RNA und Proteinen geerntet. Wieder erfolgte die Gewinnung von zwei Parallelproben je Zeitpunkt.



**Abb. 31: Untersuchung der CAR-Expression in HeLa-Zellen in Abhängigkeit von der Zelldichte**

HeLa-Zellen wurden dünn ausgesät und im Brutschrank inkubiert, alle 12 h erfolgte die Probennahme zur RNA- bzw. Proteinsolierung.

*Bild A:* CAR-Real-time PCR der aus den HeLa-Zellen durch Reverse Transkription gewonnenen cDNA; dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei Versuchsdurchführungen (\*\*:  $P < 0,01$  bzw. \*:  $P < 0,05$  im Vergleich zur vorhergehenden Probe im Student'schen t-Test)

*Bild B:* Western Blot mit  $\alpha$ -CAR. Je Probe wurden 50  $\mu$ g Protein in einem 10%igen SDS-PAA-Gel analysiert.

M = Größenstandard (PageRuler Prestained Protein Ladder);

12 h – 96 h = zu den genannten Zeitpunkten nach Versuchsbeginn genommene Proben

Sowohl auf RNA-Ebene als auch auf der Stufe der Proteine ließ sich ein Einfluss der Zelldichte auf die Bildung des CAR nachweisen (s. Abb. 31). In der Real-time PCR ist nach 84 h kein weiterer Anstieg der CAR-Kopienzahl mehr erkennbar, während im Western Blot bis 96 h nach Versuchsbeginn ein Zuwachs der Rezeptormenge detektierbar war. Offensichtlich werden Änderungen auf der Transkriptionsebene nicht sofort auf Translationsniveau

umgesetzt, außerdem dürften auch die unterschiedlichen Halbwertszeiten von RNAs und Proteinen von Bedeutung sein.

#### 4.4.4 Untersuchungen zum Einfluss von Zytokinen

Die dilatative Kardiomyopathie stellt sich als komplexes Zusammenspiel von (u. a. virusbedingtem) Zelltod, (auto-) immunologischen Prozessen und Geweberegenerierung dar. Dabei scheinen Zytokine eine wichtige Rolle zu spielen. So wurden im Umfeld von DCM und Myokarditis beispielsweise erhöhte Spiegel von TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 und IFN- $\gamma$  [123, 147, 149, 198] nachgewiesen. Vor diesem Hintergrund sollte an einigen ausgewählten Zytokinen deren möglicher Einfluss auf die CAR-Expression untersucht werden. Die in den Experimenten eingesetzten Konzentrationen sind der Tabelle 4 unter 3.2.2 zu entnehmen. In der Tabelle 8 ist der Aufbau aller Versuche dargestellt.

**Tab. 8: Aufbau der Zytokin-Versuche**

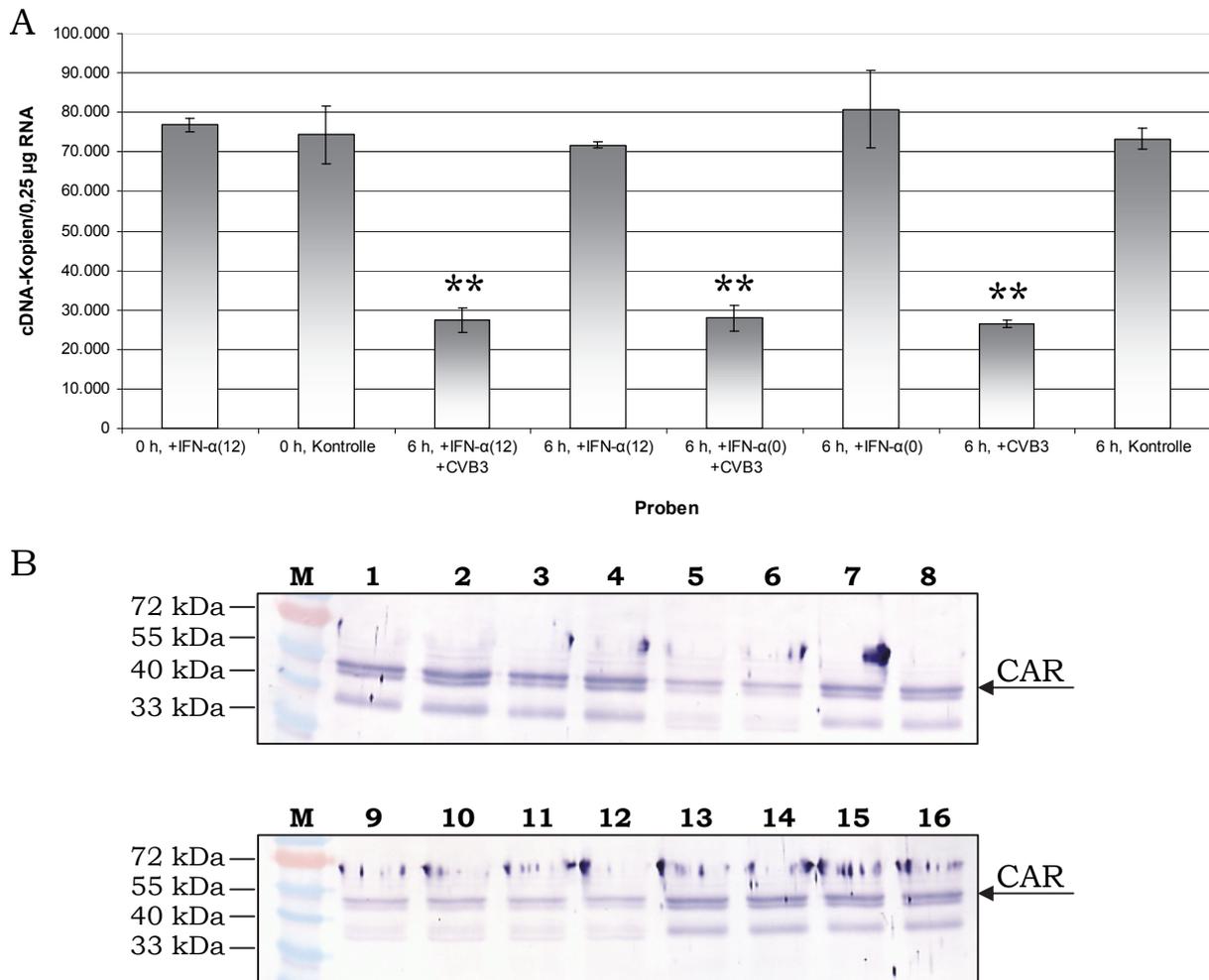
Proben	Zytokinzugabe zum Zeitpunkt 0	Viruszugabe zum Zeitpunkt 0
12 h vorinkubierte Zellen	X	X
12 h vorinkubierte Zellen	X	
nicht vorinkubierte Zellen	X	X
nicht vorinkubierte Zellen	X	
nicht vorinkubierte Zellen		X
nicht vorinkubierte Zellen		

Die Probennahme erfolgte zu den Zeitpunkten -12 h („Nullwert“ für Vorinkubation), 0 h (vorinkubierte und nicht vorinkubierte Zellen als Kontrollen), 2 h, 4 h und 6 h, und zu jeder Probe wurden zwei Parallelen geführt. Die durch Zentrifugation pelletierten Zellen dienten jeweils für die RNA- und Proteinisolierung.

##### 4.4.4.1 IFN- $\alpha$

Weder in der Real-time PCR noch im Western Blot konnte ein Einfluss der Zytokininkubation auf die Expression des Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptors nachgewiesen werden (s. Abb. 32 A und B). Vergleichbar mit den

Ergebnissen zur Auswirkung der Virusinfektion (4.4.2) war eine deutliche Veränderung der detektierbaren Rezeptormenge (bzw. der entsprechenden RNA) nur in infizierten Zellen zu verzeichnen, da deren Biosyntheseapparat auf die Produktion von Virusbestandteilen umgestellt wurde. In diesen Proben zeigte sich eine signifikante Reduktion der CAR-Expression.



**Abb. 32: Untersuchung der CAR-Expression in HeLa-Zellen nach IFN- $\alpha$ -Inkubation**

12 h vor bzw. zeitgleich mit der CVB3-Infektion wurden HeLa-Zellen mit IFN- $\alpha$  inkubiert. Die Probennahme erfolgte zu den Zeitpunkten -12 h, 0 h, 2 h, 4 h und 6 h. Da innerhalb der ersten vier Stunden keine Veränderungen detektierbar waren, sind in den Abbildungen die 2- und 4-h-Werte nicht dargestellt.

*Bild A:* CAR-Real-time PCR der aus den HeLa-Zellen durch Reverse Transkription gewonnenen cDNA; dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei Versuchsdurchführungen (\*\*:  $P < 0,01$  im Vergleich zur entsprechenden nicht-infizierten Probe im Student'schen t-Test); +IFN- $\alpha$ (12) = zwölfstündige IFN- $\alpha$ -Vorinkubation; +IFN- $\alpha$ (0) = IFN- $\alpha$ -Zugabe zeitgleich mit Infektion

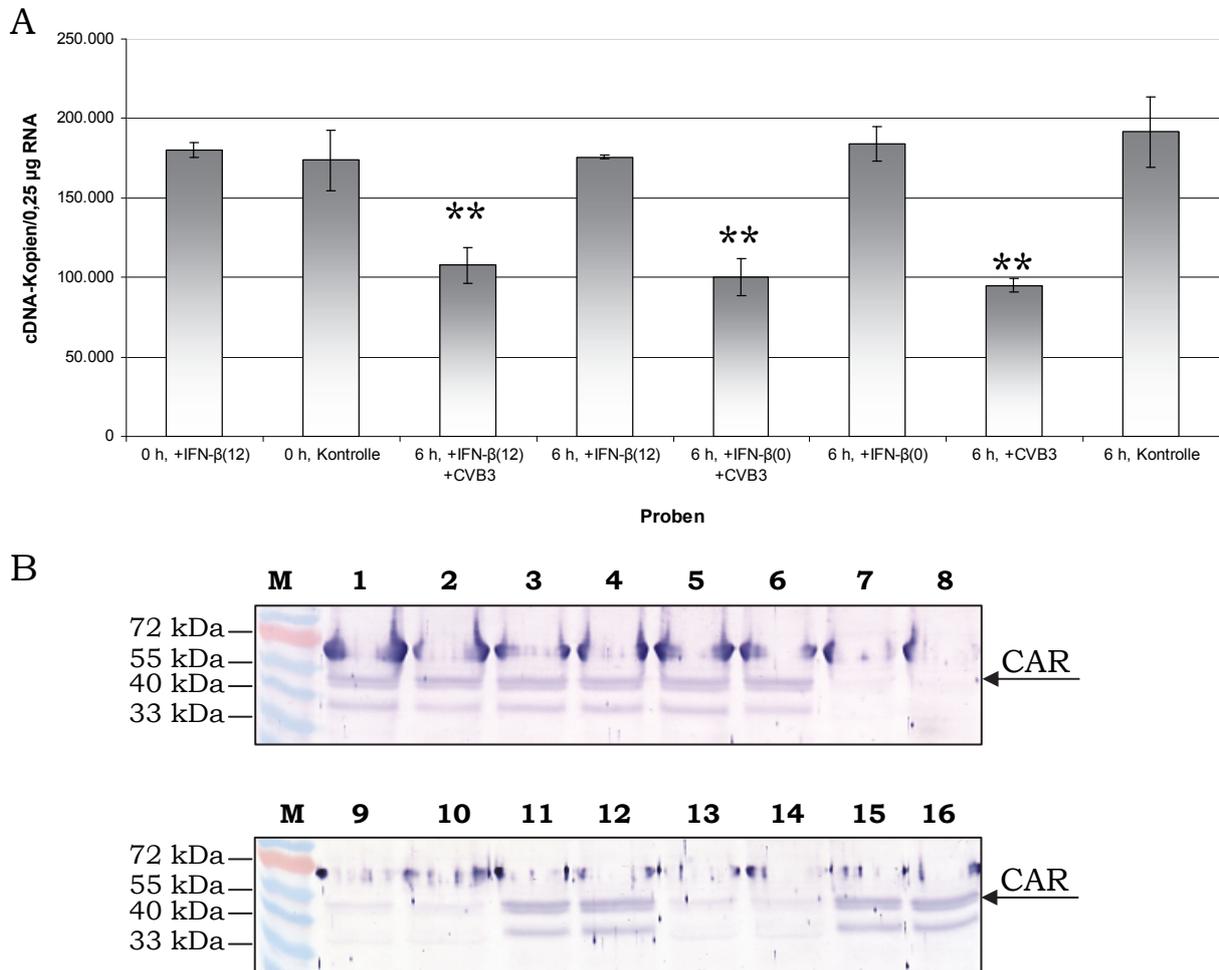
*Bild B:* Western Blot mit  $\alpha$ -CAR. Je Probe wurden 50  $\mu$ g Protein in einem 10%igen SDS-PAA-Gel analysiert.

M = Größenstandard (PageRuler Prestained Protein Ladder);

1, 2 = 0 h +IFN- $\alpha$ (12); 3, 4 = 0 h Kontrolle; 5, 6 = 6 h +IFN- $\alpha$ (12) +CVB3; 7, 8 = 6 h +IFN- $\alpha$ (12); 9, 10 = 6 h +IFN- $\alpha$ (0) +CVB3; 11, 12 = 6 h +CVB3; 13, 14 = 6 h +IFN- $\alpha$ (0); 15, 16 = 6 h Kontrolle

#### 4.4.4.2 IFN- $\beta$

Die Ergebnisse der IFN- $\beta$ -Versuchsreihen entsprachen denen der IFN- $\alpha$ -Untersuchungen und sind in der Abbildung 33 dargestellt.



**Abb. 33: Untersuchung der CAR-Expression in HeLa-Zellen nach IFN- $\beta$ -Inkubation**

12 h vor bzw. zeitgleich mit der CVB3-Infektion wurden HeLa-Zellen mit IFN- $\beta$  inkubiert. Die Probenahme erfolgte zu den Zeitpunkten -12 h, 0 h, 2 h, 4 h und 6 h. Da innerhalb der ersten vier Stunden keine Veränderungen detektierbar waren, sind in den Abbildungen die 2- und 4-h-Werte nicht dargestellt.

*Bild A:* CAR-Real-time PCR der aus den HeLa-Zellen durch Reverse Transkription gewonnenen cDNA; dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei Versuchsdurchführungen (\*\*:  $P < 0,01$  im Vergleich zur entsprechenden nicht-infizierten Probe im Student'schen t-Test); +IFN- $\beta$ (12) = zwölfstündige IFN- $\beta$ -Vorinkubation; +IFN- $\beta$ (0) = IFN- $\beta$ -Zugabe zeitgleich mit Infektion

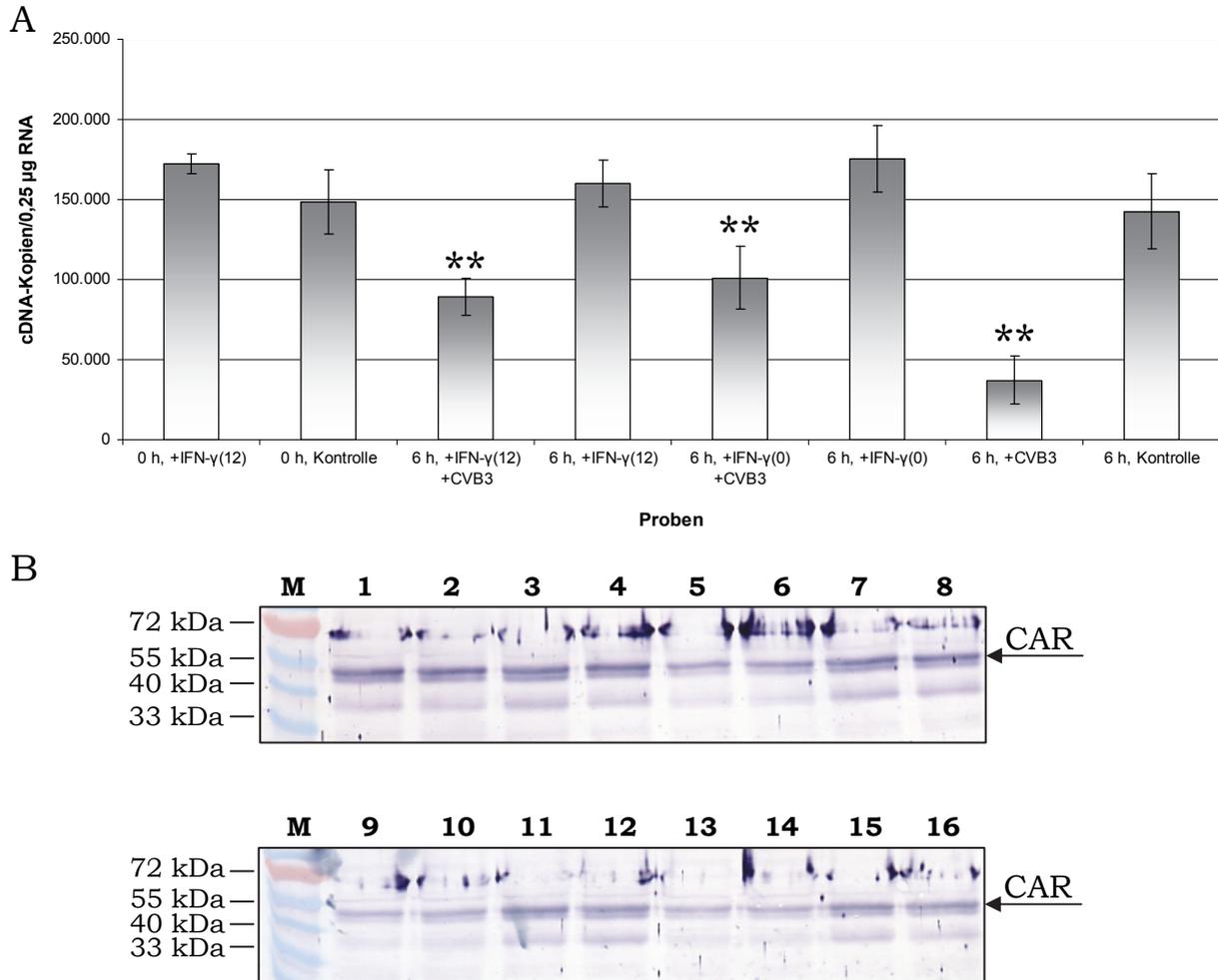
*Bild B:* Western Blot mit  $\alpha$ -CAR. Je Probe wurden 50  $\mu$ g Protein in einem 10%igen SDS-PAA-Gel analysiert.

M = Größenstandard (PageRuler Prestained Protein Ladder);

1, 2 = 0 h +IFN- $\beta$ (12); 3, 4 = 0 h Kontrolle; 5, 6 = 6 h +IFN- $\beta$ (12); 7, 8 = 6 h +IFN- $\beta$ (12) +CVB3; 9, 10 = 6 h +IFN- $\beta$ (0) +CVB3; 11, 12 = 6 h +IFN- $\beta$ (0); 13, 14 = 6 h +CVB3; 15, 16 = 6 h Kontrolle

#### 4.4.4.3 IFN- $\gamma$

Das Ergebnis in den Versuchen mit IFN- $\gamma$  war weniger klar. Auch hier zeigte sich ein deutlicher Einfluss der CVB3-Infektion auf die Transkription und Translation zellulärer Gene.



**Abb. 34: Untersuchung der CAR-Expression in HeLa-Zellen nach IFN- $\gamma$ -Inkubation**

12 h vor bzw. zeitgleich mit der CVB3-Infektion wurden HeLa-Zellen mit IFN- $\gamma$  inkubiert. Die Probenahme erfolgte zu den Zeitpunkten -12 h, 0 h, 2 h, 4 h und 6 h. Da innerhalb der ersten vier Stunden keine Veränderungen detektierbar waren, sind in den Abbildungen die 2- und 4-h-Werte nicht dargestellt.

*Bild A:* CAR-Real-time PCR der aus den HeLa-Zellen durch Reverse Transkription gewonnenen cDNA; dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei Versuchsdurchführungen (\*\*:  $P < 0,01$  im Vergleich zur entsprechenden nicht-infizierten Probe im Student'schen t-Test); +IFN- $\gamma$ (12) = zwölfstündige IFN-Vorinkubation; +IFN- $\gamma$ (0) = IFN-Zugabe zeitgleich mit Infektion

*Bild B:* Western Blot mit  $\alpha$ -CAR. Je Probe wurden 50  $\mu$ g Protein in einem 10%igen SDS-PAA-Gel analysiert.

