



Aus der  
I. Medizinischen Klinik  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. A. Schömig)  
und dem  
Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung  
der Technischen Universität München  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. B. Gänsbacher)  
  
angefertigt unter der Leitung von PD Dr. med. R. Wessely

Vorgelegt über  
Herrn Prof. med. vet. J. Hirschberger  
Lehrstuhl für Innere Medizin, Dermatologie und Neurologie sowie klinische  
Laboratoriumsdiagnostik der kleinen Haustiere  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
(Vorstand: Prof. Dr. med. vet. K. Hartmann)

**Charakterisierung des patho-physiologischen Stellenwertes des Transskriptionsfaktors  
Interferon-Regulator-Faktor-1 (IRF-1) bei der Coxsackievirus-Infektion der Maus.**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von  
Cornelia Michaelis  
aus  
Stuttgart  
2004

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. R. Stolle  
Referent: Univ.-Prof. Dr. J. Hirschberger  
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Dr. F. Sinowatz

Tag der Promotion: 23. Juli 2004

Meinen Eltern in tiefer Dankbarkeit gewidmet

Du Adler, dort hoch auf den Bergen,  
Dir schickt die Möwe der See  
Einen Gruß von schäumenden Wogen  
Hinauf zum ewigen Schnee

(Elisabeth v. Österreich)

<b>1</b>	<b><u>EINLEITUNG</u></b> .....	<b>7</b>
<b>2</b>	<b><u>SCHRIFTTUM</u></b> .....	<b>8</b>
<b>2.1</b>	<b>DIE VIRALE HERZERKRANKUNG</b> .....	<b>8</b>
2.1.1	DIE COXSACKIEVIRALE MYOKARDITIS.....	9
2.1.2	DIE MYOKARDITIS DER MAUS .....	10
2.1.3	DIE DILATATIVE KARDIOMYOPATHIE.....	11
2.1.4	THERAPIE DER MYOKARDITIS .....	12
<b>2.2</b>	<b>DIE ROLLE DER INFEKTABWEHR</b> .....	<b>13</b>
<b>2.3</b>	<b>DER INTERFERON-REGULATOR-FAKTOR-1 (IRF-1)</b> .....	<b>14</b>
<b>2.4</b>	<b>DIE ROLLE DER INDUZIERBAREN STICKSTOFFMONOXID-SYNTHESE (NOS2)</b> .....	<b>15</b>
<b>2.5</b>	<b>KNOCHENMARKSTRANSPLANTATION</b> .....	<b>16</b>
<b>2.6</b>	<b>IN-SITU-HYBRIDISIERUNG</b> .....	<b>17</b>
<b>2.7</b>	<b>ECHOKARDIOGRAPHISCHE UNTERSUCHUNGEN</b> .....	<b>17</b>
<b>2.8</b>	<b>DAS TIERMODELL MAUS</b> .....	<b>18</b>
<b>3</b>	<b><u>EIGENE UNTERSUCHUNGEN</u></b> .....	<b>20</b>
<b>3.1</b>	<b>ZIELVORSTELLUNG UND AUFBAU DER EIGENEN ARBEIT</b> .....	<b>20</b>
<b>3.2</b>	<b>GLIEDERUNG DES GESAMTPROJEKTES</b> .....	<b>22</b>
<b>3.3</b>	<b>UNTERSUCHUNGSGUT UND METHODIK</b> .....	<b>23</b>
3.3.1	VERSUCHSTIERE UND HALTUNGSBEDINGUNGEN .....	23
3.3.2	VERSUCHSPLAN UND GRUPPENEINTEILUNG.....	24
<b>3.4</b>	<b>VERSUCHSDURCHFÜHRUNG</b> .....	<b>28</b>
3.4.1	INFEKTION UND BETREUUNG DER MÄUSE.....	28
3.4.2	BLUTENTNAHME UND TÖTUNG .....	29
3.4.3	ORGANENTNAHME .....	30
3.4.4	ORGANBEARBEITUNG ZUR FACS-ANALYSE.....	30
3.4.5	KNOCHENMARKGEWINNUNG .....	34
3.4.6	BESTRAHLUNG UND KNOCHENMARKSTRANSPLANTATION (KMT).....	34
3.4.7	PLAQUE-FORMING-ASSAY .....	36
3.4.8	IN-SITU-HYBRIDISIERUNG.....	39
3.4.9	UNTERSUCHUNG DER LINKSVENTRIKULÄREN KONTRAKTILITÄT .....	40
3.4.10	STATISTISCHE BERECHNUNG UND DOKUMENTATION .....	41
<b>3.5</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>43</b>
3.5.1	STERBLICHKEIT NACH INFEKTION .....	43
3.5.2	ERGEBNISSE DER TITERANALYSE DURCH PLAQUE-FORMING-ASSAY (PFA).....	44
3.5.3	ERGEBNISSE DER IN-SITU-HYBRIDISIERUNG (ISH) IM EXPERIMENT 1.....	50
3.5.4	ERGEBNISSE DER IN-SITU-HYBRIDISIERUNG (ISH) IM EXPERIMENT 2.....	52
3.5.5	ERGEBNISSE DER FACS-ANALYSE IM EXPERIMENT 1.....	57
3.5.6	ERGEBNISSE DER FACS-ANALYSE IM EXPERIMENT 2.....	60
3.5.7	ERGEBNISSE DER LABOR- ANALYSE IM EXPERIMENT 1 UND 2.....	64
3.5.8	ERGEBNISSE DER ECHOKARDIOGRAPHISCHEN UNTERSUCHUNG IM EXPERIMENT 2 .....	66
<b>4</b>	<b><u>DISKUSSION</u></b> .....	<b>68</b>
<b>4.1</b>	<b>DER TRANSSKRIFTIONSFAKTOR IRF-1</b> .....	<b>68</b>
<b>4.2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>69</b>
4.2.1	DAS TIERMODELL MAUS.....	69
4.2.2	COXSACKIEVIRUS DER GRUPPE B3 .....	70
4.2.3	PLAQUE-FORMING-ASSAY .....	70
4.2.4	IN-SITU-HYBRIDISIERUNG.....	70