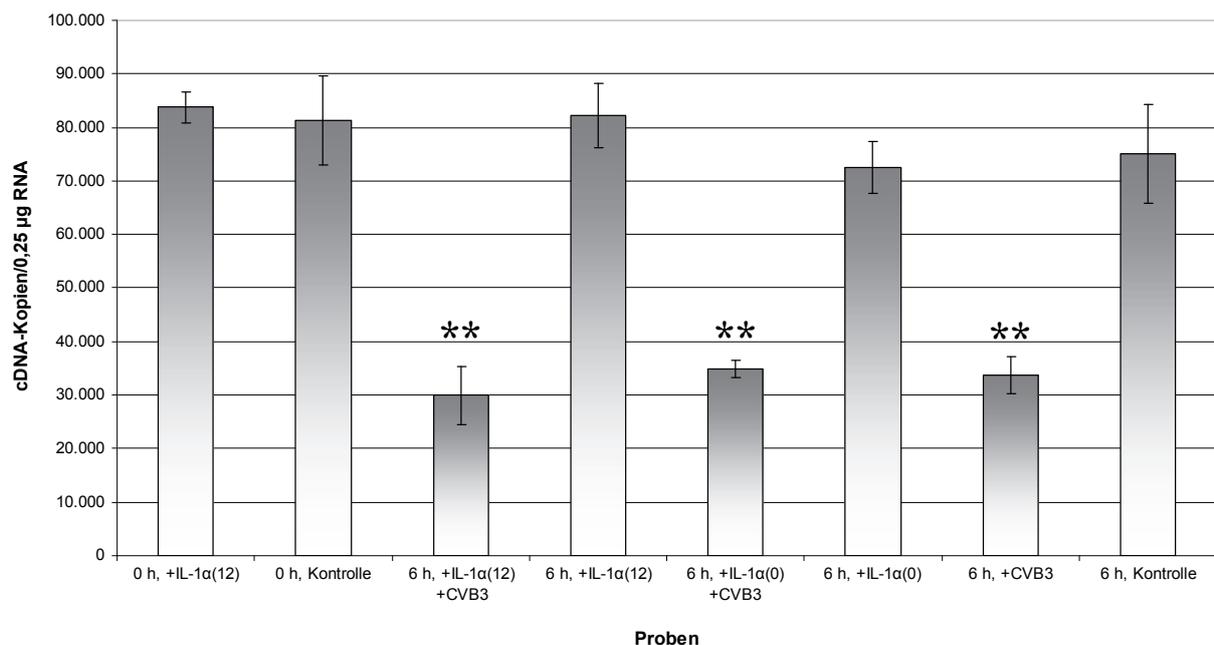
M = Größenstandard (PageRuler Prestained Protein Ladder);

1, 2 = 0 h +IFN- $\gamma$ (12); 3, 4 = 0 h Kontrolle; 5, 6 = 6 h +IFN- $\gamma$ (12) +CVB3; 7, 8 = 6 h +IFN- $\gamma$ (12); 9, 10 = 6 h +IFN- $\gamma$ (0) +CVB3; 11, 12 = 6 h +IFN- $\gamma$ (0); 13, 14 = 6 h +CVB3; 15, 16 = 6 h Kontrolle

Auf RNA-Ebene schwankten die Werte innerhalb der Gruppen direkt miteinander vergleichbarer Proben (infiziert / nicht infiziert) stärker als bei IFN- $\alpha$  und - $\beta$ . Die ermittelten Unterschiede in der CAR-Expression zwischen IFN- $\gamma$ -inkubierten, infizierten Zellen und nicht IFN- $\gamma$ -inkubierten, infizierten Zellen waren signifikant (s. Abb. 34 A). Dies scheint eine protektive Wirkung des Interferons gegenüber dem „host cell shut-off“ durch die viralen Proteine aufzuzeigen. Wie in den Western Blots in Abbildung 34 B zu erkennen ist, ließ sich dieser Effekt auf Proteinebene allerdings nicht verifizieren.

#### 4.4.4.4 IL-1 $\alpha$

Die Inkubation der HeLa-Zellen mit IL-1 $\alpha$ , einer der beiden IL-1-Isoformen, welcher eine Rolle bei lokalen Entzündungsprozessen zugeschrieben wird, wirkte sich weder auf Transkriptions- noch auf Translationsebene deutlich auf die Expression von CAR aus.

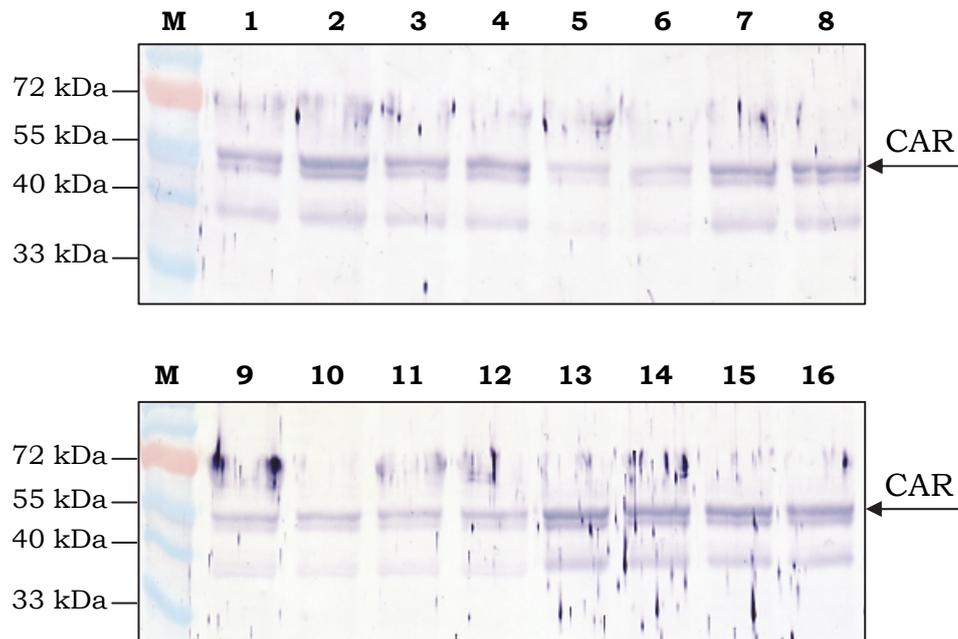


**Abb. 35: Untersuchung der CAR-Expression in HeLa-Zellen nach IL-1 $\alpha$ -Inkubation, Teil 1**

12 h vor bzw. zeitgleich mit der CVB3-Infektion wurden HeLa-Zellen mit IL-1 $\alpha$  inkubiert. Die Probenahme erfolgte zu den Zeitpunkten -12 h, 0 h, 2 h, 4 h und 6 h. Da innerhalb der ersten vier Stunden keine Veränderungen detektierbar waren, sind in den Abbildungen die 2- und 4-h-Werte nicht dargestellt.

Dargestellt sind die durch CAR-Real-time PCR im LightCycler aus zwei Versuchsdurchführungen mit jeweils 2 Proben/Zeitpunkt gewonnenen Mittelwerte und Standardabweichungen für die Anzahl der cDNA-Kopien. (\*\*:  $P < 0,01$  im Vergleich zur entsprechenden nicht-infizierten Probe im Student'schen t-Test); +IL-1 $\alpha$ (12) = zwölfstündige IL-1 $\alpha$ -Vorinkubation; +IL-1 $\alpha$ (0) = IL-1 $\alpha$ -Zugabe zeitgleich mit Infektion

Die Unterschiede zwischen vergleichbaren Proben in den Gruppen infiziert / nicht-infiziert waren nicht signifikant (s. Abb. 35, 36).



**Abb. 36: Untersuchung der CAR-Expression in HeLa-Zellen nach IL-1 $\alpha$ -Inkubation, Teil 2**

Western Blot mit  $\alpha$ -CAR. Je Probe wurden 50  $\mu$ g Protein in einem 10%igen SDS-PAA-Gel analysiert.

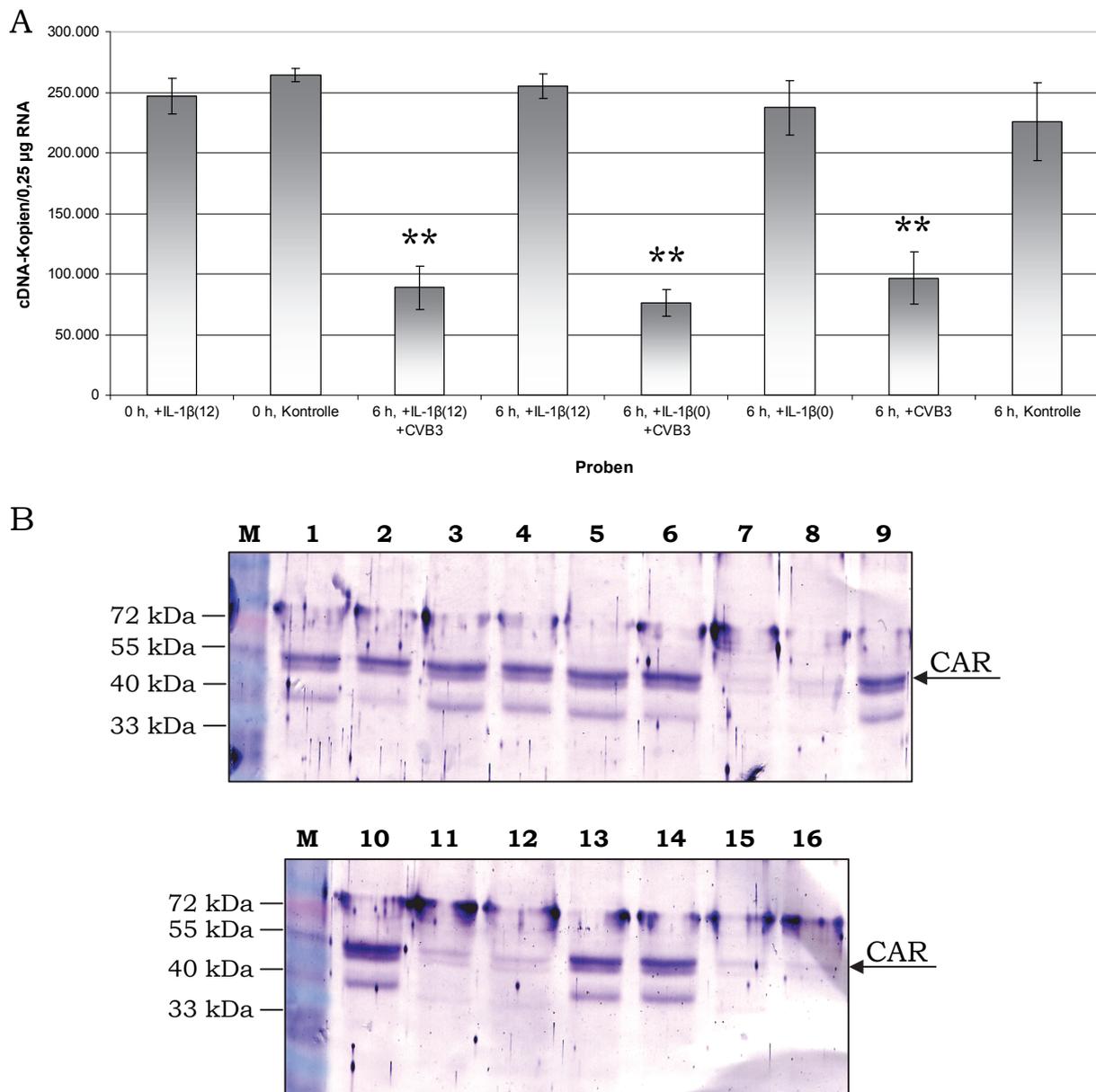
M = Größenstandard (PageRuler™ Prestained Protein Ladder);

1, 2 = 0 h +IL-1 $\alpha$ (12); 3, 4 = 0 h Kontrolle; 5, 6 = 6 h +IL-1 $\alpha$ (12) +CVB3; 7, 8 = 6 h +IL-1 $\alpha$ (12); 9, 10 = 6 h +IL-1 $\alpha$ (0) +CVB3; 11, 12 = 6 h +CVB3; 13, 14 = 6 h +IL-1 $\alpha$ (0); 15, 16 = 6 h Kontrolle; +IL-1 $\alpha$ (12) = zwölfstündige IL-1 $\alpha$ -Vorinkubation; +IL-1 $\alpha$ (0) = IL-1 $\alpha$ -Zugabe zeitgleich mit Infektion

#### 4.4.4.5 IL-1 $\beta$

In mehreren Arbeiten wurde eine erhöhte IL-1 $\beta$ -Expression bei Auftreten einer Myokarditis oder dilatativen Kardiomyopathie beschrieben [68, 70, 113, 147]. Aus diesem Grund sollte der Einfluss des Zytokins auf die Expression des CAR näher betrachtet werden.

Die Ergebnisse der IL-1 $\beta$ -Untersuchungen entsprachen denen der IL-1 $\alpha$ -Experimente und sind in der Abbildung 37 dargestellt. Es konnte kein direkter Zusammenhang zwischen IL-1 $\beta$ -Inkubation und Steigerung bzw. Verminderung der CAR-Bildung nachgewiesen werden. Auch hier gab es signifikante Unterschiede nur im Vergleich zwischen infizierten und nicht-infizierten Proben. Die auf RNA-Ebene ermittelten Differenzen innerhalb der Gruppen infiziert / nicht-infiziert waren statistisch nicht signifikant ( $P > 0,05$  im Student'schen t-Test).



**Abb. 37: Untersuchung der CAR-Expression in HeLa-Zellen nach IL-1 $\beta$ -Inkubation**

12 h vor bzw. zeitgleich mit der CVB3-Infektion wurden HeLa-Zellen mit IL-1 $\beta$  inkubiert. Da innerhalb der ersten vier Stunden keine Veränderungen detektierbar waren, sind in den Abbildungen die 2- und 4-h-Werte nicht dargestellt.

*Bild A:* CAR-Real-time PCR der aus den HeLa-Zellen durch Reverse Transkription gewonnenen cDNA; dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei Versuchsdurchführungen (\*\*:  $P < 0,01$  im Vergleich zur entsprechenden nicht-infizierten Probe im Student'schen t-Test); +IL-1 $\beta$ (12) = zwölfstündige IL-1 $\beta$ -Vorinkubation; +IL-1 $\beta$ (0) = IL-1 $\beta$ -Zugabe zeitgleich mit Infektion

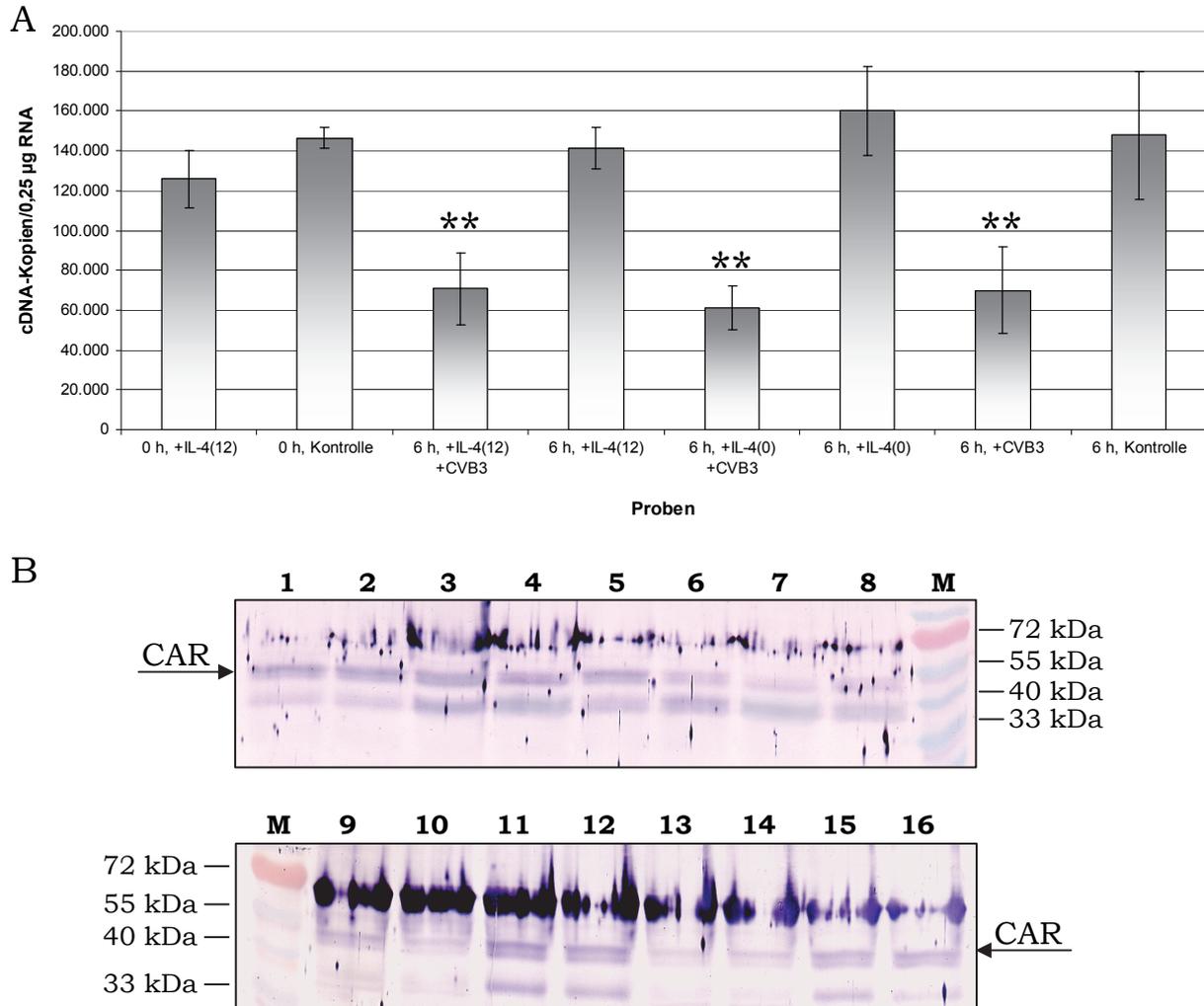
*Bild B:* Western Blot mit  $\alpha$ -CAR. Je Probe wurden 50  $\mu$ g Protein in einem 10%igen SDS-PAA-Gel analysiert.

M = Größenstandard (PageRuler Prestained Protein Ladder);

1, 2 = 0 h +IL-1 $\beta$ (12); 3, 4 = 0 h Kontrolle; 5, 6 = 6 h +IL-1 $\beta$ (12); 7, 8 = 6 h +IL-1 $\beta$ (12) +CVB3; 9, 10 = 6 h +IL-1 $\beta$ (0); 11, 12 = 6 h +IL-1 $\beta$ (0) +CVB3; 13, 14 = 6 h Kontrolle; 15, 16 = 6 h +CVB3

#### 4.4.4.6 IL-4

Durch die Inkubation der HeLa-Zellen mit dem antiinflammatorischen Zytokin IL-4 wurde die Expression des Virus-Rezeptors nicht erkennbar beeinflusst (s. Abb. 38).



**Abb. 38: Untersuchung der CAR-Expression in HeLa-Zellen nach IL-4-Inkubation**

12 h vor bzw. zeitgleich mit der CVB3-Infektion wurden HeLa-Zellen mit IL-4 inkubiert. Die Probenahme erfolgte zu den Zeitpunkten -12 h, 0 h, 2 h, 4 h und 6 h. Da innerhalb der ersten vier Stunden keine Veränderungen detektierbar waren, sind in den Abbildungen die 2- und 4-h-Werte nicht dargestellt.

*Bild A:* CAR-Real-time PCR der aus den HeLa-Zellen durch Reverse Transkription gewonnenen cDNA; dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei Versuchsdurchführungen (\*\*:  $P < 0,01$  im Vergleich zur entsprechenden nicht-infizierten Probe im Student'schen t-Test); +IL-4(12) = zwölfstündige IL-4-Vorinkubation; +IL-4(0) = IL-4-Zugabe zeitgleich mit Infektion

*Bild B:* Western Blot mit  $\alpha$ -CAR. Je Probe wurden 50  $\mu$ g Protein in einem 10%igen SDS-PAA-Gel analysiert.

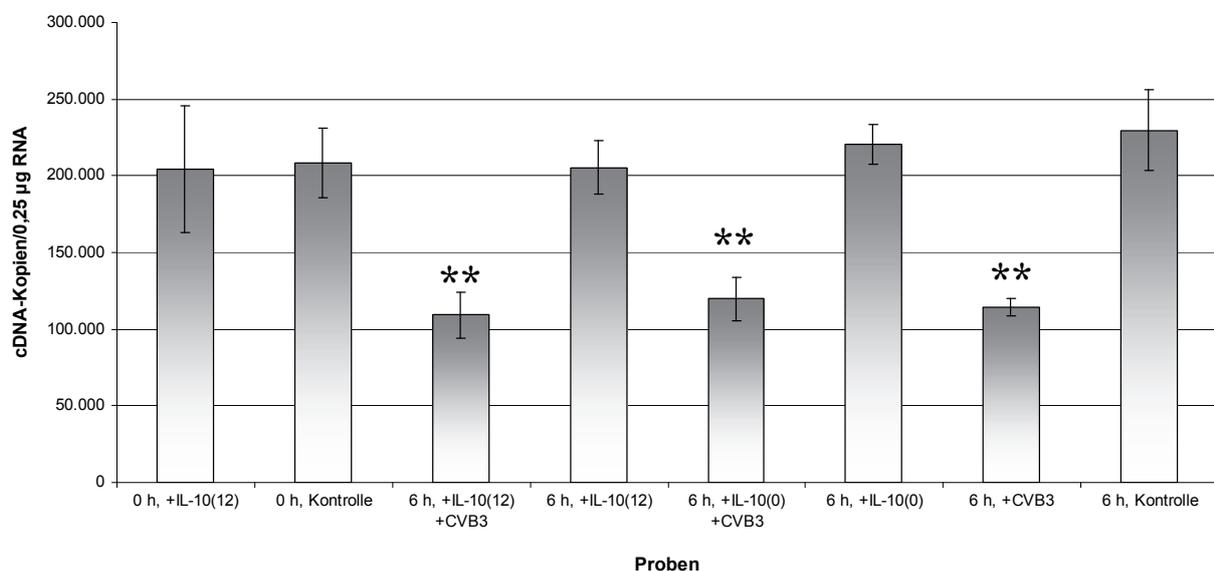
M = Größenstandard (PageRuler Prestained Protein Ladder);

1, 2 = 0 h +IL-4(12); 3, 4 = 0 h Kontrolle; 5, 6 = 6 h +IL-4(12); 7, 8 = 6 h +IL-4(12) +CVB3; 9, 10 = 6 h +IL-4(0) +CVB3; 11, 12 = 6 h +IL-4(0); 13, 14 = 6 h +CVB3; 15, 16 = 6 h Kontrolle

Erneut waren signifikante Unterschiede nur zwischen infizierten und nicht-infizierten Zellen zu verzeichnen.

#### 4.4.4.7 IL-10

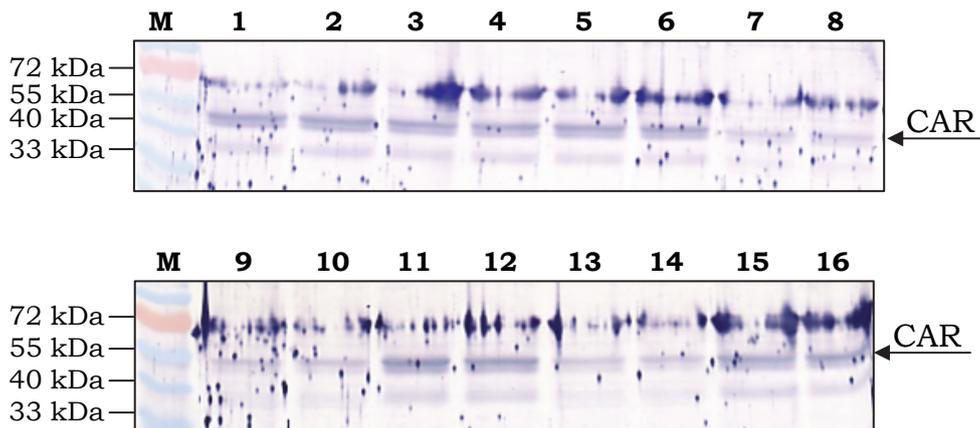
Auch für das letzte der untersuchten Zytokine – IL-10 – ist aus der Literatur bekannt, dass es bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie im Vergleich zu Gesunden, aber auch zu Patienten mit anderen Herzerkrankungen (z. B. KHK) verstärkt exprimiert wird [144, 161]. Ein Einfluss des Interleukins auf die Synthese des Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptors ließ sich allerdings weder auf RNA- noch auf Proteinebene nachweisen (s. Abb. 39, 40).



**Abb. 39: Untersuchung der CAR-Expression in HeLa-Zellen nach IL-10-Inkubation, Teil 1**

12 h vor bzw. zeitgleich mit der CVB3-Infektion wurden HeLa-Zellen mit IL-10 inkubiert. Die Probennahme erfolgte zu den Zeitpunkten -12 h, 0 h, 2 h, 4 h und 6 h. Da innerhalb der ersten vier Stunden keine Veränderungen detektierbar waren, sind in den Abbildungen die 2- und 4-h-Werte nicht dargestellt.

CAR-Real-time PCR der aus den HeLa-Zellen durch Reverse Transkription gewonnenen cDNA; dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei Versuchsdurchführungen (\*\*:  $P < 0,01$  im Vergleich zur entsprechenden nicht-infizierten Probe im Student'schen t-Test); +IL-10(12) = zwölfstündige IL-10-Vorinkubation; +IL-10(0) = IL-10-Zugabe zeitgleich mit Infektion



**Abb. 40: Untersuchung der CAR-Expression in HeLa-Zellen nach IL-10-Inkubation, Teil 2**

Western Blot mit  $\alpha$ -CAR. Je Probe wurden 50  $\mu$ g Protein in einem 10%igen SDS-PAA-Gel analysiert.

M = Größenstandard (PageRuler Prestained Protein Ladder);

1, 2 = 0 h +IL-10(12); 3, 4 = 0 h Kontrolle; 5, 6 = 6 h +IL-10(12); 7, 8 = 6 h +IL-10(12) +CVB3; 9, 10 = 6 h +IL-10(0) +CVB3; 11, 12 = 6 h +IL-10(0); 13, 14 = 6 h +CVB3; 15, 16 = 6 h Kontrolle

#### 4.4.4.8 Zusammenfassung zu den Zytokin-Versuchen

Für keines der in dieser Arbeit untersuchten Zytokine ließ sich ein deutlicher Einfluss auf die CAR-Expression nachweisen. Lediglich nach der Inkubation mit Interferon- $\gamma$  war die Menge detektierbarer CAR-mRNA in CVB3-infizierten HeLa-Zellen im Vergleich zu nicht IFN-behandelten Zellen erhöht. Allerdings konnte dieser Effekt auf Proteinebene nicht beobachtet werden. Insgesamt ist davon auszugehen, dass die Expression des Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptors nicht durch die betrachteten Zytokine reguliert wird, sondern dass dabei andere Faktoren – wie zum Beispiel die Zelldichte – eine Rolle spielen.

## 5 Diskussion

Die Herzinsuffizienz ist das weltweit am schnellsten zunehmende Herzkreislaufleiden. Die 5-Jahres-Mortalitätsraten nach Diagnosestellung liegen zwischen 40 und 60 % [132]. Mehr als ein Drittel der Erkrankten verstirbt innerhalb eines Jahres nach der ersten Einweisung ins Krankenhaus, die mittlere Überlebensrate liegt deutlich unter der vieler Krebserkrankungen. Die Ursachen für die Entstehung einer Herzinsuffizienz können vielfältig sein, in ca. 30 % der Fälle liegt der Erkrankung eine Kardiomyopathie zugrunde. Man unterscheidet fünf Kardiomyopathieformen, unter denen die dilatative – im Hinblick auf Erkrankungsalter, natürlichen Verlauf und die stark eingeschränkten Therapiemöglichkeiten – eine herausragende Stellung einnimmt [53]. Eine dilatative Kardiomyopathie kann durch verschiedene Faktoren hervorgerufen bzw. in ihrem Verlauf beeinflusst werden. Parallel zu einer großen Zahl von Krankheitsverläufen, deren Ätiologie und Pathogenese nicht nachvollziehbar ist (idiopathische DCM), wurden in vielen Fällen familiär-genetische, inflammatorische, (auto-)immunologische, toxische oder Kombinationen der genannten Determinanten als Ursache der Erkrankung identifiziert. Der entzündlichen Kardiomyopathie – einer Myokarditis, assoziiert mit kardialer Dysfunktion – wird neben den genetisch bedingten Formen eine besondere Bedeutung für die Entstehung einer DCM beigemessen [35, 64]. Als Auslöser der Inflammation wurde eine Vielzahl von Erregern (Viren, Bakterien, Pilze und Parasiten) beschrieben, häufig ließen sich Enteroviren und unter diesen besonders Coxsackieviren vom Typ B3 nachweisen. Trotz intensiver Forschung ist die Pathogenese der coxsackieviralen Herzerkrankung bislang weitgehend unklar, und präventive oder spezifische therapeutische Maßnahmen sind nicht etabliert.

Ziel dieser Arbeit war es, CAR, den primären Bindungspartner der Coxsackieviren auf Herzmuskelzellen, bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie im Vergleich zu gesunden Probanden zu charakterisieren. Dabei sollten Unterschiede in Gensequenz und Expressionsgrad betrachtet werden. Weiterhin war beabsichtigt, durch Untersuchungen im Zellkultur-

Modell Aufschluss über die Rezeptorexpression beeinflussende Faktoren zu gewinnen.

### **5.1 Untersuchungen zur CAR-Expression im humanen Myokard**

Die Expression des CAR-Gens, sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene, wurde an endomyokardbioptisch gewonnenem Material von Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie und positivem Enterovirusbefund sowie an explantierten Herzen von Spendern mit normaler linksventrikulärer Funktion untersucht.

Zunächst sollten mögliche Transkriptionsunterschiede zwischen gesundem und DCM-Gewebe analysiert werden. Durch Untersuchungen mehrerer Arbeitsgruppen an verschiedenen Spezies ist bekannt, dass das Expressionsniveau des Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptors im gesamten Organismus nach Abschluss der Individualentwicklung deutlich absinkt [31, 102, 225, 252]. Neben Pankreas, Hoden und Prostata wird das Oberflächenmolekül beim gesunden adulten Menschen im Herzen am stärksten exprimiert [226]. Mit Hilfe einer semiquantitativen RT-PCR konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass bei einer enterovirusassoziierten dilatativen Kardiomyopathie die linksventrikulär nachweisbare Menge an CAR-mRNA im Vergleich zum gesunden Herzen signifikant erhöht ist. Die Quantifizierung der humanen CAR-mRNA erfolgte dabei relativ zur GAPDH-Konzentration der Proben. Bei der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) handelt es sich um ein Haushaltsgen, welches bereits in verschiedenen Expressionsstudien am Herzen als Referenz eingesetzt worden ist, da es eine sehr konstante Syntheserate im Myokard aufweist [101, 219]. Um die Vergleichbarkeit der CAR-Expression zwischen den Proben sicherzustellen, wurden zunächst die zugehörigen GAPDH-Spiegel analysiert. Mit Hilfe eines Kompetitorfragments bekannter Konzentration ließ sich der Gehalt an GAPDH-mRNA ermitteln; da keine signifikanten Schwankungen in den DCM- und Kontrollproben auftraten ( $p < 0,001$ ), konnten anschließend beide Gruppen miteinander verglichen werden. Es wurde eine gegenüber den Spenderproben im Mittel um den Faktor 4,9 erhöhte CAR-Expression im DCM-Myokard nachgewiesen.

Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen, deren Ergebnisse vor Abschluss dieser Arbeit veröffentlicht wurden, bestätigen diese Tendenz. So zeigte Sasse *et al.* mittels quantitativer PCR eine bei DCM-Proben um den Faktor 34 erhöhte Rezeptorexpression [196], Noutsias und Mitarbeiter wiesen durch Immunhistochemie in explantierten Herzen von DCM-Patienten einen ca. 12fachen Anstieg der CAR-Proteinmenge im Vergleich zu Spenderherzen nach [160]. Die Abweichungen in den absoluten Zahlen zwischen den hier vorgestellten Ergebnissen und den Literaturquellen können verschiedene Ursachen haben. Zum einen stellt die in dieser Arbeit angewandte Methode nur ein semiquantitatives Verfahren dar. Es kann – im Gegensatz zur quantitativen PCR – nicht genau ermittelt werden, wann die Polymerasekettenreaktion in ihre Sättigungsphase eintritt und ab wann sich die Zahl der Moleküle pro Zyklus nicht mehr exakt verdoppelt. Dadurch ist eine präzise Erfassung der Expressionsstärken nicht möglich. Außerdem erfolgte die Analyse der PCR-Produkte, anders als bei einer qPCR, in einem separaten Schritt, der Gelelektrophorese. In der videodensitometrischen Auswertung der (zahlreichen) Agarosegele liegt eine weitere mögliche Fehlerquelle. Die Differenz zu den von Noutsias *et al.* auf Proteinebene ermittelten Werten kann sowohl in den bereits aufgeführten Aspekten begründet sein (wobei die kamera- und softwaregestützte Auswertung von Gewebeschnitten ebenfalls keine exakte Quantifizierung darstellt), als auch auf posttranskriptionelle Regulationsmechanismen zurückgeführt werden. Zum einen gilt die Kontrolle des Abbaus von mRNA als wichtiger Mechanismus für die Expressionsregulation vieler eukaryotischer Gene. Sie bietet Zellen die Möglichkeit, den mRNA-Spiegel eines Gens unabhängig von dessen Transkriptionsrate nachhaltig zu beeinflussen und ist gerade für die Regulation induzierbarer Gene mit einer oft kurzen Halbwertszeit von weitreichender physiologischer Bedeutung [3, 176]. Zum anderen stellt auch die Translationskontrolle einen bedeutsamen Schalter auf dem Weg von der mRNA zum Protein dar. Zusätzlich können die Halbwertszeit des synthetisierten Eiweißes und dessen Transport zum Zielort (in diesem Fall die Zellmembran) gesteuert werden. Aufgrund dieser vielfältigen, der Transkription nachgeschalteten Regulationsmechanismen ist von einer

exakten Übereinstimmung der Expressionswerte auf mRNA- und Proteinebene nicht auszugehen.

Da – wie in verschiedenen Veröffentlichungen beschrieben [151, 225] – die CAR-Expression innerhalb eines Organs auf bestimmte Zelltypen beschränkt sein kann, muss auch mit einer Abhängigkeit der nachweisbaren Rezeptor-Expression (auf mRNA- und Proteinebene) vom Stadium der Krankheit ausgegangen werden. Myokardgewebeproben bestehen u. a. aus Myokard-, Endothel- und Bindegewebszellen sowie Monozyten. Während der Progression einer dilatativen Kardiomyopathie kommt es zum Verlust von Myozyten und zu einer Fibrosierung des Herzmuskels. Außerdem ist mit einem Anstieg der Zahl mononukleärer Zellen zu rechnen [126]. Insgesamt findet eine Verschiebung im Zellspektrum statt – möglicherweise mit einem Einfluss auf die Zahl CAR-exprimierender Zellen oder zumindest (zelltypabhängig) auf die Stärke der CAR-Synthese. Da sich die Angaben zum Erkrankungsgrad der Patienten, denen die untersuchten Herzen im Zuge einer Transplantation entnommen wurden, auf das NYHA-Schema (s. 2.1, Tab. 1), also eine Einteilung nach Symptomen beziehen, und eine genaue histologische Charakterisierung nicht vorliegt, können die Ergebnisse verschiedener Gruppen zwar hinsichtlich ihrer Tendenzen, aber nicht nach ihren Absolut-Werten miteinander verglichen werden.

Unter Beachtung der genannten Faktoren lässt sich das Ergebnis einer auf mRNA-Ebene nachweisbaren gesteigerten CAR-Expression im DCM-Herzen mit bereits publizierten Daten in Einklang bringen. Außerdem unterstützt es die Beobachtung verschiedener Arbeitsgruppen, dass eine Herzinsuffizienz, z. B. im Zuge einer dilatativen Kardiomyopathie, zur Reaktivierung embryonaler Genexpressionsmuster führt [44, 160].

Zur besseren statistischen Absicherung wäre eine höhere Probenzahl – sowohl bei DCM- als auch bei Spenderherzen – wünschenswert gewesen, diese war aber aufgrund der relativ geringen Zahl an Herztransplantationen am Universitätsklinikum nicht erreichbar. Außerdem hätten – unter Einbeziehung Enterovirus-negativer DCM-Proben als weiterer Kontrolle – die gewonnenen (semiquantitativen) Resultate a) mit einer quantitativen RT-PCR und b) möglichst noch auf Proteinebene, z. B. durch Western Blots,

verifiziert werden sollen. Durch einen technischen Defekt kam es leider zur Zerstörung der Gewebebank, so dass die Proben für weitere Analysen nicht mehr zur Verfügung standen.

Die immunhistochemischen Untersuchungen wurden an acetontfixierten Schnitten der Spender- und DCM-Gewebeproben durchgeführt. Durch die Bindung eines Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpers an den CAR-spezifischen Primärantikörper und die anschließende Umsetzung des Peroxidase-Substrats 3-Amino-9-Ethylcarbazol bildete sich ein unlöslicher roter Niederschlag in Geweberegionen, in denen der Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptor an der Zelloberfläche exprimiert war. Es schloss sich eine lichtmikroskopische Auswertung an, die auftretenden Unterschiede wurden semiquantitativ bestimmt. Dabei war im DCM-Myokard eine deutlich stärkere Expression von CAR im Vergleich zum gesunden Spendergewebe zu beobachten. Während in Letzterem nur eine leichte Rotfärbung auftrat, zeigte sich bei DCM-Proben ein starker Niederschlag, der sich auf die Zell-Zell-Kontaktareale konzentrierte. Diese Beobachtung stimmt mit den bereits zitierten Resultaten von Noutsias *et al.* überein, die immunhistochemisch eine ca. 12fach gesteigerte Rezeptorbildung im Myokard von Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie – verglichen mit dem Gewebe von Patienten mit anderen Herzerkrankungen oder von Spendern – nachwiesen. Somit scheint die verstärkte CAR-Expression ein typisches Merkmal der DCM darzustellen und sie gegen weitere krankhafte Veränderungen des Herzens, wie die koronare Herzkrankheit oder die hypertrophische Kardiomyopathie, abzugrenzen [160]. Die Konzentrierung des roten Niederschlags auf Orte des Zell-Zell-Kontakts (Sarkolemma bzw. *Disci intercalati*) spiegelt die physiologische Lokalisierung des Rezeptor-Proteins, dem eine Vermittlerrolle bei der Gewebekonstruktion zugeschrieben wird, wider [37, 179] und ist ein weiteres Indiz für die These, dass es im Zuge einer DCM zur Reaktivierung embryonaler Genexpressionsmuster kommt.

## **5.2 Untersuchungen zur CAR-Expression in murinen Geweben**

Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass CVB3-infizierte Mäuse nach einer akuten, entzündlichen Phase ein Krankheitsbild entwickeln, welches mit Vernarbungen im Myokard ohne nachweisbare Inflammation und mit der Erweiterung beider Ventrikel einer humanen dilatativen Kardiomyopathie entspricht. Das Mausmodell stellt somit ein wichtiges Werkzeug auf dem Weg zu einem besseren Verständnis der Vorgänge innerhalb der Pathogenese einer (viral induzierten) DCM dar.

In dieser Arbeit sollte die CAR-Expression in verschiedenen Organen CVB3-infizierter Mäuse mit der nicht-infizierter Tiere verglichen und letztendlich jener im Myokard von DCM-Patienten gegenübergestellt werden. Hierfür wurde zunächst aus Herz, Milz und Pankreas infizierter und nicht-infizierter BALB/c-Mäuse isolierte RNA in cDNA umgeschrieben und in einer PCR mit mCAR-spezifischen Primern amplifiziert. Es schloss sich eine densitometrische Auswertung im Agarosegel an; Banden einer parallel durchgeführten  $\mu$ - $\beta$ -Aktin-PCR (Haushaltsgen) dienten der Normalisierung der Proben. Es zeigte sich eine gegenüber den Kontrollmäusen signifikante Erhöhung des CAR-Transkriptionsniveaus um den Faktor 2,3 im Herzen infizierter Tiere; der Einfluss der CVB3-Inokulation auf Pankreas und Milz war weniger deutlich und nicht signifikant.

Bei neugeborenen Mäusen und Ratten finden sich die höchsten Transkriptionsraten des CAR-Gens in Gehirn, Herz und Skelettmuskel. Innerhalb weniger Wochen nach der Geburt sinkt die Rezeptorexpression im gesamten Organismus schrittweise ab; da dieser Rückgang in den verschiedenen Geweben jedoch unterschiedlich stark ausgeprägt ist, kommt es zu einer Verschiebung im Expressionsspektrum – die höchsten CAR-Level lassen sich bei der adulten Maus in Leber, Herz, Lunge und Niere nachweisen [15]. Entsprechende Unterschiede in den Rezeptorgen-Transkriptionsraten zwischen den untersuchten Organen der nicht infizierten Kontrolltiere ließen sich mit dem hier angewendeten Verfahren nicht nachweisen. Da sich die basale (physiologische) CAR-Expression erwachsener Mäuse auf einem sehr niedrigen Niveau bewegt, war die

semiquantitative RT-PCR für das Aufzeigen von Abweichungen nicht sensitiv genug.

Durch die Infektion von Mäusen mit dem Coxsackievirus B3 kam es zu einer gesteigerten Transkription des CAR-Gens. Dabei ist nicht klar, ob die erhöhte Rezeptorexpression einen primären, direkten Effekt der Erreger darstellt (positive Rückkopplung auf zellulärer Ebene) oder ob hierbei sekundäre Einflüsse des Immunsystems eine Rolle spielen. Untersuchungen von Ito und Mitarbeitern an Ratten, welche im Zuge einer durch autoimmunologische Prozesse induzierten Myokarditis – also ohne das Vorhandensein eines infektiösen Agens – eine deutlich gesteigerte CAR-Expression sowohl auf RNA-Ebene (densitometrische Auswertung von Agarosegelen nach RT-PCR) als auch auf Proteinebene ( $\alpha$ -CAR-Immunhistochemie) aufwiesen, legen eine immunologische Beeinflussung der Rezeptorbildung nahe. Dafür sprechen ebenfalls der vorher beobachtete Anstieg der Spiegel proinflammatorischer Zytokine, wie z. B. IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$ , sowie eine gesteigerte CAR-Immunreaktivität auch in nicht durch Läsionen gekennzeichneten, intakten Regionen des Myokards [102]. Um den Einfluss der CVB3-Infektion auf die CAR-Expression ohne immunologische Effekte und die Rolle von Zytokinen untersuchen zu können, sind Experimente im Zellkultur-Modell erforderlich; diese wurden durchgeführt und sollen später diskutiert werden. Interessanterweise war in den Experimenten von Ito *et al.* die nachweisbare Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptor-Menge in der akuten Phase (um den 33. Tag) der Myokarditis am höchsten, in der sich anschließenden chronischen Phase sank sie hingegen wieder ab. Die experimentelle Autoimmun-Myokarditis der Ratte gilt als Tiermodell der humanen Riesenzell-Myokarditis, welche in eine dilatative Kardiomyopathie mündet. Da es im Zuge einer humanen DCM – wie oben bereits diskutiert – jedoch zu einer Steigerung der CAR-Expression kommt, lassen sich die Ergebnisse aus dem Tiermodell offensichtlich nicht ohne weiteres direkt übertragen. Möglicherweise spielen hierbei Faktoren wie speziesspezifische basale Transkriptionsraten, die oft heterogenen (bzw. unklaren) Ursachen einer humanen DCM oder auch der Grad der

Fibrosierung und damit der zellulären Zusammensetzung des Myokards im Anschluss an die akute Phase der Erkrankung eine Rolle.

Wie bereits beschrieben, wird der Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptor bei adulten Mäusen neben dem Herzen auch in Leber, Lunge und Niere relativ stark exprimiert [15]. Die im Pankreas nachweisbare CAR-Proteinmenge ist dagegen gering. Trotzdem stellt die Bauchspeicheldrüse nach der Aufnahme der Viren über den Respirations- bzw. Gastrointestinaltrakt und die Ausbreitung der Erreger über das Blut einen wichtigen Replikationsort für Coxsackieviren dar, während Schäden an Lunge oder Niere im Zuge einer CVB-Infektion normalerweise nicht beobachtet werden. Der Gewebetropismus der Viren kann also nicht ausschließlich in der Expression des Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptors begründet sein. Weiteren Parametern wie dem Vorhandensein von Co-Rezeptoren (z. B. DAF), der Zugänglichkeit des Zielgewebes (z. B. Schutz von Epithelien durch Schleimschichten), der Aktivität von Mediatoren des Immunsystems sowie der Lokalisierung der CAR-Moleküle auf der Zelloberfläche und damit der Erreichbarkeit für die Viren kommt wohl eine ebenso große Bedeutung zu. So zeigte Wessely an transgenen Mäusen, dass das Fehlen des Typ I-Interferon-Rezeptors (für Interferon- $\alpha$ , - $\beta$  und - $\omega$ ) den Gewebetropismus von CVB3 stark beeinflusste und zu einem dramatischen Anstieg der Viruslast in der Leber führte [241]. Er zog daraus den Schluss, dass Typ I-Interferone für die Kontrolle der CVB3-Replikation in verschiedenen Geweben eine unterschiedliche Bedeutung haben und dass die Stärke der viralen Infektion einzelner Organe durch das Immunsystem bestimmt werden kann. Kashimura und Kollegen untersuchten bei Ratten die Verteilung der CAR-Moleküle auf der Kardiomyozytenoberfläche in Abhängigkeit vom Alter der Tiere. Sie wiesen nach, dass es nach einer anfänglich ausgeprägten Streuung über große Teile der Zelloberfläche mit zunehmender Polarisierung der Herzmuskelzellen innerhalb weniger Monate zu einer Konzentrierung von CAR in den *Disci intercalati* kam [112]. Somit veränderte sich in einer relativ kurzen Phase der postnatalen Ontogenese die Erreichbarkeit der Bindungsstellen für Coxsackieviren grundlegend. Wie verschiedene Gruppen mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Antikörpern beobachteten, treten Unterschiede in der

CAR-Lokalisierung jedoch nicht nur altersabhängig im Herzen auf, sondern sind auch im Vergleich zwischen verschiedenen Organen nachzuweisen. In polarisierten Epithelzellen – z. B. des Gastrointestinaltrakts oder der Leber – wird CAR hauptsächlich an der basolateralen Seite der „tight junctions“ exprimiert; Zellen des Prostata-Epithels dagegen zeichnen sich durch Rezeptormoleküle an der apikalen, dem Lumen zugewandten Zellmembran aus [37, 184]. Bei der Regenerierung von Geweben treten zudem partiell differenzierte, noch nicht (vollständig) polarisierte Epithelzellen auf, deren CAR-Verteilung sich von jener gereifter Zellen unterscheidet – in Organen mit einer hohen Neubildungsrate kann dieses Phänomen die Menge der frei erreichbaren Virus-Rezeptoren nachhaltig beeinflussen.

Die Rolle des DAF bei der Infektion durch Coxsackieviren ist noch nicht abschließend geklärt. Verschiedene Untersuchungen deuten darauf hin, dass das Molekül in polarisierten Zellen die Lokalisierung von CAR in den „tight junctions“ und damit die Unzugänglichkeit für die Erreger kompensieren kann, indem es einen ersten Bindungspartner darstellt und die Viren auf der Zelloberfläche anreichert. Dabei kommt es – im Gegensatz zur Interaktion von CVB mit CAR – nicht zu Konformationsänderungen im viralen Kapsid (A-Partikel-Formierung). Anschließend scheint ein Übergang der Viren von DAF auf CAR stattzufinden – der genaue Mechanismus ist bislang unklar. Möglicherweise wird durch die Interaktion zwischen den Erregern und DAF eine Signalkaskade aktiviert, die entweder die Expression des Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptors auf der Zelloberfläche beeinflusst oder aber die Integrität der „tight junctions“ herabsetzt und somit CAR-Moleküle als CVB-Interaktionspartner freilegt [82]. Diskutiert wird auch das Modell einer DAF-getriggerten Transcytose der Viren zur basolateralen Zellmembran [207]. Der „decay accelerating factor“ wird bei der Maus in den meisten Geweben exprimiert, besonders stark in Testis und Lunge [215]. Es existieren zwei Formen des Moleküls – eine GPI-verankerte Variante und eine, die durch eine konventionelle Transmembran-Domäne (TM) in die Zelloberfläche eingebunden ist. Die Expression der TM-Form scheint sich fast ausschließlich auf Testis und Milz zu beschränken. Im Gegensatz zum Menschen entstehen die zwei Varianten des Proteins in erster Linie nicht durch alternatives Spleißen (obwohl auch dieses möglich ist), sondern

werden durch verschiedene Gene kodiert – wahrscheinlich sind diese auf eine Genduplikation zurückzuführen [83]. Ob die beiden DAF-Formen bei einer CVB-Infektion im Zusammenspiel mit CAR unterschiedlich reagieren und welche Mechanismen die Expression der Moleküle steuern, muss in Zukunft noch genau untersucht werden. So wäre es beispielsweise denkbar, die Infizierbarkeit von polarisierten Zellen durch Coxsackieviren über eine gezielte Überexpression der normalerweise unterrepräsentierten TM-Form von DAF zu beeinflussen.

Um die per semiquantitativer PCR gewonnenen Ergebnisse zu verifizieren, wurden BALB/c- und C57BL/6-Mäuse mit CVB3 infiziert und nach drei Tagen getötet. Es schlossen sich die reverse Transkription der aus den Herzen gewonnenen RNA und eine Real-time PCR an. Die in den vorangegangenen Experimenten beobachtete Steigerung der CAR-Expression in Folge einer CVB3-Infektion konnte dabei bestätigt werden, die infizierten BALB/c-Mäuse zeigten gegenüber den nicht-inokkulierten Kontrolltieren eine um den Faktor 2,1 verstärkte Rezeptorbildung (semiquantitativ: 2,3). Bei den C57BL/6-Mäusen wirkte sich die Virusgabe weniger deutlich aus – die Synthese von CAR-mRNA erhöhte sich nur um den Faktor 1,2.

Mehrere Arbeitsgruppen haben die Symptome und Folgen einer Coxsackievirus-Infektion in unterschiedlichen Maus-Stämmen untersucht. Dabei zeigten C57BL/6- und CBA-Tiere nur eine leichte Myokarditis und geringe kardiale Läsionen, während – bei gleichen Virustitern im Herz – BALB/c- und DAB/2-Mäuse schwere Myokarditiden mit entzündlichen Infiltraten und ausgedehnten Nekrosen entwickelten [99, 135]. Als eine Ursache für diese differierenden Krankheitsbilder und -verläufe werden verschiedene MHC-H2-Haplotypen aufgeführt (BALB/c: H2d, C57BL/6: H2b). Da jedoch auch Mausstämme mit identischem H2-Allel in der Ausprägung der Myokarditis variieren, müssen weitere Faktoren an der Kontrolle der CVB-Infektion beteiligt sein [250]. Untersuchungen von Huber und Lodge *et al.* deckten Unterschiede in der Immunantwort mehrerer Mauslinien auf. So zeichnen bei BALB/c-Mäusen vor allem Mechanismen der zellulären Immunität (CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Zellen) für die kardialen Schäden verantwortlich, während in anderen Stämmen (z. B. DBA/2) die

Folgen der humoralen (CD4<sup>+</sup>-vermittelten) Immunantwort überwiegen. Außerdem differieren die Mauslinien zusätzlich in den Subpopulationen aktivierter T-Zellen. Die in C57BL/6-Tieren aktivierten V $\gamma$ 1<sup>+</sup>-T-Zellen scheinen über eine Beeinflussung der TH<sub>2</sub>-Antwort die Ausbildung einer Myokarditis zu unterdrücken, während V $\gamma$ 4<sup>+</sup>-T-Zellen in BALB/c-Mäusen über eine Induktion der TH<sub>1</sub>-Mechanismen und die Aktivierung autoimmuner CD8<sup>+</sup> zytotoxischer T-Zellen die Herzmuskelentzündung verstärken [98, 135]. Auch beim Immunglobulin-Subtyp, der im Anschluss an die Infektion die Viruselimination vorantreibt, treten Unterschiede auf – eine schnelle Beseitigung der Erreger wird durch die starke IgG-Antwort bei C57BL/6-Mäusen erreicht, während die dominierende IgM-Produktion bei BALB/c-Tieren eine deutlich geringere Eliminations-Effizienz bewirkt [131]. Insgesamt scheint dem Immunsystem für Mausstamm-spezifische Verläufe und Ausprägungen der CVB3-induzierten Myokarditis eine (vielleicht sogar die) entscheidende Bedeutung zuzukommen.

Auch die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse lassen sich mit den bekannten Auswirkungen einer CVB3-Infektion in den Mauslinien C57BL/6 und BALB/c nicht in Einklang bringen, wenn man die Folgen ausschließlich auf die Expression des Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptors zurückführt. So ist das CAR-Expressionsniveau sowohl vor als auch nach der Virusinfektion in C57BL/6-Mäusen absolut höher als die entsprechenden Konzentrationen in BALB/c-Tieren. Es müssen also weitere Faktoren – wie z. B. das Immunsystem oder Co-/Alternativ-Rezeptoren – eine nivellierende Rolle spielen. Die stärkere CAR-Induktion nach der Infektion in BALB/c-Mäusen könnte einerseits ein bloßes Symptom (abweichender) immunologischer und/oder regenerativer Vorgänge sein, andererseits aber auch einen direkten Einfluss auf den weiteren Infektionsverlauf haben und somit zu Unterschieden in der Myokarditis“anfälligkeit“ der untersuchten Mausstämme beitragen.

### **5.3 Sequenzuntersuchungen im humanen CAR-Gen**

In der vorliegenden Arbeit sollte durch Analyse der genomischen CAR-Sequenz von 30 DCM-Patienten und vier gesunden Probanden sowie über den Abgleich der Ergebnisse mit der NCBI-Gendatenbank untersucht

werden, ob Variationen in der Basenfolge des Rezeptor-Gens existieren, die die Virusempfindlichkeit bei DCM-Patienten spezifisch erhöhen und somit einen prädisponierenden Faktor für die Entstehung einer CVB3-induzierten DCM darstellen. Mutationen innerhalb der transkribierten Sequenz könnten zum einen dazu führen, dass die Interaktion zwischen dem Erreger und dem in seiner Proteinstruktur veränderten Rezeptor beeinflusst wird und die Virusaufnahme – durch eine stärkere anfängliche Bindung auf der Zelloberfläche – ansteigt. Andererseits wären auch Modifikationen vorstellbar, welche auf die Lokalisierung des Rezeptorproteins bzw. auf Dimerisierungs- oder Clusterbildungsvorgänge Einfluss ausüben. Große Bedeutung besitzen unter Umständen auch Mutationen in nicht transkribierten Abschnitten eines Gens. So stellt die Promotorregion einen sehr sensiblen Bereich dar, über den, bedingt durch Punktmutationen, die Überexpression der nachgeschalteten genetischen Information induziert werden kann. Eine gesteigerte Anzahl von Rezeptormolekülen in der Zellmembran würde die pro Zeiteinheit aufnehmbare Erregermenge erhöhen.

Bei der Suche nach Mutationen erfolgte die Auswahl der Primer so, dass neben der potentiellen Promoterregion und den sieben Exons auch die Exon-Intron-Grenzen, die für das korrekte Spleißen der mRNA von Bedeutung sind, untersucht werden konnten. In zwei von 30 DCM-Proben fand sich im Exon 4 eine C→A-Substitution (C555A), welche keinen Aminosäureaustausch bewirkte (Pro→Pro; stille Mutation). Da sich bei beiden Patienten gleichzeitig auch das Wildtyp-Allel nachweisen ließ, mussten die Träger für dieses Merkmal heterozygot sein. Im Exon 7 traten an zwei Loci Basensubstitutionen auf. Der Austausch A837G war bei drei DCM-Patienten und einer Kontrollprobe zu beobachten, es handelte sich ebenfalls um eine stille Mutation (Glu→Glu). Auch die A→G-Substitution an Position 846, welche bei einem DCM-Patienten nachzuweisen war, führte nicht zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz (Pro→Pro). Es ließen sich also weder in der Promotorregion noch innerhalb der proteincodierenden Sequenz des CAR-Gens DCM-spezifische Mutationen dokumentieren, die zu einer Modifikation des Rezeptorproteins führten. Allerdings können DNA-Mutationen ohne Einfluss auf die Struktur des gebildeten Proteins über

Sequenzvariationen der resultierenden mRNA auf die Genexpression einwirken. So ist es zum Beispiel denkbar, dass eine Modifikation der Sekundärstruktur die Transkription, die sich anschließende Prozessierung oder die Translation beeinflusst. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass eine Veränderung in synonymen Codons andere tRNAs an der Reaktion beteiligt, was sich auf die Effizienz der Translation auswirken könnte.

Da die Gruppen der untersuchten Personen (sowohl DCM-Patienten als auch Gesunde) nur wenige Mitglieder umfassten, lässt sich anhand der vorliegenden Ergebnisse eine statistisch abgesicherte Aussage über die Bedeutung von Mutationen des Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptors für die Wahrscheinlichkeit einer CVB3-Infektion und für den weiteren Verlauf der Erkrankung nicht treffen. Allerdings kommt eine andere Studie, die vor Beendigung der hier beschriebenen Untersuchungen veröffentlicht wurde und ein größeres Probandenkollektiv umfasste, ebenfalls zu dem Ergebnis, dass Veränderungen in der Basensequenz des CAR-Gens nicht als prädisponierende Faktoren für das Auftreten einer coxsackieviral bedingten DCM anzusehen sind. Bowles *et al.* sequenzierten die genomische DNA von 94 DCM- bzw. Myokarditispatienten, unter denen sich bei 24 eine virale Ätiologie nachweisen ließ. Es fanden sich Basensubstitutionen in den Exons 3, 5 und 7, die entweder stille Mutationen darstellten oder aber in den Introns mit großem Abstand zum Exonübergang lokalisiert waren. Diese Veränderungen traten sowohl bei den viruspositiven Patienten als auch bei Probanden ohne Virusnachweis sowie gesunden Kontrollpersonen auf, so dass es sich hierbei um Polymorphismen handeln musste. Die Autoren schlussfolgerten, dass – zumindest in dem von ihnen untersuchten Kollektiv – CAR-Mutationen, die die Virusanfälligkeit von Patienten erhöhen und somit einen prädisponierenden Faktor für eine viral induzierte DCM darstellen könnten, in Krankheitsentstehung und -verlauf keine wichtige Rolle spielten. Sie schlossen jedoch eine nachhaltige Beeinflussung der Pathogenese durch Sequenzvariationen in anderen Genen, die für die Aufnahme oder die Prozessierung der Virionen von Bedeutung sind, nicht aus [17]. So sind z. B. Mutationen von Transkriptionsfaktoren bekannt, durch welche die Expression anderer Proteine verstärkt wird (bspw. c-Myb,

AML1) [42]. Auch die wirtseigenen Bestandteile des viralen Replikationszyklus können genetisch determiniert in ihrer Aktivität gesteigert sein und so der Infektion und ihren Folgen Vorschub leisten. Bisher wurden jedoch entsprechende Befunde im Vergleich zwischen DCM-Patienten und gesunden Probanden nicht erbracht, so dass – wie von Bowles *et al.* formuliert – davon auszugehen ist, dass andere Faktoren bei der Entstehung einer dilatativen Kardiomyopathie dominieren.

Wahrscheinlicher als Mutationen in der Sequenz des Virusrezeptors sind – aufgrund der hohen Replikationsrate – Veränderungen im viralen Genom. Hierbei können zum einen Abschnitte direkt an der Bindung des Virus auf der Zelloberfläche beteiligter Proteine betroffen sein oder auch Bereiche, die für Bestandteile der viralen Vervielfältigungsmaschinerie codieren. Beides ist angesichts des erforderlichen engen Zusammenspiels mit zellulären Komponenten des Wirts jedoch nur in einem sehr begrenzten Rahmen möglich. Größere Variationsmöglichkeiten bieten Teile des Kapsids, die nicht an der Interaktion mit CAR oder anderen Strukturen der Zelloberfläche beteiligt sind. Hier könnten Mutationen z. B. dafür sorgen, dass die Abwehrmechanismen des Wirts effektiver unterlaufen werden können. Um diesen Phänomenen nachzugehen, wäre eine aufwändige Diagnostik erforderlich – in allen Fällen CVB3-assoziiertes Myokarditis oder DCM müsste der Erreger über seine RNA genau charakterisiert werden. Dies ist – aufgrund der eingeschränkten, nicht virusspezifischen Therapie-Optionen – im Moment unter wirtschaftlichen Gesichtspunkten kaum zu rechtfertigen. Die regelmäßige Untersuchung klinischer Isolate erscheint dagegen sinnvoll und geboten, da sie die Möglichkeit bietet, auf innerhalb der Population auftretende, wichtige Veränderungen im Geno- und Phänotyp der Viren aufmerksam zu werden und Zusammenhänge zur (eventuell gesteigerten) Pathogenität herzustellen.

#### **5.4 Untersuchungen im Zellmodell**

Um zur Aufklärung der Regulationsmechanismen, die bei der Expression des Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptors eine Rolle spielen, einen Beitrag zu leisten, sollten verschiedene potentielle Einflussfaktoren im Zellmodell untersucht werden. Hierfür wurden die humanen, CAR-exprimierenden

Zelllinien HeLa und 293 sowie – bei Bedarf an einer Negativkontrolle – die murine, CAR-defiziente Fibroblastenzelllinie L929 verwendet. Die Wahl fiel auf die genannten Zelltypen, da diese für Untersuchungen im Zusammenhang mit dem Virusrezeptor bereits beschrieben wurden und im Institut für Virologie und Antivirale Therapie etabliert waren. Der Einsatz von Kardiomyozyten – zum Beispiel aus Ratten isoliert (NRCM) – in den Experimenten hätte die Bedingungen im DCM-Herzen sicher besser widerspiegeln können, jedoch standen diese nicht zur Verfügung.

Als potentielle Faktoren mit einem Einfluss auf die CAR-Bildung wurden die virale Infektion selbst, die Zelldichte und verschiedene Zytokine analysiert.

Es ist bekannt, dass Viren nach der Infektion ihrer Zielzellen deren Genexpression und Stoffwechsel beeinflussen – zum einen, um die Replikation der eigenen genetischen Information, die Produktion weiterer Virusbestandteile und die Bildung neuer infektiöser Partikel zu ermöglichen. Zum anderen wird jedoch auch gezielt auf die Synthese von Proteinen eingewirkt, welche mit der Virusvermehrung nicht direkt in Zusammenhang stehen. So schalten beispielsweise das HSV und das HIV die Transkription bzw. Translation der MHC-Gene ab. CVB3 dagegen beeinflusst die MHC-Dichte auf der Zelloberfläche, indem die Protease 3A den Transport neuer Moleküle zur Zellmembran verhindert und die Protease 2B die Endozytose dort bereits vorhandener MHC-Moleküle beschleunigt [39]. Auf diese Weise wird eine Präsentation viraler Epitope auf der Zelloberfläche verhindert und die Initiierung der Immunantwort verzögert. Das Genom verschiedener Herpesviren codiert für antiapoptotische Faktoren, um den durch Immunzellen bzw. lösliche Faktoren getriggerten, gesteuerten Zelltod zu verhindern. Ebenfalls durch viruscodierte Eiweiße – z. B. von SIV (simian immunodeficiency virus) – kann die CD4-Konzentration auf der Oberfläche von T-Zellen reduziert und damit einer (Super-)Infektion mit HIV vorgebeugt werden [13]. Eine entsprechende Beeinflussung der Expression von CAR-Molekülen in der Zellmembran wurde als möglich angesehen, da verschiedene Arbeitsgruppen im Zuge einer Dilatativen Kardiomyopathie mit wahrscheinlich viraler Ursache eine Steigerung der nachweisbaren Rezeptormenge beschrieben [160, 196]. Eine CVB3-abhängige positive

Rückkopplung auf die CAR-Bildung ließ sich anhand der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit jedoch nicht zeigen. Die im Western Blot detektierbare Menge an Rezeptormolekülen fiel im Verlauf einer Enterovirus-Infektion kontinuierlich ab – dies wurde durch korrespondierende RNA-Werte bestätigt. Verantwortlich hierfür war die Blockierung zuerst der Translation und anschließend auch der Transkription wirtseigener genetischer Informationen (viraler „host cell shut-off“). Untermuert wird diese Interpretation der Daten durch die gleichzeitige Zunahme nachweisbaren VP2s, eines in der P1-Region der CVB3-RNA codierten Kapsidproteins. Dessen ansteigende Expression zeigt, dass das zelluläre Proteinsynthesystem durch die Infektion auf die Bildung neuer – für den Zusammenbau von Virionen erforderlicher – Komponenten umgestellt wurde. Eine spezifische Regulation des Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptors durch den Erreger selbst ließ sich somit nicht nachweisen.

Trotz fehlender CAR-Expression (auf mRNA- und Proteinebene) war eine geringe VP2-Synthese per Western Blot auch in L929-Zellen detektierbar. Diese Beobachtung korreliert sehr gut mit den veröffentlichten Daten anderer Arbeitsgruppen, welche in weiteren CAR-negativen Zellen [bspw. CHO] bzw. solchen mit durch Antikörpern blockierten Rezeptoren eine Infektion und die Replikation der Enteroviren registrierten. Offensichtlich nutzten die Erreger in diesen Fällen alternative Oberflächenmoleküle, um an die Zellen zu binden und die Zellmembran zu durchdringen [96, 170, 255]. In Frage kommen zum Beispiel der „decay accelerating factor“ (DAF, CD55) oder auch Heparansulfate. Da die Aufnahme der Viren über diese Moleküle im Vergleich zum CAR jedoch ineffektiver und langsamer erfolgt, spielen sie bei der Infektion CAR-positiver Zellen eine zu vernachlässigende Rolle.

Die Erfassung der Daten für CAR-mRNA bzw. -Protein und VP2 erfolgte nur bis zu einem Zeitpunkt von 6 h, da in dieser Zeit ein Replikationszyklus des Virus abgeschlossen war und aufgrund der hohen m.o.i. fast alle Zellen in der Kultur bei der Freisetzung neuer Virionen lysiert wurden. In einer Testreihe mit längeren Inkubationszeiten konnte im Vergleich zum 6 h-Wert keine weitere signifikante Veränderung beobachtet werden.

Der nächste untersuchte Faktor mit einem vermuteten Einfluss auf die CAR-Expression war die Dichte der Zellen in der Kultur. Da der Rezeptor als ein Bestandteil der „tight junctions“ und als Zelladhäsionsmolekül beschrieben worden ist, erschien eine Regulation seiner Konzentration in der Membran durch die Wechselwirkungen mit benachbarten Zellen wahrscheinlich [37, 160, 164]. Dass solch eine Interaktion die Expression von Genen beeinflussen kann, wurde bereits anhand verschiedener Proteine gezeigt. So wiesen Ruth Stephen und Mitarbeiter die Abhängigkeit des „Insulin-like growth factor receptor“-Levels (IGFR) in MCF7- (Humane Brustkrebs-) Zellen von deren Wachstumsdichte nach. Bei zunehmender Zellzahl sank die Menge in der Zellmembran nachweisbaren Rezeptor-Proteins [218]. Da es sich beim IGFR um den Bindungspartner eines wachstumsstimulierenden Moleküls handelt, ist eine derartige negative Regulation zur Kontrolle des Zellwachstums erforderlich. Ähnliche Ergebnisse in unterschiedlichen Zelllinien wurden z. B. auch für den „Epidermal growth factor receptor“ (EGFR), den „Platelet-derived growth factor receptor“ (PDGFR) und den „Tumor necrosis factor receptor“ (TNFR) publiziert [178, 190]. In all diesen Fällen kam es zur Kontaktinhibition der Rezeptorexpression. Auch für weiter „downstream“ in Signalkaskaden bedeutsame Faktoren ließen sich entsprechende Trends nachweisen – ein Hinweis darauf, dass möglicherweise ganze Signaltransduktionswege durch eine ansteigende Zelldichte in ihrer Aktivität herunterreguliert bzw. komplett gehemmt werden können. Der Kontakt zwischen Zellen vermag jedoch auch einen stimulierenden Einfluss auf die Expression von (Rezeptor-) Proteinen auszuüben. So konnten beispielsweise Yang *et al.* in Kulturen humaner Lungen-Fibroblasten bei ansteigender Zellzahl per ELISA eine Zunahme der Menge nachweisbarer Glukokortikoid-Rezeptor-Moleküle zeigen [253]. Der Bindungspartner für Angiotensin II (AT<sub>2</sub>R) weist in NIH-3T3-Zellen ebenfalls eine positive Regulation durch die Zelldichte auf [85].

Für die Untersuchungen zum Einfluss der Zelldichte auf die Expression des Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptors in dieser Arbeit wurden  $8 \times 10^5$  HeLa-Zellen pro Petrischale ausgesät und anschließend bei 37 °C inkubiert. Die Probennahme erfolgte – bis zum Erreichen der Konfluenz – aller 12 Stunden

( $t_{\max} = 96$  h). Erneut fand eine Quantifizierung sowohl der CAR-mRNA in einer Real-time PCR als auch des Rezeptorproteins per Western Blot statt. Es ließ sich auf beiden Ebenen ein positiver Einfluss der Zelldichte auf die Bildung des Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptors nachweisen. Die Menge an CAR-mRNA nahm bis 84 h nach Aussaat zu; mit der Konfluenz der Zellen erreichte die Transkription des Gens ein Plateau bzw. ging leicht zurück (nicht signifikant). Ein ähnlicher Trend war auch auf Proteinniveau zu beobachten, allerdings stieg die Zahl detektierbarer Rezeptormoleküle noch bis 96 h nach Versuchsbeginn an.

Diese Ergebnisse lassen sich sehr gut mit der Rolle von CAR als Zelladhäsionsmolekül in Einklang bringen. Mit zunehmender Zelldichte steigt auch die Zahl der Kontaktflächen zwischen einzelnen Zellen, dementsprechend müssen mehr verknüpfende Proteine exprimiert werden. Da sowohl bei den Untersuchungen auf RNA- als auch bei denen auf Proteinebene eine Normalisierung des eingesetzten Materials erfolgte (Einsatz einer bestimmten Menge Gesamt-RNA bzw. Gesamt-Proteins), kann ausgeschlossen werden, dass der gezeigte Anstieg lediglich eine absolute Zunahme aufgrund steigender Zellzahlen widerspiegelt. Die wachsende Zahl an CAR-Molekülen zwischen 84 h und 96 h bei gleichbleibender bzw. rückläufiger Transkription deutet darauf hin, dass Änderungen auf RNA-Ebene sich nicht sofort auf Proteinniveau auswirken. Außerdem dürfte diese Diskrepanz auch auf die unterschiedlichen Halbwertszeiten von RNAs und Proteinen zurückzuführen sein.

Ito *et al.* untersuchten die Expression von CAR in kultivierten neonatalen Rattenkardiomyozyten. Sie beobachteten, dass die auf Proteinebene nachweisbare Menge an Rezeptormolekülen unmittelbar nach Isolierung der Zellen niedriger war als vorher im intakten Herz. Mit zunehmender Zelldichte, Clusterbildung und beginnender Kontraktion der Herzmuskelzellen steigerte sich jedoch die per Western Blot detektierte CAR-Bildung. Ito stellte einen Zusammenhang zwischen dieser Zunahme und einer Rolle des Rezeptors als Zell-Zell-Kontakt- und Adhäsionsmolekül her [102].

Auch Kashimura und Mitarbeiter nutzten aus Ratten isolierte kardiale Myozyten als Modell. Sie wiesen mit Hilfe von Western Blots ebenfalls eine positive Korrelation zwischen der Zelldichte und der Anzahl der CAR-Moleküle in der Zellmembran nach [112].

In einer weiteren Publikation, die vor Abschluss der hier vorgestellten Experimente veröffentlicht wurde, beschrieb die Arbeitsgruppe um Henry Fechner konträre Ergebnisse [61]. So nahm die CAR-Expression neonataler Ratten-Kardiomyozyten in der Kultur bei zunehmender Zelldichte ab, dies ließ sich sowohl auf RNA-Ebene (mittels quantitativer PCR) als auch auf Proteinniveau (über die Aufnahme von Marker-Adenoviren) zeigen. Die Divergenz zwischen den hier präsentierten und den von Fechner erzielten Resultaten kann durch verschiedene Faktoren verursacht sein. Zum einen stimmen die untersuchten Modellsysteme nicht überein. Möglicherweise wird die Expression des Virus-Rezeptors in Kardiomyozyten anders reguliert als in Zervix(karzinom)zellen (HeLa). Aber auch speziesspezifische Expressionsunterschiede müssen in Betracht gezogen werden. Wie bereits weiter oben beschrieben, differieren die basalen CAR-Level einzelner Organe zwischen Mensch und Maus bzw. Ratte zum Teil sehr stark, sowohl bei neugeborenen als auch bei adulten Individuen. Veränderungen dieser basalen Expression durch exogene Faktoren können – wie unter 5.2 am Beispiel einer Autoimmun-Myokarditis ausgeführt – ebenfalls unterschiedlich ausgeprägt sein. Im Falle eines Myokardinfarkts weichen die beobachteten Erscheinungen in Menschen- und Rattenherz gleichfalls voneinander ab. Während es in Ersterem zu einem generalisierten Anstieg der CAR-Bildung kommt, ist dieser in Letzterem lokal (auf die Infarktzone) begrenzt. Somit sind Unterschiede möglicherweise auf die verschiedenen, für die Experimente eingesetzten Zelltypen zurückzuführen. Zum anderen kann auch das experimentelle Prozedere zu abweichenden Beobachtungen geführt haben. Während in dieser Arbeit eine bestimmte Anzahl von Zellen ausgesät wurde ( $8 \times 10^5$  Zellen pro 10-cm-Schale) und in regelmäßigen Abständen – bei ansteigender Zelldichte – Probennahmen erfolgten, säten Fechner *et al.* die neonatalen Kardiomyozyten unterschiedlich dicht aus ( $1 \times 10^5$  bis  $32 \times 10^5$  Zellen pro 3,5-cm-Schale) und ernteten sie nach 48 Stunden. In

den Proben mit der höchsten Initial-Zellzahl hatte sich zu diesem Zeitpunkt ein konfluenter Zellerasen gebildet. Wie Heemskerk und Mitarbeiter während ihrer Untersuchungen zur Expression des AT<sub>2</sub>-Rezeptors in Fibroblasten feststellten, ist die Dichte der Zellen zum Zeitpunkt der Aussaat von großer Bedeutung für die Rezeptorbildung bei Erreichen der Konfluenz. Je höher die Zellzahl zu Versuchsbeginn gewählt worden war, desto geringere AT<sub>2</sub>R-Level ließen sich im konfluenten Zellrasen nachweisen [85]. Ein ähnlicher Mechanismus könnte auch bei CAR und in Kardiomyozyten eine Rolle spielen und die Resultate – zumindest bei den sehr dicht ausgesäten Zellen – deutlich beeinflussen. Ein dritter Aspekt, der zu unterschiedlichen Ergebnissen beigetragen haben kann, sind die angewandten Untersuchungsmethoden. In dieser Arbeit wurde die Stärke der Genexpression auf RNA-Ebene per Real-time PCR gemessen, die Bestimmung der vorhandenen Rezeptormenge erfolgte per Western Blot (mit densitometrischer Auswertung). Fechner setzte zum einen die quantitative kompetitive PCR und zum anderen auf Protein-Niveau die Quantifizierung der von den Zellen aufgenommenen Adenoviren-Menge ein. Gerade bei letzter Methode muss jedoch in Betracht gezogen werden, dass die eigentliche Aufnahme der Erreger nicht über CAR, sondern über Integrine erfolgt – der Cocksackievirus-Adenovirus-Rezeptor stellt nur den ersten Bindungspartner dar. Da die Expression von Integrinen ebenfalls durch die Zelldichte beeinflusst werden kann [216], führt dieser Ansatz möglicherweise zu nicht ausschließlich CAR-abhängigen Ergebnissen. Zusätzlich könnte die – bei vereinzelt im Vergleich zu eng aneinanderliegenden Zellen – stärkere Exposition des Rezeptors gegenüber einem viralen Angriff eine stärkere Virusaufnahme trotz geringerer Rezeptorenzahl nach sich ziehen. Es wäre denkbar, dass in diesen methodischen Unterschieden auch die Abweichung zu den Beobachtungen von Ito *et al.* und Kashimura *et al.* begründet ist.

Um *In vivo*-Verhältnisse bestmöglich zu simulieren und der Frage nachzugehen, welchen Einfluss das Immunsystem auf die CAR-Expression ausübt, wurde zum Abschluss die Wirkung verschiedener Zytokine in der Zellkultur untersucht.

Zytokine sind kleine, lösliche Peptide oder Glykoproteine, die von Zellen gebildet werden und das Verhalten oder die Eigenschaften derselben oder anderer Zellen verändern. Sie wirken über ihre Interaktion mit spezifischen Rezeptoren, die aufgrund genetischer, struktureller und funktioneller Ähnlichkeiten in fünf Familien eingeteilt werden: die Typ I- und Typ II-Zytokinrezeptoren, die TNF-, die IL-1- und die Chemokin-Rezeptorfamilie. Die Aktivierung dieser Oberflächenmoleküle durch Zytokinbindung führt in vielen Fällen über den Jak-STAT-Signalweg zur Beeinflussung der Genexpression der entsprechenden Ziel-Zelle. Es können aber auch andere Signaltransduktionsketten sowie direkt zelluläre Enzyme (Apoptose) oder das Zytoskelett Ziel der Zytokinwirkung sein. [106].

In mehreren Arbeiten wurden für Patienten mit Herzinsuffizienz – z. B. bedingt durch eine dilatative bzw. hypertrophische Kardiomyopathie oder nach einem Myokardinfarkt – erhöhte Serumspiegel verschiedener Zytokine beschrieben. So wiesen beispielsweise Marriott *et al.* einen deutlichen Anstieg der IL-2- und IL-10-Expression in Folge einer DCM nach [144]. Über eine vergleichbare Zunahme der Synthese von INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha/\beta$ , IL-4 und IL-6 berichteten Matsumori und Sasayama *et al.* [148, 149, 195]. Diese Zytokine wurden zum Teil durch das Myokard infiltrierende Immunzellen freigesetzt, andererseits aber auch von Zellen gebildet, die zum Gewebeverband des Herzens gehörten (Endothelzellen, Fibroblasten). *In vitro* konnte die Induktion der Produktion von TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-10 und IFN- $\gamma$  durch Enteroviren gezeigt werden [88, 236].

Da die gesteigerte Expression von Adhäsionsmolekülen auf Zelloberflächen einerseits und die Lockerung von interzellulären Kontakten andererseits wichtige Voraussetzungen für das Einwandern zellulärer Mediatoren der Immunantwort darstellen, erschien eine Regulation des Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptors durch Zytokine möglich. In dieser Arbeit wurde die Wirkung sowohl immunregulatorischer als auch proinflammatorischer Moleküle untersucht. Um auch verzögert eintretende Reaktionen erfassen zu können, waren im Versuchsaufbau einer zwölfstündigen Zytokin-Vorinkubation unterzogene Kontrollen eingeschlossen. Die Konzentrationen der eingesetzten, rekombinanten Effektor-Moleküle entsprachen in der

Literatur beschriebenen Werten. Ein relevanter Einfluss auf die CAR-Expression ließ sich für keines der eingesetzten Zytokine nachweisen. Einzig die Inkubation mit Interferon- $\gamma$  führte zu einem Anstieg der Menge detektierbarer CAR-mRNA in CVB3-infizierten HeLa-Zellen im Vergleich zu nicht IFN-behandelten Zellen. Auf Proteinebene konnte dieser Effekt nicht verifiziert werden. Möglicherweise war – trotz der zwölfstündigen Vorinkubation – die Laufzeit des Experiments für eine signifikante Veränderung auf Translationsniveau zu gering. Für IFN- $\gamma$  ist bekannt, dass die Anwesenheit des Zytokins allein zur Induktion bestimmter zellulärer Reaktionen nicht ausreicht. So wird z. B. die dsRNA-regulierte Proteinkinase (PKR), die eine wichtige Rolle beim Eintreten von Zellen in den „antiviralen Zustand“ spielt, nur in Anwesenheit doppelsträngiger RNA aktiviert. Falls auch andere Zytokinwirkungen von der viralen Infektion als zusätzlichem Signal abhängig sind, könnte die Dauer der Versuche von 6 Stunden nach Viruszugabe zu gering gewesen sein – eine ausgedehntere Untersuchung war jedoch aufgrund der Replikationszeit der CVB3 und der in allen Experimenten eingesetzten m.o.i. nicht möglich.

Systematische Untersuchungen zur Abhängigkeit der CAR-Bildung von Zytokinen fanden bislang nicht statt. Brüning und Runnebaum verglichen die Rezeptorexpression in verschiedenen Zelllinien nach TNF- $\alpha$  und TGF- $\beta$ -Applikation und stellten – je nach Modellsystem – sowohl stimulierende als auch inhibierende Einflüsse fest. HeLa-Zellen wiesen nach TNF- $\alpha$ -Behandlung eine gesteigerte CAR-Expression auf, während TGF- $\beta$  keine Wirkung zeigte [22]. In einer weiteren Veröffentlichung wurde der Einfluss von TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  auf die Rezeptorbildung in Endothelzellen (HUVEC) untersucht. Die Zytokine bewirkten sowohl einzeln als auch in Kombination eine Reduktion der CAR-Synthese – detektierbar auf Transkriptions- und Translationsniveau [235]. Diese Beobachtung steht im Einklang mit der Notwendigkeit, bei entzündlichen Prozessen die Kontakte zwischen den Endothelzellen zu lockern, um das Einwandern von Immunzellen aus der Blutbahn in das Gewebe zu ermöglichen. Ebenfalls mit den beiden genannten Zytokinen inkubierte A549- (Lungenepithel-) Zellen zeigten eine konträre Reaktion, hier stieg die CAR-Expression an. Diese Ergebnisse

unterstreichen, dass die Reaktion auf immunologische Mediatoren zelltypspezifisch ist und dies bei der Wahl des Untersuchungssystems und hinsichtlich der Übertragbarkeit gewonnener Erkenntnisse beachtet werden muss.

Ausgehend von den in dieser Arbeit erzielten Resultaten kann eine wirksame Regulation der Expression des Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptors durch die betrachteten Zytokine – im Modellsystem HeLa-Zellen – ausgeschlossen werden. Um genauere Aussagen über die Auswirkung immunologischer Botenstoffe auf die CAR-Synthese im Herzen treffen zu können, sind – wie die oben zitierten Veröffentlichungen zeigen – weitere Untersuchungen in einem näher verwandten Zellkulturmodell (bspw. neonatale Rattenkardiomyozyten) erforderlich. So gewonnene Erkenntnisse könnten im Einsatz von Zytokinen möglicherweise neue therapeutische Optionen für die entero- oder adenoviral induzierte Herzschwäche eröffnen.

## 6 Zusammenfassung

Die Herzinsuffizienz ist das weltweit am schnellsten zunehmende Herzkreislaufleiden. Die 5-Jahres-Mortalitätsraten nach Diagnosestellung betragen 45 % bei weiblichen und 59 % bei männlichen Patienten, nahezu 40 % der Erkrankten versterben innerhalb eines Jahres nach der ersten Einweisung ins Krankenhaus. Bei ca. einem Drittel der Fälle von Herzinsuffizienz lässt sich diese auf eine Kardiomyopathie zurückführen. Die dilatative Kardiomyopathie nimmt hierbei aufgrund des schweren Verlaufs und der fehlenden Therapiemöglichkeiten eine prominente Stellung ein. Ungefähr 10–25 % der DCM-Fälle liegt eine Infektion mit Enteroviren, speziell mit Coxsackieviren vom Typ B(3), zugrunde. Der primäre Rezeptor für diese Erreger auf der Zelloberfläche ist der Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptor (CAR), ein 46-kDa-Protein aus der Immunglobulin-Superfamilie.

Ziel dieser Arbeit war es, den Rezeptor in verschiedenen Systemen genauer zu charakterisieren. So sollte untersucht werden, ob es innerhalb des Krankheitsgeschehens einer (enterovirus-assoziierten) dilatativen Kardiomyopathie (DCM) zu Veränderung in der CAR-Expression kommt. Ein Mausmodell stand zur Verfügung, um die Bedeutung der viralen Infektion auf die Rezeptorsynthese in verschiedenen Organen zu überprüfen. Die aus dem Blut von 30 DCM-Patienten und vier gesunden Probanden gewonnene genomische DNA diente der Beantwortung der Fragestellung, ob im CAR-Gen Mutationen existieren, die die Expression des Proteins, seine Lokalisierung oder seine Bindungseigenschaften beeinflussen, somit einen prädisponierenden Faktor für eine Coxsackievirus-Infektion darstellen und bei DCM-Patienten gehäuft auftreten. Schließlich wurden im Zellkulturmodell verschiedene Faktoren (virale Infektion, Zelldichte und chemische Botenstoffe) hinsichtlich ihrer Bedeutung für die CAR-Expression untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass das Krankheitsbild einer dilatativen Kardiomyopathie im Menschen mit einer gesteigerten Synthese und Zelloberflächenpräsenz von CAR einhergeht. Ob diese Zunahme eine direkte Folge der viralen Infektion und der damit einhergehenden degenerativen

Veränderungen im Myokard darstellt oder auf die Reaktivierung embryonaler Genexpressionsmuster im Zuge von „tissue remodelling“ zurückzuführen ist, muss weiter untersucht werden. Im Mausmodell führte die Infektion mit Coxsackieviren vom Typ B3 ebenfalls zu einem Anstieg der kardialen CAR-Expression. Diese Zunahme war jedoch schon drei Tage p. i. nachweisbar, als sich die Tiere in der Phase einer akuten Entzündung befanden. Da leider kein humanes Vergleichsmaterial aus einem ähnlich frühen Erkrankungsabschnitt zur Verfügung stand, kann keine Aussage zur Übertragbarkeit der Ergebnisse von der Maus auf den Menschen getroffen werden. Möglicherweise findet eine Induktion des CAR-Rezeptors auch im humanen Myokard nicht erst im Endstadium einer dilatativen Kardiomyopathie statt. Eine gesteigerte Rezeptorexpression nach CVB3-Infektion ließ sich auch für Milz und Pankreas zeigen, allerdings waren die Unterschiede zu nicht-infizierten Tieren in diesen Organen statistisch nicht signifikant. Die Sequenzierung der Exons und der Exon-Intron-Übergänge des CAR-Gens führte nicht zum Nachweis relevanter Mutationen. Auch in der potentiellen Promotor-Region konnten keine Sequenz-Veränderung dokumentiert werden. Eine Prädisposition gegenüber coxsackieviralen Infektionen durch Mutationen im CAR-Gen lässt sich – zumindest für das Kollektiv hier untersuchter DCM-Patienten – ausschließen. Die Verbesserung prognostischer Aussagen zum Verlauf myokardialer Erkrankungen unter CVB3-Beteiligung (z. B. einer fulminanten Myokarditis) durch routinemäßige DNA-Untersuchungen ist somit leider nicht möglich. Um Erkenntnisse zur Regulation der CAR-Expression zu gewinnen, wurden im Zellkulturmodell verschiedene potentielle Einflussfaktoren untersucht. Die bloße Infektion von Zellen mit CVB3 führte nicht zu einer spezifischen Reaktion – hier ließen sich lediglich Folgen des „host cell shut-off“-Effekts beobachten. Im Unterschied hierzu war die Rezeptorexpression positiv mit der Zelldichte korreliert, was mit einer Zunahme der interzellulären Kontakte bei steigender Zellzahl erklärt werden kann. Die Behandlung von CVB3-infizierten HeLa-Zellen mit verschiedenen Zytokinen führte nur im Fall von IFN- $\gamma$  zu einer signifikanten Reaktion in Form einer Transkriptionssteigerung. Auf Proteinebene war dieser Effekt jedoch nicht nachweisbar. Ausgehend von den in dieser Arbeit erzielten Resultaten kann eine wirksame

Regulation der Expression des Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptors durch die betrachteten Zytokine für das Modellsystem HeLa-Zellen ausgeschlossen werden. Um spezifische Aussagen zu Auswirkungen immunologischer Botenstoffe auf die CAR-Synthese im Herzen treffen zu können – auch im Hinblick auf therapeutische Optionen – sind weitere Untersuchungen in einem näher verwandten Zellmodell (bspw. neonatale Rattenkardiomyozyten) erforderlich.

## 7 Summary

Heart failure is the cardiovascular disease with fastest growing incidence and prevalence worldwide and a major public health problem. The 5-yr mortality after diagnosis is 45% in women and 59% in men; almost 40% of the patients die within 1 year after first hospitalization. In approximately 33% of cases heart failure is caused by cardiomyopathy. The dilated cardiomyopathy (DCM) assumes a special position due to poor prognosis and missing therapeutic options. In approximately 10–25% the disorder is presumed to be caused by CVB3. The primary receptor for this virus is the coxsackievirus-adenovirus receptor CAR.

The aim of this study was the more detailed characterization of the receptor. It should be investigated whether the expression of CAR is altered in DCM or not. Using a mouse model the influence of a viral infection on CAR synthesis in different organs was studied. To answer the question if there are any DCM associable mutations in the CAR gene, genomic DNA of 30 DCM patients was analyzed and compared to samples from 4 healthy donors. The influence of different factors, i.e. viral infection, cell density and chemokines on the CAR expression was investigated in a cell culture model.

Increase of synthesis and expression of CAR on the cell surface in DCM could be demonstrated. Whether this is due to degenerative alterations following the viral infection or due to reactivation of an embryonic gene expression pattern in the course of tissue remodelling has to be further elucidated. The inoculation of mice with CVB3 led to a similar rise in cardiac CAR expression. Since this rise occurred in the acute phase of inflammation 3 days p.i. (while DCM represents a chronic state) human material from a comparable state of disease progression should be investigated for receptor expression in further experiments. Perhaps the increase in CAR synthesis in the human myocardium occurs also before end stage DCM as previously assumed. The rise of CAR expression in spleen and pancreas of CVB3-infected mice was not significant compared to uninfected controls. DNA sequencing of the exons, the exon-intron boundaries and the potential promoter region did not reveal any mutations that could account for changes

in virus susceptibility or CAR function. The data suggest that among the studied cohort of patients mutations in CAR do not predispose to a CVB3 infection and do not play an important role in the pathogenesis of DCM. For a better understanding of CAR expression different potentially influencing factors were investigated in cell culture. The CVB3 infection of cells led to a decrease of detectable CAR, but this was due to the general host cell shut-off and no effect of a specific CAR regulation. In contrast, the receptor expression was positively correlated to the cell density. This might be traced back to the increasing number of cell-cell contacts. The treatment with IFN- $\gamma$  led to a rise in CAR gene transcription but there was no detectable effect on protein level. The other tested cytokines had no impact on CAR expression. In summary, there are no significant effects of the studied cytokines on CAR synthesis in the HeLa model system. To obtain more specific insights into the regulation of CAR expression in the heart by immunological messengers further investigation in a more closely related model system (e.g. neonatal rat cardiomyocytes) are required.

## 8 Literaturverzeichnis

1. **Aberle, I.N. and Ren, J.**, *Experimental Assessment of the Role of Acetaldehyde in Alcoholic Cardiomyopathy*. Biol Proced Online, 2003. **5**: p. 1-12.
2. **Actelion Pharmaceuticals Deutschland GmbH**, *NYHA-Klassifikation*. 2007, Freiburg. [http://www.actelion.de/uninet/www/www\\_ge\\_p.nsf/Content/NYHA+Klassifikation+Funktioneller+Status](http://www.actelion.de/uninet/www/www_ge_p.nsf/Content/NYHA+Klassifikation+Funktioneller+Status)
3. **Aharon, T. and Schneider, R.J.**, *Selective destabilization of short-lived mRNAs with the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor AU-rich 3' noncoding region is mediated by a cotranslational mechanism*. Mol Cell Biol, 1993. **13**(3): p. 1971-1980.
4. **Anggard, E.**, *Nitric oxide: mediator, murderer, and medicine*. Lancet, 1994. **343**(8907): p. 1199-1206.
5. **Ansari, A.A., et al.**, *Epitope mapping of the branched chain alpha-ketoacid dehydrogenase dihydrolipoyl transacylase (BCKD-E2) protein that reacts with sera from patients with idiopathic dilated cardiomyopathy*. J Immunol, 1994. **153**(10): p. 4754-4765.
6. **Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften**, *Herzinsuffizienz. Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Allgemeinmedizin und Familienmedizin*. 2006, Düsseldorf. <http://www.uni-duesseldorf.de/AWMF/11/053-014.htm>
7. **Arbustini, E., et al.**, *Mitochondrial DNA mutations and mitochondrial abnormalities in dilated cardiomyopathy*. Am J Pathol, 1998. **153**(5): p. 1501-1510.
8. **Asher, D.R., et al.**, *Coxsackievirus and adenovirus receptor is essential for cardiomyocyte development*. Genesis, 2005. **42**(2): p. 77-85.
9. **Badorff, C., et al.**, *Enteroviral protease 2A cleaves dystrophin: evidence of cytoskeletal disruption in an acquired cardiomyopathy*. Nat Med, 1999. **5**(3): p. 320-326.
10. **Baig, M.K., et al.**, *Familial dilated cardiomyopathy: cardiac abnormalities are common in asymptomatic relatives and may represent early disease*. J Am Coll Cardiol, 1998. **31**(1): p. 195-201.
11. **Banerjee, R., et al.**, *Interaction of poliovirus-encoded 2C/2BC polypeptides with the 3' terminus negative-strand cloverleaf requires an intact stem-loop b*. Virology, 2001. **280**(1): p. 41-51.
12. **Barbaro, G.**, *Cardiovascular manifestations of HIV infection*. Circulation, 2002. **106**(11): p. 1420-1425.
13. **Benson, R.E., et al.**, *Downregulation of cell-surface CD4 expression by simian immunodeficiency virus Nef prevents viral super infection*. J Exp Med, 1993. **177**(6): p. 1561-1566.
14. **Bergelson, J.M., et al.**, *Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5*. Science, 1997. **275**(5304): p. 1320-1323.
15. **Bergelson, J.M., et al.**, *The murine CAR homolog is a receptor for coxsackie B viruses and adenoviruses*. J Virol, 1998. **72**(1): p. 415-419.

16. **Bolanos, J.P., et al.**, Nitric oxide-mediated mitochondrial damage in the brain: mechanisms and implications for neurodegenerative diseases. *J Neurochem*, 1997. **68**(6): p. 2227-2240.
17. **Bowles, N.E., et al.**, Analysis of the coxsackievirus B-adenovirus receptor gene in patients with myocarditis or dilated cardiomyopathy. *Mol Genet Metab*, 2002. **77**(3): p. 257-259.
18. **Bradford, M.M.**, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976. **72**: p. 248-254.
19. **Brigden, W.**, Uncommon myocardial diseases: the non-coronary cardiomyopathies. *Lancet*, 1957. **273**(7008): p. 1243-1249.
20. **Brigden, W.**, Uncommon myocardial diseases; the non-coronary cardiomyopathies. *Lancet*, 1957. **273**(7007): p. 1179-1184.
21. **Broers, J.L., et al.**, Decreased mechanical stiffness in LMNA<sup>-/-</sup> cells is caused by defective nucleo-cytoskeletal integrity: implications for the development of laminopathies. *Hum Mol Genet*, 2004. **13**(21): p. 2567-2580.
22. **Bruning, A. and Runnebaum, I.B.**, CAR is a cell-cell adhesion protein in human cancer cells and is expressionally modulated by dexamethasone, TNFalpha, and TGFbeta. *Gene Ther*, 2003. **10**(3): p. 198-205.
23. **Brüning, A., et al.**, Coxsackie and adenovirus receptor promotes adenocarcinoma cell survival and is expressionally activated after transition from preneoplastic precursor lesions to invasive adenocarcinomas. *Clin Cancer Res*, 2005. **11**(12): p. 4316-4320.
24. **Burch, G.E. and De Pasquale, N.P.**, *Viral myocarditis*, in *Cardiomyopathies*. J.A. Churchill, Editor. 1964, London: Churchill.
25. **Buscarini, M., et al.**, Adenoviral receptor expression of normal bladder and transitional cell carcinoma of the bladder. *Urol Int*, 2007. **78**(2): p. 160-166.
26. **Caforio, A.L., et al.**, Identification of alpha- and beta-cardiac myosin heavy chain isoforms as major autoantigens in dilated cardiomyopathy. *Circulation*, 1992. **85**(5): p. 1734-1742.
27. **Carson, S.D.**, Receptor for the group B coxsackieviruses and adenoviruses: CAR. *Rev Med Virol*, 2001. **11**(4): p. 219-226.
28. **Chaisomchit, S., Tyrrell, D.L., and Chang, L.J.**, Development of replicative and nonreplicative hepatitis B virus vectors. *Gene Ther*, 1997. **4**(12): p. 1330-1340.
29. **Chang, A.N. and Potter, J.D.**, Sarcomeric protein mutations in dilated cardiomyopathy. *Heart Fail Rev*, 2005. **10**(3): p. 225-235.
30. **Chapman, N.M., et al.**, A group B coxsackievirus/poliovirus 5' nontranslated region chimera can act as an attenuated vaccine strain in mice. *J Virol*, 2000. **74**(9): p. 4047-4056.
31. **Chen, J.W., et al.**, Cardiomyocyte-specific deletion of the coxsackievirus and adenovirus receptor results in hyperplasia of the embryonic left ventricle and abnormalities of sinuatrial valves. *Circ Res*, 2006. **98**(7): p. 923-930.

32. **Chiale, P.A., et al.**, *Differential profile and biochemical effects of antiautonomic membrane receptor antibodies in ventricular arrhythmias and sinus node dysfunction.* *Circulation*, 2001. **103**(13): p. 1765-1771.
33. **Chung, S.K., et al.**, *Internalization and trafficking mechanisms of coxsackievirus B3 in HeLa cells.* *Virology*, 2005. **333**(1): p. 31-40.
34. **CLONTECH**, *PCR MIMIC™ Construction Kit User Manual.* CLONTECH Laboratories, Inc., 1996.
35. **Codd, M.B., et al.**, *Epidemiology of idiopathic dilated and hypertrophic cardiomyopathy. A population-based study in Olmsted County, Minnesota, 1975-1984.* *Circulation*, 1989. **80**(3): p. 564-572.
36. **Cohen, C.J., et al.**, *Multiple regions within the coxsackievirus and adenovirus receptor cytoplasmic domain are required for basolateral sorting.* *J Biol Chem*, 2001. **276**(27): p. 25392-25398.
37. **Cohen, C.J., et al.**, *The coxsackievirus and adenovirus receptor is a transmembrane component of the tight junction.* *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(26): p. 15191-15196.
38. **Cope, M.J., et al.**, *Conservation within the myosin motor domain: implications for structure and function.* *Structure*, 1996. **4**(8): p. 969-987.
39. **Cornell, C.T., et al.**, *Coxsackievirus B3 proteins directionally complement each other to downregulate surface major histocompatibility complex class I.* *J Virol*, 2007. **81**(13): p. 6785-6797.
40. **Cowie, M.R., et al.**, *The epidemiology of heart failure.* *Eur Heart J*, 1997. **18**(2): p. 208-225.
41. **Coyne, C.B. and Bergelson, J.M.**, *CAR: a virus receptor within the tight junction.* *Adv Drug Deliv Rev*, 2005. **57**(6): p. 869-882.
42. **Crans, H.N. and Sakamoto, K.M.**, *Transcription factors and translocations in lymphoid and myeloid leukemia.* *Leukemia*, 2001. **15**(3): p. 313-331.
43. **Cripe, T.P., et al.**, *Fiber knob modifications overcome low, heterogeneous expression of the coxsackievirus-adenovirus receptor that limits adenovirus gene transfer and oncolysis for human rhabdomyosarcoma cells.* *Cancer Res*, 2001. **61**(7): p. 2953-2960.
44. **Crone, S.A., et al.**, *ErbB2 is essential in the prevention of dilated cardiomyopathy.* *Nat Med*, 2002. **8**(5): p. 459-465.
45. **Currie, P.F. and Boon, N.A.**, *Immunopathogenesis of HIV-related heart muscle disease: current perspectives.* *Aids*, 2003. **17 Suppl 1**: p. S21-28.
46. **Czolbe, M.**, *Identifizierung differentiell exprimierter Gene im insuffizienten Herzen von Patienten mit idiopathischer dilatativer Kardiomyopathie mittels cDNA-Subtraktion.* 2001. Friedrich-Schiller-Universität Jena.
47. **D'Ambrosio, A., et al.**, *The fate of acute myocarditis between spontaneous improvement and evolution to dilated cardiomyopathy: a review.* *Heart*, 2001. **85**(5): p. 499-504.

48. **Dalakas, M.C., et al.**, *Desmin myopathy, a skeletal myopathy with cardiomyopathy caused by mutations in the desmin gene*. N Engl J Med, 2000. **342**(11): p. 770-780.
49. **Dalldorf, G. and Sickles, G.M.**, *An Unidentified, Filtrable Agent Isolated From the Feces of Children With Paralysis*. Science, 1948. **108**(2794): p. 61-62.
50. **Dec, G.W. and Fuster, V.**, *Idiopathic dilated cardiomyopathy*. N Engl J Med, 1994. **331**(23): p. 1564-1575.
51. **Dettmeyer, R., et al.**, *Myokarditis*. Rechtsmedizin, 2006. **16**: p. 138-142.
52. **Deutsches Herzzentrum Berlin**, *Schematische Darstellung der Kardiomyopathien*. 2000, Berlin. www.dhzb.de
53. **Diaz, R.A., Obasohan, A., and Oakley, C.M.**, *Prediction of outcome in dilated cardiomyopathy*. Br Heart J, 1987. **58**(4): p. 393-399.
54. **Domae, N., et al.**, *Cardiomyopathy and other chronic toxic effects induced in rabbits by doxorubicin and possible prevention by coenzyme Q10*. Cancer Treat Rep, 1981. **65**(1-2): p. 79-91.
55. **Dorner, A., et al.**, *Treatment of coxsackievirus-B3-infected BALB/c mice with the soluble coxsackie adenovirus receptor CAR4/7 aggravates cardiac injury*. J Mol Med, 2006. **84**(10): p. 842-851.
56. **Dörner, A., et al.**, *Alternatively spliced soluble coxsackie-adenovirus receptors inhibit coxsackievirus infection*. J Biol Chem, 2004. **279**(18): p. 18497-18503.
57. **Estes, M.L., et al.**, *Chloroquine neuromyotoxicity. Clinical and pathologic perspective*. Am J Med, 1987. **82**(3): p. 447-455.
58. **Fatkin, D. and Graham, R.M.**, *Molecular mechanisms of inherited cardiomyopathies*. Physiol Rev, 2002. **82**(4): p. 945-980.
59. **Fatkin, D., et al.**, *Missense mutations in the rod domain of the lamin A/C gene as causes of dilated cardiomyopathy and conduction-system disease*. N Engl J Med, 1999. **341**(23): p. 1715-1724.
60. **Fechner, H., et al.**, *Expression of coxsackie adenovirus receptor and alphav-integrin does not correlate with adenovector targeting in vivo indicating anatomical vector barriers*. Gene Ther, 1999. **6**(9): p. 1520-1535.
61. **Fechner, H., et al.**, *Induction of coxsackievirus-adenovirus-receptor expression during myocardial tissue formation and remodeling: identification of a cell-to-cell contact-dependent regulatory mechanism*. Circulation, 2003. **107**(6): p. 876-882.
62. **Feldman, A.M. and McNamara, D.**, *Myocarditis*. N Engl J Med, 2000. **343**(19): p. 1388-1398.
63. **Felix, S.B., et al.**, *Removal of cardiodepressant antibodies in dilated cardiomyopathy by immunoabsorption*. J Am Coll Cardiol, 2002. **39**(4): p. 646-652.
64. **Felker, G.M., et al.**, *Underlying causes and long-term survival in patients with initially unexplained cardiomyopathy*. N Engl J Med, 2000. **342**(15): p. 1077-1084.

65. **Figulla, H.R., et al.**, *Spontaneous hemodynamic improvement or stabilization and associated biopsy findings in patients with congestive cardiomyopathy*. *Circulation*, 1985. **71**(6): p. 1095-1104.
66. **Flint, S.J., et al.**, *Principles of Virology: Molecular Biology, Pathogenesis, and Control of Animal Viruses*. 2. Auflage. 2004, Washington, DC: ASM Press.
67. **Florea, N.R., Maglio, D., and Nicolau, D.P.**, *Pleconaril, a novel antipicornaviral agent*. *Pharmacotherapy*, 2003. **23**(3): p. 339-348.
68. **Francis, S.E., et al.**, *Interleukin-1 in myocardium and coronary arteries of patients with dilated cardiomyopathy*. *J Mol Cell Cardiol*, 1998. **30**(2): p. 215-223.
69. **Franz, W.M., et al.**, *X-linked dilated cardiomyopathy. Novel mutation of the dystrophin gene*. *Ann N Y Acad Sci*, 1995. **752**: p. 470-491.
70. **Frisancho-Kiss, S., et al.**, *Sex differences in coxsackievirus B3-induced myocarditis: IL-12Rbeta1 signaling and IFN-gamma increase inflammation in males independent from STAT4*. *Brain Res*, 2006. **1126**(1): p. 139-147.
71. **Frustaci, A., et al.**, *Immunosuppressive therapy for active lymphocytic myocarditis: virological and immunologic profile of responders versus nonresponders*. *Circulation*, 2003. **107**(6): p. 857-863.
72. **Fuster, V., et al.**, *The natural history of idiopathic dilated cardiomyopathy*. *Am J Cardiol*, 1981. **47**(3): p. 525-531.
73. **Gauntt, C.J., et al.**, *Properties of coxsackievirus B3 variants which are amyocarditic or myocarditic for mice*. *J Med Virol*, 1979. **3**(3): p. 207-220.
74. **Gerull, B., et al.**, *Mutations of TTN, encoding the giant muscle filament titin, cause familial dilated cardiomyopathy*. *Nat Genet*, 2002. **30**(2): p. 201-204.
75. **Ghali, J.K. and Shanes, J.G.**, *A review of dilated cardiomyopathy*. *Compr Ther*, 1987. **13**(8): p. 46-56.
76. **Goodwin, J.F.**, *Cardiac Function In Primary Myocardial Disorders. I*. *Br Med J*, 1964. **1**(5397): p. 1527-1533.
77. **Goodwin, J.F.**, *Cardiac Function In Primary Myocardial Disorders. II*. *Br Med J*, 1964. **1**(5398): p. 1595-1597.
78. **Goodwin, J.F.**, *Myocarditis as a possible cause of cardiomyopathy, in Myocarditis-Cardiomyopathy*. H. Just and H.P. Schuster, Herausg. 1983, Berlin: Springer-Verlag.
79. **Goodwin, J.F. and Oakley, C.M.**, *The cardiomyopathies*. *Br Heart J*, 1972. **34**(6): p. 545-552.
80. **Green, J., Casabonne, D., and Newton, R.**, *Coxsackie B virus serology and Type 1 diabetes mellitus: a systematic review of published case-control studies*. *Diabet Med*, 2004. **21**(6): p. 507-514.
81. **Grunig, E., et al.**, *Frequency and phenotypes of familial dilated cardiomyopathy*. *J Am Coll Cardiol*, 1998. **31**(1): p. 186-194.
82. **Hafenstein, S., et al.**, *Interaction of decay-accelerating factor with coxsackievirus B3*. *J Virol*, 2007. **81**(23): p. 12927-12935.

83. **Harris, C.L., Rushmere, N.K., and Morgan, B.P.**, *Molecular and functional analysis of mouse decay accelerating factor (CD55)*. *Biochem J*, 1999. **341 (Pt 3)**: p. 821-829.
84. **He, Y., et al.**, *Interaction of coxsackievirus B3 with the full length coxsackievirus-adenovirus receptor*. *Nat Struct Biol*, 2001. **8(10)**: p. 874-878.
85. **Heemskerk, F.M., et al.**, *Characterization of AT2 receptor expression in NIH 3T3 fibroblasts*. *Cell Mol Neurobiol*, 1999. **19(2)**: p. 277-288.
86. **Henke, A., et al.**, *The role of CD8+ T lymphocytes in coxsackievirus B3-induced myocarditis*. *J Virol*, 1995. **69(11)**: p. 6720-6728.
87. **Henke, A., et al.**, *Apoptosis in coxsackievirus B3-caused diseases: interaction between the capsid protein VP2 and the proapoptotic protein siva*. *J Virol*, 2000. **74(9)**: p. 4284-4290.
88. **Henke, A., et al.**, *Coxsackievirus B3-induced production of tumor necrosis factor-alpha, IL-1 beta, and IL-6 in human monocytes*. *J Immunol*, 1992. **148(7)**: p. 2270-2277.
89. **Henke, A., et al.**, *Protection of mice against lethal coxsackievirus B3 infection by using DNA immunization*. *J Virol*, 1998. **72(10)**: p. 8327-8331.
90. **Herzum, M., et al.**, *Coxsackievirus B3 infection leads to cell death of cardiac myocytes*. *J Mol Cell Cardiol*, 1994. **26(7)**: p. 907-913.
91. **Hjalmarson, A., Fu, M., and Mobini, R.**, *Who are the enemies? Inflammation and autoimmune mechanisms*. *Eur Heart J Suppl %R* 10.1016/S1520-765X(02)90087-8, 2002. **4(suppl\_G)**: p. G27-32.
92. **Hogle, J.M., Chow, M., and Filman, D.J.**, *Three-dimensional structure of poliovirus at 2.9 A resolution*. *Science*, 1985. **229(4720)**: p. 1358-1365.
93. **Honda, T., et al.**, *The coxsackievirus-adenovirus receptor protein as a cell adhesion molecule in the developing mouse brain*. *Brain Res Mol Brain Res*, 2000. **77(1)**: p. 19-28.
94. **Hosenpud, J.D., et al.**, *The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: eighteenth Official Report-2001*. *J Heart Lung Transplant*, 2001. **20(8)**: p. 805-815.
95. **Hoshijima, M.**, *Models of dilated cardiomyopathy in small animals and novel positive inotropic therapies*. *Ann N Y Acad Sci*, 2004. **1015**: p. 320-331.
96. **Hsu, K.H., et al.**, *A monoclonal antibody specific for the cellular receptor for the group B coxsackieviruses*. *J Virol*, 1988. **62(5)**: p. 1647-1652.
97. **Huber, S.A.**, *Autoimmunity in coxsackievirus B3 induced myocarditis*. *Autoimmunity*, 2006. **39(1)**: p. 55-61.
98. **Huber, S.A.**, *T cells in coxsackievirus-induced myocarditis*. *Viral Immunol*, 2004. **17(2)**: p. 152-164.
99. **Huber, S.A. and Lodge, P.A.**, *Coxsackievirus B-3 myocarditis. Identification of different pathogenic mechanisms in DBA/2 and Balb/c mice*. *Am J Pathol*, 1986. **122(2)**: p. 284-291.

100. **Huber, S.A. and Pfaeffle, B.**, *Differential Th1 and Th2 cell responses in male and female BALB/c mice infected with coxsackievirus group B type 3*. J Virol, 1994. **68**(8): p. 5126-5132.
101. **Ihl-Vahl, R., et al.**, *Regulation of beta-adrenergic receptors in acute myocardial ischemia: subtype-selective increase of mRNA specific for beta 1-adrenergic receptors*. J Mol Cell Cardiol, 1995. **27**(1): p. 437-452.
102. **Ito, M., et al.**, *Expression of coxsackievirus and adenovirus receptor in hearts of rats with experimental autoimmune myocarditis*. Circ Res, 2000. **86**(3): p. 275-280.
103. **Itoh-Satoh, M., et al.**, *Titin mutations as the molecular basis for dilated cardiomyopathy*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **291**(2): p. 385-393.
104. **Jahns, R., et al.**, *Direct evidence for a beta 1-adrenergic receptor-directed autoimmune attack as a cause of idiopathic dilated cardiomyopathy*. J Clin Invest, 2004. **113**(10): p. 1419-1429.
105. **Jahns, R., et al.**, *Autoantibodies activating human beta1-adrenergic receptors are associated with reduced cardiac function in chronic heart failure*. Circulation, 1999. **99**(5): p. 649-654.
106. **Janeway, C. and Travers, P.**, *Immunologie*. 2. Auflage. 1997, Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum Akademischer Verlag GmbH.
107. **Jang, S.K., et al.**, *Cap-independent translation of picornavirus RNAs: structure and function of the internal ribosomal entry site*. Enzyme, 1990. **44**(1-4): p. 292-309.
108. **Jin, O., et al.**, *Detection of enterovirus RNA in myocardial biopsies from patients with myocarditis and cardiomyopathy using gene amplification by polymerase chain reaction*. Circulation, 1990. **82**(1): p. 8-16.
109. **Journal of Gene Medicine**, *Gene Therapy Clinical Trials Worldwide*. 2008, Hoboken: John Wiley & Sons, Inc. <http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical/>
110. **Kallwellis-Opara, A., et al.**, *Autoimmunological features in inflammatory cardiomyopathy*. Clin Res Cardiol, 2007. **96**(7): p. 469-480.
111. **Kamisago, M., et al.**, *Mutations in sarcomere protein genes as a cause of dilated cardiomyopathy*. N Engl J Med, 2000. **343**(23): p. 1688-1696.
112. **Kashimura, T., et al.**, *Spatiotemporal changes of coxsackievirus and adenovirus receptor in rat hearts during postnatal development and in cultured cardiomyocytes of neonatal rat*. Virchows Arch, 2004. **444**(3): p. 283-292.
113. **Kawai, C.**, *From myocarditis to cardiomyopathy: mechanisms of inflammation and cell death: learning from the past for the future*. Circulation, 1999. **99**(8): p. 1091-1100.
114. **Keeling, P.J., et al.**, *Familial dilated cardiomyopathy in the United Kingdom*. Br Heart J, 1995. **73**(5): p. 417-421.

115. **Khatib, R., et al.**, *Age-dependent pathogenicity of group B coxsackieviruses in Swiss-Webster mice: infectivity for myocardium and pancreas.* J Infect Dis, 1980. **141**(3): p. 394-403.
116. **Kim, J.S., et al.**, *Enhancement of the adenoviral sensitivity of human ovarian cancer cells by transient expression of coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR).* Gynecol Oncol, 2002. **85**(2): p. 260-265.
117. **Kim, K.B., et al.**, *Potentiation of Fas- and TRAIL-mediated apoptosis by IFN-gamma in A549 lung epithelial cells: enhancement of caspase-8 expression through IFN-response element.* Cytokine, 2002. **20**(6): p. 283-288.
118. **Kim, K.S., et al.**, *The group B coxsackieviruses and myocarditis.* Rev Med Virol, 2001. **11**(6): p. 355-368.
119. **Klabunde, R.E.**, *Causes of Heart Failure.* 2006, Athens. [http://www.cvphysiology.com/Heart\\_Failure/HF002\\_heart\\_failure\\_causes.gif](http://www.cvphysiology.com/Heart_Failure/HF002_heart_failure_causes.gif)
120. **Klingel, K., 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. **89**(1): p. 314-318.
121. **Knowlton, K.U., et al.**, *A mutation in the puff region of VP2 attenuates the myocarditic phenotype of an infectious cDNA of the Woodruff variant of coxsackievirus B3.* J Virol, 1996. **70**(11): p. 7811-7818.
122. **Koide, M., et al.**, *Cytokine-induced expression of an inducible type of nitric oxide synthase gene in cultured vascular smooth muscle cells.* FEBS Lett, 1993. **318**(3): p. 213-217.
123. **Koike, S.**, *Immunological disorders in patients with dilated cardiomyopathy. With special reference to the production of interleukin-2 and the expression of interleukin-2 receptors in the patients' peripheral blood lymphocytes.* Jpn Heart J, 1989. **30**(6): p. 799-807.
124. **Konstadoulakis, M.M., et al.**, *Clinical significance of antibodies against tropomyosin, actin and myosin in patients with dilated cardiomyopathy.* J Clin Lab Immunol, 1993. **40**(2): p. 61-67.
125. **Kroncke, K.D., Fehsel, K., and Kolb-Bachofen, V.**, *Nitric oxide: cytotoxicity versus cytoprotection--how, why, when, and where?* Nitric Oxide, 1997. **1**(2): p. 107-120.
126. **Kuhl, U., et al.**, *Chronic inflammation in the myocardium of patients with clinically suspected dilated cardiomyopathy.* J Card Fail, 1994. **1**(1): p. 13-25.
127. **Kühl, U., et al.**, *Interferon-beta treatment eliminates cardiotropic viruses and improves left ventricular function in patients with myocardial persistence of viral genomes and left ventricular dysfunction.* Circulation, 2003. **107**(22): p. 2793-2798.
128. **Kuhn, H., et al.**, *[The etiology, course and prognosis of dilated cardiomyopathy].* Z Kardiol, 1982. **71**(8): p. 497-508.
129. **Laster, S.M., Wood, J.G., and Gooding, L.R.**, *Tumor necrosis factor can induce both apoptic and necrotic forms of cell lysis.* J Immunol, 1988. **141**(8): p. 2629-2634.

130. **Lehmann, M.H., et al.**, *Monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) gene expression in dilated cardiomyopathy*. Cytokine, 1998. **10**(10): p. 739-746.
131. **Leipner, C., et al.**, *Coxsackievirus B3-induced myocarditis: differences in the immune response of C57BL/6 and Balb/c mice*. Med Microbiol Immunol, 2004. **193**(2-3): p. 141-147.
132. **Levy, D., et al.**, *Long-term trends in the incidence of and survival with heart failure*. N Engl J Med, 2002. **347**(18): p. 1397-1402.
133. **Li, Y.Y., et al.**, *Point mutations in mitochondrial DNA of patients with dilated cardiomyopathy*. J Mol Cell Cardiol, 1997. **29**(10): p. 2699-2709.
134. **Liu, P.P. and Mason, J.W.**, *Advances in the understanding of myocarditis*. Circulation, 2001. **104**(9): p. 1076-1082.
135. **Lodge, P.A., et al.**, *Coxsackievirus B-3 myocarditis. Acute and chronic forms of the disease caused by different immunopathogenic mechanisms*. Am J Pathol, 1987. **128**(3): p. 455-463.
136. **Lonberg-Holm, K., Crowell, R.L., and Philipson, L.**, *Unrelated animal viruses share receptors*. Nature, 1976. **259**(5545): p. 679-681.
137. **Lough, J.**, *Cardiomyopathy produced by cigarette smoke. Ultrastructural observations in guinea pigs*. Arch Pathol Lab Med, 1978. **102**(7): p. 377-380.
138. **Magnusson, Y., et al.**, *Autoimmunity in idiopathic dilated cardiomyopathy. Characterization of antibodies against the beta 1-adrenoceptor with positive chronotropic effect*. Circulation, 1994. **89**(6): p. 2760-2767.
139. **Maisch, B., et al.**, *[Dilated cardiomyopathy and myocarditis. Current diagnostic requirements and therapeutic possibilities]*. Internist (Berl), 2002. **43 Suppl 1**: p. S45-46, S49-65.
140. **Manolio, T.A., et al.**, *Prevalence and etiology of idiopathic dilated cardiomyopathy (summary of a National Heart, Lung, and Blood Institute workshop)*. Am J Cardiol, 1992. **69**(17): p. 1458-1466.
141. **Mapoles, J.E., Krah, D.L., and Crowell, R.L.**, *Purification of a HeLa cell receptor protein for group B coxsackieviruses*. J Virol, 1985. **55**(3): p. 560-566.
142. **Marin-Garcia, J., et al.**, *Specific mitochondrial DNA deletions in idiopathic dilated cardiomyopathy*. Cardiovasc Res, 1996. **31**(2): p. 306-313.
143. **Maron, B.J., et al.**, *Patterns of inheritance in hypertrophic cardiomyopathy: assessment by M-mode and two-dimensional echocardiography*. Am J Cardiol, 1984. **53**(8): p. 1087-1094.
144. **Marriott, J.B., et al.**, *Abnormal cytokine profiles in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy and their asymptomatic relatives*. Heart, 1996. **75**(3): p. 287-290.
145. **Martino, T.A., Liu, P., and Sole, M.J.**, *Viral infection and the pathogenesis of dilated cardiomyopathy*. Circ Res, 1994. **74**(2): p. 182-188.

146. **Mason, J.W., et al.**, *A clinical trial of immunosuppressive therapy for myocarditis. The Myocarditis Treatment Trial Investigators.* N Engl J Med, 1995. **333**(5): p. 269-275.
147. **Matsumori, A.**, *Cytokines in myocarditis and dilated cardiomyopathy.* Eur Heart J Suppl, 2002. **4**(Suppl I): p. I42-45.
148. **Matsumori, A.**, *Cytokines in myocarditis and dilated cardiomyopathy.* Eur Heart J Suppl %R 10.1016/S1520-765X(02)90109-4, 2002. **4**(suppl\_I): p. I42-45.
149. **Matsumori, A.**, *Molecular and immune mechanisms in the pathogenesis of cardiomyopathy--role of viruses, cytokines, and nitric oxide.* Jpn Circ J, 1997. **61**(4): p. 275-291.
150. **Meldrum, D.R.**, *Tumor necrosis factor in the heart.* Am J Physiol, 1998. **274**(3 Pt 2): p. R577-595.
151. **Mena, I., et al.**, *Coxsackievirus infection of the pancreas: evaluation of receptor expression, pathogenesis, and immunopathology.* Virology, 2000. **271**(2): p. 276-288.
152. **Michels, V.V., et al.**, *The frequency of familial dilated cardiomyopathy in a series of patients with idiopathic dilated cardiomyopathy.* N Engl J Med, 1992. **326**(2): p. 77-82.
153. **Michels, V.V., et al.**, *Dystrophin analysis in idiopathic dilated cardiomyopathy.* J Med Genet, 1993. **30**(11): p. 955-957.
154. **Modrow, S., Falke, D., and Truyen, U.**, *Molekulare Virologie.* 2002, Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag GmbH.
155. **Muckelbauer, J.K. and Rossmann, M.G.**, *The structure of coxsackievirus B3.* Curr Top Microbiol Immunol, 1997. **223**: p. 191-208.
156. **Müller, J., et al.**, *Immunoglobulin adsorption in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy.* Circulation, 2000. **101**(4): p. 385-391.
157. **Muntoni, F., et al.**, *Brief report: deletion of the dystrophin muscle-promoter region associated with X-linked dilated cardiomyopathy.* N Engl J Med, 1993. **329**(13): p. 921-925.
158. **Nikolova, V., et al.**, *Defects in nuclear structure and function promote dilated cardiomyopathy in lamin A/C-deficient mice.* J Clin Invest, 2004. **113**(3): p. 357-369.
159. **Nishikawa, T., et al.**, *Ultrastructural features of the myocardium of children with dilated cardiomyopathy.* Heart Vessels, 1999. **14**(1): p. 52-56.
160. **Noutsias, M., et al.**, *Human coxsackie-adenovirus receptor is colocalized with integrins alpha(v)beta(3) and alpha(v)beta(5) on the cardiomyocyte sarcolemma and upregulated in dilated cardiomyopathy: implications for cardiotropic viral infections.* Circulation, 2001. **104**(3): p. 275-280.
161. **Ohtsuka, T., et al.**, *Effect of beta-blockers on circulating levels of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in patients with dilated cardiomyopathy.* J Am Coll Cardiol, 2001. **37**(2): p. 412-417.

162. **Okazaki, T., et al.**, *Autoantibodies against cardiac troponin I are responsible for dilated cardiomyopathy in PD-1-deficient mice*. Nat Med, 2003. **9**(12): p. 1477-1483.
163. **Okegawa, T., et al.**, *The dual impact of coxsackie and adenovirus receptor expression on human prostate cancer gene therapy*. Cancer Res, 2000. **60**(18): p. 5031-5036.
164. **Okegawa, T., et al.**, *The mechanism of the growth-inhibitory effect of coxsackie and adenovirus receptor (CAR) on human bladder cancer: a functional analysis of car protein structure*. Cancer Res, 2001. **61**(17): p. 6592-6600.
165. **Oldfors, A., et al.**, *Dilated cardiomyopathy and the dystrophin gene: an illustrated review*. Br Heart J, 1994. **72**(4): p. 344-348.
166. **Oliveira, M.A., et al.**, *The structure of human rhinovirus 16*. Structure, 1993. **1**(1): p. 51-68.
167. **Olivetti, G., et al.**, *Apoptosis in the failing human heart*. N Engl J Med, 1997. **336**(16): p. 1131-1141.
168. **Olson, T.M., et al.**, *Mutations that alter the surface charge of alpha-tropomyosin are associated with dilated cardiomyopathy*. J Mol Cell Cardiol, 2001. **33**(4): p. 723-732.
169. **Olson, T.M., et al.**, *Actin mutations in dilated cardiomyopathy, a heritable form of heart failure*. Science, 1998. **280**(5364): p. 750-752.
170. **Orthopoulos, G., Triantafilou, K., and Triantafilou, M.**, *Coxsackie B viruses use multiple receptors to infect human cardiac cells*. J Med Virol, 2004. **74**(2): p. 291-299.
171. **Ortiz-Lopez, R., et al.**, *Evidence for a dystrophin missense mutation as a cause of X-linked dilated cardiomyopathy*. Circulation, 1997. **95**(10): p. 2434-2440.
172. **Palese, P., et al.**, *Negative-strand RNA viruses: genetic engineering and applications*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(21): p. 11354-11358.
173. **Palmenberg, A.C.**, *Proteolytic processing of picornaviral polyprotein*. Annu Rev Microbiol, 1990. **44**: p. 603-623.
174. **Palmer, R.M., et al.**, *Induction of nitric oxide synthase in human chondrocytes*. Biochem Biophys Res Commun, 1993. **193**(1): p. 398-405.
175. **Pauschinger, M., et al.**, *[Detection of enteroviral RNA in endomyocardial biopsies in inflammatory cardiomyopathy and idiopathic dilated cardiomyopathy]*. Z Kardiol, 1998. **87**(6): p. 443-452.
176. **Peng, S.S., et al.**, *RNA stabilization by the AU-rich element binding protein, HuR, an ELAV protein*. Embo J, 1998. **17**(12): p. 3461-3470.
177. **Petrella, J., et al.**, *A zebrafish coxsackievirus and adenovirus receptor homologue interacts with coxsackie B virus and adenovirus*. J Virol, 2002. **76**(20): p. 10503-10506.
178. **Pocsik, E., et al.**, *Cell density-dependent regulation of cell surface expression of two types of human tumor necrosis factor receptors and its effect on cellular response*. J Cell Biochem, 1994. **54**(4): p. 453-464.

179. **Poller, W., et al.**, *Highly variable expression of virus receptors in the human cardiovascular system. Implications for cardiotropic viral infections and gene therapy.* Z Kardiol, 2002. **91**(12): p. 978-991.
180. **Pong, R.C., et al.**, *Mechanism of increased coxsackie and adenovirus receptor gene expression and adenovirus uptake by phytoestrogen and histone deacetylase inhibitor in human bladder cancer cells and the potential clinical application.* Cancer Res, 2006. **66**(17): p. 8822-8828.
181. **Portig, I., Pankuweit, S., and Maisch, B.**, *Antibodies against stress proteins in sera of patients with dilated cardiomyopathy.* J Mol Cell Cardiol, 1997. **29**(8): p. 2245-2251.
182. **Prendergast, B.D.**, *HIV and cardiovascular medicine.* Heart, 2003. **89**(7): p. 793-800.
183. **Rakar, S., et al.**, *Epidemiology of dilated cardiomyopathy. A prospective post-mortem study of 5252 necropsies. The Heart Muscle Disease Study Group.* Eur Heart J, 1997. **18**(1): p. 117-123.
184. **Raschperger, E., et al.**, *The coxsackie- and adenovirus receptor (CAR) is an in vivo marker for epithelial tight junctions, with a potential role in regulating permeability and tissue homeostasis.* Exp Cell Res, 2006. **312**(9): p. 1566-1580.
185. **Rath, P.C. and Aggarwal, B.B.**, *TNF-induced signaling in apoptosis.* J Clin Immunol, 1999. **19**(6): p. 350-364.
186. **Reed, L.J. and Muench, H.**, *A simple method of estimating fifty per cent endpoints.* Amer Jour Hyg, 1938. **27**: p. 493-497.
187. **Rerkpattanapipat, P., et al.**, *Cardiac manifestations of acquired immunodeficiency syndrome.* Arch Intern Med, 2000. **160**(5): p. 602-608.
188. **Reyes, M.P., et al.**, *A mouse model of dilated-type cardiomyopathy due to coxsackievirus B3.* J Infect Dis, 1981. **144**(3): p. 232-236.
189. **Richardson, P., 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. **93**(5): p. 841-842.
190. **Rizzino, A., et al.**, *Regulatory effects of cell density on the binding of transforming growth factor beta, epidermal growth factor, platelet-derived growth factor, and fibroblast growth factor.* Cancer Res, 1988. **48**(15): p. 4266-4271.
191. **Roelvink, P.W., et al.**, *The coxsackievirus-adenovirus receptor protein can function as a cellular attachment protein for adenovirus serotypes from subgroups A, C, D, E, and F.* J Virol, 1998. **72**(10): p. 7909-7915.
192. **Rossmann, M.G.**, *The canyon hypothesis. Hiding the host cell receptor attachment site on a viral surface from immune surveillance.* J Biol Chem, 1989. **264**(25): p. 14587-14590.
193. **Sachs, M.D., et al.**, *Integrin alpha(v) and coxsackie adenovirus receptor expression in clinical bladder cancer.* Urology, 2002. **60**(3): p. 531-536.

194. **Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R.**, *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(12): p. 5463-5467.
195. **Sasayama, S., Matsumori, A., and Kihara, Y.**, *New insights into the pathophysiological role for cytokines in heart failure*. Cardiovasc Res, 1999. **42**(3): p. 557-564.
196. **Sasse, A., et al.**, *Coxsackie-and-adenovirus receptor mRNA expression in human heart failure*. J Gene Med, 2003. **5**(10): p. 876-882.
197. **Sasson, Z., et al.**, *5-Fluorouracil related toxic myocarditis: case reports and pathological confirmation*. Can J Cardiol, 1994. **10**(8): p. 861-864.
198. **Satoh, M., et al.**, *Expression of cytokine genes and presence of enteroviral genomic RNA in endomyocardial biopsy tissues of myocarditis and dilated cardiomyopathy*. Virchows Arch, 1996. **427**(5): p. 503-509.
199. **Schimke, I., et al.**, *Decreased oxidative stress in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy one year after immunoglobulin adsorption*. J Am Coll Cardiol, 2001. **38**(1): p. 178-183.
200. **Schmitt, J.P., et al.**, *Dilated cardiomyopathy and heart failure caused by a mutation in phospholamban*. Science, 2003. **299**(5611): p. 1410-1413.
201. **Schollert, P.V. and Bendixen, P.M.**, *[Dilated cardiomyopathy in a user of anabolic steroids]*. Ugeskr Laeger, 1993. **155**(16): p. 1217-1218.
202. **Schultheiss, H.P. and Kuhl, U.**, *Overview on chronic viral cardiomyopathy/chronic myocarditis*. Ernst Schering Res Found Workshop, 2006(55): p. 3-18.
203. **Schultheiss, H.P., et al.**, *Antibody-mediated imbalance of myocardial energy metabolism. A causal factor of cardiac failure?* Circ Res, 1995. **76**(1): p. 64-72.
204. **Schultheiss, H.P., et al.**, *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**: p. 311-327.
205. **Schulze, K., Becker, B.F., and Schultheiss, H.P.**, *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. **64**(2): p. 179-192.
206. **Segel, L.D., et al.**, *Effects of chronic graded ethanol consumption on the metabolism, ultrastructure, and mechanical function of the rat heart*. Cardiovasc Res, 1975. **9**(5): p. 649-663.
207. **Selinka, H.C., et al.**, *Virus-receptor interactions of coxsackie B viruses and their putative influence on cardiotropism*. Med Microbiol Immunol, 2004. **193**(2-3): p. 127-131.
208. **Semenova, L.A., Martyniuk, R.A., and Martsinovich, V.P.**, *Acute lesion of rat myocardium by a single injection of cobalt dichloride*. Cor Vasa, 1975. **17**(2): p. 145-150.
209. **Sgro, J.-Y.**, *Encephalomyocarditisvirus*. 2004. <http://virology.wisc.edu/virusworld/>

210. **Sgro, J.-Y.**, *Rhinovirus* 16. 2004. <http://virology.wisc.edu/virusworld/>
211. **Shafren, D.R., et al.**, *Coxsackieviruses B1, B3, and B5 use decay accelerating factor as a receptor for cell attachment*. J Virol, 1995. **69**(6): p. 3873-3877.
212. **Shieh, J.T. and Bergelson, J.M.**, *Interaction with decay-accelerating factor facilitates coxsackievirus B infection of polarized epithelial cells*. J Virol, 2002. **76**(18): p. 9474-9480.
213. **Sinnreich, M., et al.**, *Localization of coxsackie virus and adenovirus receptor (CAR) in normal and regenerating human muscle*. Neuromuscul Disord, 2005. **15**(8): p. 541-548.
214. **Slifka, M.K., et al.**, *Using recombinant coxsackievirus B3 to evaluate the induction and protective efficacy of CD8+ T cells during picornavirus infection*. J Virol, 2001. **75**(5): p. 2377-2387.
215. **Spicer, A.P., Seldin, M.F., and Gendler, S.J.**, *Molecular cloning and chromosomal localization of the mouse decay-accelerating factor genes. Duplicated genes encode glycosylphosphatidylinositol-anchored and transmembrane forms*. J Immunol, 1995. **155**(6): p. 3079-3091.
216. **Stanley, A.J., et al.**, *Effect of cell density on the expression of adhesion molecules and modulation by cytokines*. Cytometry, 1995. **21**(4): p. 338-343.
217. **Statistisches Bundesamt**, *Krankheitskostenrechnung*. 2004, Bonn. <http://www.gbe-bund.de>
218. **Stephen, R.L., et al.**, *Insulin-like growth factor receptor levels are regulated by cell density and by long term estrogen deprivation in MCF7 human breast cancer cells*. J Biol Chem, 2001. **276**(43): p. 40080-40086.
219. **Takahashi, K., et al.**, *Taurine transporter in primary cultured neonatal rat heart cells: a comparison between cardiac myocytes and nonmyocytes*. Biochem Pharmacol, 2003. **65**(7): p. 1181-1187.
220. **Tam, P.E. and Messner, R.P.**, *Molecular mechanisms of coxsackievirus persistence in chronic inflammatory myopathy: viral RNA persists through formation of a double-stranded complex without associated genomic mutations or evolution*. J Virol, 1999. **73**(12): p. 10113-10121.
221. **Tamburro, P. and Wilber, D.**, *Sudden death in idiopathic dilated cardiomyopathy*. Am Heart J, 1992. **124**(4): p. 1035-1045.
222. **Thierfelder, L.**, *[Genetics of dilated cardiomyopathy]*. Med Klin (Munich), 1998. **93**(4): p. 210-214.
223. **Thoelen, I., et al.**, *Characterization of a cDNA encoding the bovine coxsackie and adenovirus receptor*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **288**(4): p. 805-808.
224. **Thoelen, I., et al.**, *Identification of alternative splice products encoded by the human coxsackie-adenovirus receptor gene*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **287**(1): p. 216-222.
225. **Tomko, R.P., et al.**, *Expression of the adenovirus receptor and its interaction with the fiber knob*. Exp Cell Res, 2000. **255**(1): p. 47-55.

226. **Tomko, R.P., Xu, R., and 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. **94**(7): p. 3352-3356.
227. **Towbin, J.A., et al.**, *Incidence, causes, and outcomes of dilated cardiomyopathy in children*. Jama, 2006. **296**(15): p. 1867-1876.
228. **Tsubata, S., et al.**, *Mutations in the human delta-sarcoglycan gene in familial and sporadic dilated cardiomyopathy*. J Clin Invest, 2000. **106**(5): p. 655-662.
229. **Tyagi, S.C., et al.**, *Differential gene expression of extracellular matrix components in dilated cardiomyopathy*. J Cell Biochem, 1996. **63**(2): p. 185-198.
230. **Utzig, N., et al.**, *[Polio-like myelitis due to Coxsackie-Virus B 3: Course under treatment with pleconaril]*. Klin Padiatr, 2003. **215**(5): p. 286-287.
231. **van't Hof, W. and Crystal, R.G.**, *Manipulation of the cytoplasmic and transmembrane domains alters cell surface levels of the coxsackie-adenovirus receptor and changes the efficiency of adenovirus infection*. Hum Gene Ther, 2001. **12**(1): p. 25-34.
232. **Van Houten, N., et al.**, *Selection of an attenuated Coxsackievirus B3 variant, using a monoclonal antibody reactive to myocyte antigen*. J Virol, 1991. **65**(3): p. 1286-1290.
233. **van Kuppeveld, F.J., et al.**, *Coxsackievirus protein 2B modifies endoplasmic reticulum membrane and plasma membrane permeability and facilitates virus release*. Embo J, 1997. **16**(12): p. 3519-3532.
234. **van Raaij, M.J., et al.**, *Dimeric structure of the coxsackievirus and adenovirus receptor D1 domain at 1.7 Å resolution*. Structure, 2000. **8**(11): p. 1147-1155.
235. **Vincent, T., et al.**, *Cytokine-mediated downregulation of coxsackievirus-adenovirus receptor in endothelial cells*. J Virol, 2004. **78**(15): p. 8047-8058.
236. **Vreugdenhil, G.R., et al.**, *Enterovirus-induced production of pro-inflammatory and T-helper cytokines by human leukocytes*. Cytokine, 2000. **12**(12): p. 1793-1796.
237. **Wallace, D.C.**, *Mitochondrial diseases in man and mouse*. Science, 1999. **283**(5407): p. 1482-1488.
238. **Warraich, R.S., Dunn, M.J., and Yacoub, M.H.**, *Subclass specificity of autoantibodies against myosin in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy: pro-inflammatory antibodies in DCM patients*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **259**(2): p. 255-261.
239. **Welder, A.A. and Melchert, R.B.**, *Cardiotoxic effects of cocaine and anabolic-androgenic steroids in the athlete*. J Pharmacol Toxicol Methods, 1993. **29**(2): p. 61-68.
240. **Wells, A.L., et al.**, *Myosin VI is an actin-based motor that moves backwards*. Nature, 1999. **401**(6752): p. 505-508.
241. **Wessely, R.**, *Coxsackieviral replication and pathogenicity: lessons from gene modified animal models*. Med Microbiol Immunol, 2004. **193**(2-3): p. 71-74.

242. **Wessely, R., et al.**, *Transgenic expression of replication-restricted enteroviral genomes in heart muscle induces defective excitation-contraction coupling and dilated cardiomyopathy* J Clin Invest, 1998. **102**(7): p. 1444-1453.
243. **White, S.R.**, *Amphetamine toxicity* Semin Respir Crit Care Med, 2002. **23**(1): p. 27-36.
244. **Whitton, J.L.**, *Immunopathology during coxsackievirus infection.* Springer Semin Immunopathol, 2002. **24**(2): p. 201-213.
245. **Whitton, J.L., Cornell, C.T., and Feuer, R.**, *Host and virus determinants of coxsackievirus pathogenesis and tropism.* Nat Rev Microbiol, 2005. **3**(10): p. 765-776.
246. **Wickham, T.J., et al.**, *Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment.* Cell, 1993. **73**(2): p. 309-319.
247. **Wigle, E.D., et al.**, *Hypertrophic cardiomyopathy: the importance of the site and the extent of hypertrophy. A review.* Prog Cardiovasc Dis, 1985. **28**(1): p. 1-83.
248. **Wilson, F.M., et al.**, *Residual pathologic changes following murine coxsackie A and B myocarditis.* Am J Pathol, 1969. **55**(2): p. 253-265.
249. **Wimmer, E., Hellen, C.U., and Cao, X.**, *Genetics of poliovirus.* Annu Rev Genet, 1993. **27**: p. 353-436.
250. **Wolfgram, L.J., et al.**, *Variations in the susceptibility to coxsackievirus B-induced myocarditis among different strains of mice.* J Immunol, 1986. **136**(5): p. 1846-1852.
251. **Xie, Q.W. and Nathan, C.**, *Promoter of the mouse gene encoding calcium-independent nitric oxide synthase confers inducibility by interferon gamma and bacterial lipopolysaccharide.* Trans Assoc Am Physicians, 1993. **106**: p. 1-12.
252. **Xu, R. and Crowell, R.L.**, *Expression and distribution of the receptors for coxsackievirus B during fetal development of the Balb/c mouse and of their brain cells in culture.* Virus Res, 1996. **46**(1-2): p. 157-170.
253. **Yang, J.Q., et al.**, *Cell density and serum exposure modify the function of the glucocorticoid receptor complex* Am J Respir Cell Mol Biol, 2008. **38**(4): p. 414-422.
254. **Zajac, I. and Crowell, R.L.**, *Location and Regeneration of Enterovirus Receptors on Cells.* J Bacteriol, 1965. **89**: p. 1097-1100.
255. **Zautner, A.E., et al.**, *Heparan sulfates and coxsackievirus-adenovirus receptor: each one mediates coxsackievirus B infection.* J Virol, 2003. **77**(18): p. 10071-10077.
256. **Zhang, H., et al.**, *Coxsackievirus B-induced myocarditis. Characterization of stable attenuated variants that protect against infection with the cardiocidal wild-type strain.* Am J Pathol, 1997. **150**(6): p. 2197-2207.

## 9 Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
CAR	Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptor
CCV	clathrin coated vesicles
CD4 <sup>+</sup> /8 <sup>+</sup>	cluster of differentiation-4-positiv/-8-positiv
CMV	Cytomegalievirus
CPE	cytopathic effect (zytopathischer Effekt)
CV(B 3)	Coxsackievirus (B3)
DAF	decay accelerating factor
DCM	dilated cardiomyopathy (dilatative Kardiomyopathie)
DNA	desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
EBV	Epstein-Barr-Virus
EGFR	epidermal growth factor receptor
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
H <sub>2</sub> O	Wasser (bidestilliert und autoklaviert)
HHV	Humanes Herpesvirus
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
HSV	Herpes-simplex-Virus
i. p.	intraperitoneal
IDCM	idiopathic DCM (idiopathische dilatative Kardiomyopathie)
IFN	Interferon
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
IRES	internal ribosomal entry site

---

ISFC	International Society and Federation of Cardiology
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KHK	Koronare Herzkrankheit
m.o.i.	multiplicity of infection
MHC	myosin heavy chain (schwere Myosinkette) bzw. major histocompatibility complex
mRNA	messenger ribonucleic acid
NADH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid, reduziert
NCAM	neural cell adhesion molecule
NRCM	neonatal rat cardiac myocytes
NYHA	New York Heart Association
ORF	open reading frame
p. i.	post infectionem
PCR	polymerase chain reaction
PDGFR	platelet-derived growth factor receptor
pfu	plaque forming units
PVB 19	Parvovirus B19
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
SIV	simian immunodeficiency virus
TCID <sub>50</sub>	tissue culture infectious dose (50%)
TNF (- $\alpha$ )	Tumor necrosis factor (- $\alpha$ )
U/v	units per volume (Enzymaktivität)
VP1–4	virale Proteine 1–4 (Kapsidproteine)
WHO	World Health Organization

### **Danksagung**

Die vorliegende Dissertation wurde am Klinikum der Friedrich-Schiller-Universität Jena in der Klinik für Innere Medizin I, Abteilung Kardiologie, mit freundlicher Genehmigung durch Herrn Prof. Dr. H. R. Figulla sowie am Institut für Virologie und Antivirale Therapie mit freundlicher Genehmigung durch Herrn Prof. Dr. P. Wutzler angefertigt.

Herrn Prof. Dr. P. Wutzler möchte ich für die Übernahme der Funktion des betreuenden Hochschullehrers und die Erstellung des Gutachtens ganz herzlich danken.

Weiterhin danke ich Herrn PD Dr. Holger Sigusch für die Konzeption dieser Arbeit sowie die Unterstützung in medizinischen Fragen.

Ein großer Dank gilt allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe „Herzinsuffizienz experimentell“ für das sehr gute Arbeitsklima und die Hilfsbereitschaft – wesentliche Faktoren bei der Entscheidung für diese Promotionsarbeit. Im Besonderen danke ich Dr. Daniela Haase und Dr. Dirk Reinhardt für die vielen anregenden Gespräche, die oft über arbeitsassoziierte Themen hinausgingen, und den Spaß, den wir „im Büro“ hatten. Auch Ulla-Brigitte Köhler und Martina Voigt ein herzliches „Danke!“ – für all die Unterstützung, die ich (nicht nur) im Labor erfahren habe.

Ich hatte das große Glück, einen Teil meiner Experimente am Institut für Virologie und Antivirale Therapie durchführen zu dürfen. Ich möchte allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für die Schaffung der guten experimentellen Rahmenbedingungen und die freundliche Integration in das dortige „Biotop“ danken. Ein spezieller Dank geht an Herrn Dr. Eckhardt Birch-Hirschfeld für die Synthese der benötigten Primer sowie an Frau Veronika Güntzschel und Herrn Dr. Matthias Schacke für die stets schnelle Bereitstellung von Zellkulturen und Medien.

Eine ganz besondere Bedeutung für das Gelingen dieser Dissertation trotz verschiedener Schwierigkeiten hatte sicher die außergewöhnliche Arbeitsatmosphäre in der Arbeitsgruppe meines Betreuers Prof. Dr. Andreas Henke. Ihm danke ich für die kurzfristige Übernahme der Betreuung sowie die geduldige Begleitung und fachliche Unterstützung meiner Arbeit. Mein

Dank geht ebenso (in alphabetischer Reihenfolge) an Nadine Jarasch, Ulrike Martin, Nadine Rohland, Heike Urban, Jenny Wegert und Nadine Wiesener für die freundliche und unkomplizierte Aufnahme in die AG, die Einführung in virologische Arbeitstechniken, zahlreiche Hilfestellungen und Hinweise („Man kann so einen Blot auch über einen ganzen Tag hinziehen.“) und die vielen schönen Momente – auch und gerade außerhalb des Labors.

Meiner Freundin Jenny danke ich für ihre Liebe, die geduldige Unterstützung und ihr Vertrauen sowie ihre Fähigkeit (und die darauf verwendete Energie), mich immer wieder anzuspornen.

Bei meinen Eltern sowie meinem Bruder und seiner Familie kann ich mich nicht genug bedanken – für ihren bedingungslosen Beistand, für Rücksichtnahme und Verständnis und das Gefühl, jederzeit einen sicheren Hafen anlaufen zu können. Ohne sie wären mein Studium und das Anfertigen dieser Arbeit kaum möglich gewesen.

Herzlichen Dank!

**Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der FSU Jena vom 22. August 2007 bekannt ist.

Ich versichere, die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Die Hilfe eines Promotionsberaters wurde von mir nicht in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit der vorgelegten Dissertation stehen.

Die vorliegende Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch bei keiner anderen Prüfungsbehörde oder Hochschule eingereicht.

Jena, den 03.06.2010

Martin Czolbe