4.2.5	FACS-ANALYSE .....	71
4.2.6	ECHOKARDIOGRAPHISCHE UNTERSUCHUNG .....	71
4.3	AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE .....	72
4.4	SCHLUSSFOLGERUNG .....	75
<b>5</b>	<b><u>ZUSAMMENFASSUNG.....</u></b>	<b>76</b>
<b>6</b>	<b><u>SUMMARY .....</u></b>	<b>78</b>
<b>7</b>	<b><u>LITERATURVERZEICHNIS .....</u></b>	<b>79</b>
<b>8</b>	<b><u>TABELLENVERZEICHNIS .....</u></b>	<b>90</b>
<b>9</b>	<b><u>ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</u></b>	<b>91</b>
<b>10</b>	<b><u>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</u></b>	<b>92</b>
<b>11</b>	<b><u>DANKSAGUNG.....</u></b>	<b>95</b>
<b>12</b>	<b><u>LEBENS LAUF .....</u></b>	<b>97</b>

### 1 Einleitung

Unter Myokarditis versteht man eine Schädigung der Myozyten mit reaktiver Infiltration des Myokardgewebes durch Entzündungszellen. Ätiologisch spielen neben viralen und bakteriellen Infektionen auch Toxine, allergische Reaktionen und autoimmunologische Prozesse eine Rolle (BECKER 1991).

Die Myokarditis weist eine Erkrankungshäufigkeit von 7,5 pro 100 000 Einwohnern auf, es ist aber davon auszugehen, dass viele Infektionen des Herzmuskels nicht bemerkt bzw. vom Arzt nicht diagnostiziert werden, da es sich um meist klinisch inapparente Krankheitsverläufe handelt (DIAZ et al. 1987).

Eine der Ursachen, die zu einer viralen Herzerkrankung führen können, ist eine Infektion mit dem Enterovirus Coxsackievirus B3 (CVB3) (WOODRUFF 1980).

Im Anschluss an die virale Infektion kann sich bei persistierender myokardialer Infektion durch das Coxsackievirus der Gruppe B3 (CVB3) eine dilatative Kardiomyopathie entwickeln (WESSELY et al. 1998, BADORFF et al. 1999). Die damit einhergehende Herzinsuffizienz ist mit einer erheblichen Morbidität und Mortalität verbunden (DARGIE et al. 1996).

Der Interferon-Regulator-Faktor-1 (IRF-1) ist ein pluripotenter Transkriptionsfaktor, welcher über die Regulierung von Interferonen (NGUYEN et al. 1997) und Interleukinen (ABDOLLAHI et al. 1991) direkten Einfluss auf die zelluläre Immunabwehr bei Virusinfektionen nimmt. So ist die Reifung der cytotoxischen T-Zellen in Thymus und peripheren lymphatischen Organen von IRF-1 abhängig (PENNINGER et al. 1997). Ferner ist er maßgeblich an der Antigen-Prozessierung und Präsentation beteiligt (VAN KAER et al. 1992, MATSUYAMA et al. 1993).

Von entscheidender Bedeutung ist die Wirkung des IRF-1 auf die Induktion der Stickstoffmonoxid-Synthase und damit der Produktion von NO, welches in der Lage ist die Virusreplikation über die Inaktivierung der 2A-Protease zu hemmen und damit den myokardialen Schaden zu reduzieren (BADORFF et al. 1999, SAURA et al. 1999).

Es soll versucht werden anhand der Überlebenskurve, der Titeranalyse durch In-situ-Hybridisierung (ISH) und Plaque-forming-Assay (PFA), der Untersuchung der T-Zellpopulationen durch FACS-Analyse, sowie durch ultrasonographische Kontraktilitätsprüfung des linken Ventrikels (FS), Aussagen über die klinische Relevanz und direkte antivirale Aktivität von IRF-1 bei der Coxsackievirus-Infektion zu treffen.

2 SCHRIFTTUM

2.1 Die virale Herzerkrankung

2.1.1 Grundlagen zur Myokarditis

Die Myokarditis ist eine Erkrankung des Herzmuskels, die eine häufige Ursache für plötzliche Todesfälle bei jungen Erwachsenen ist (DRORY et al. 1991 siehe Abb. 1).

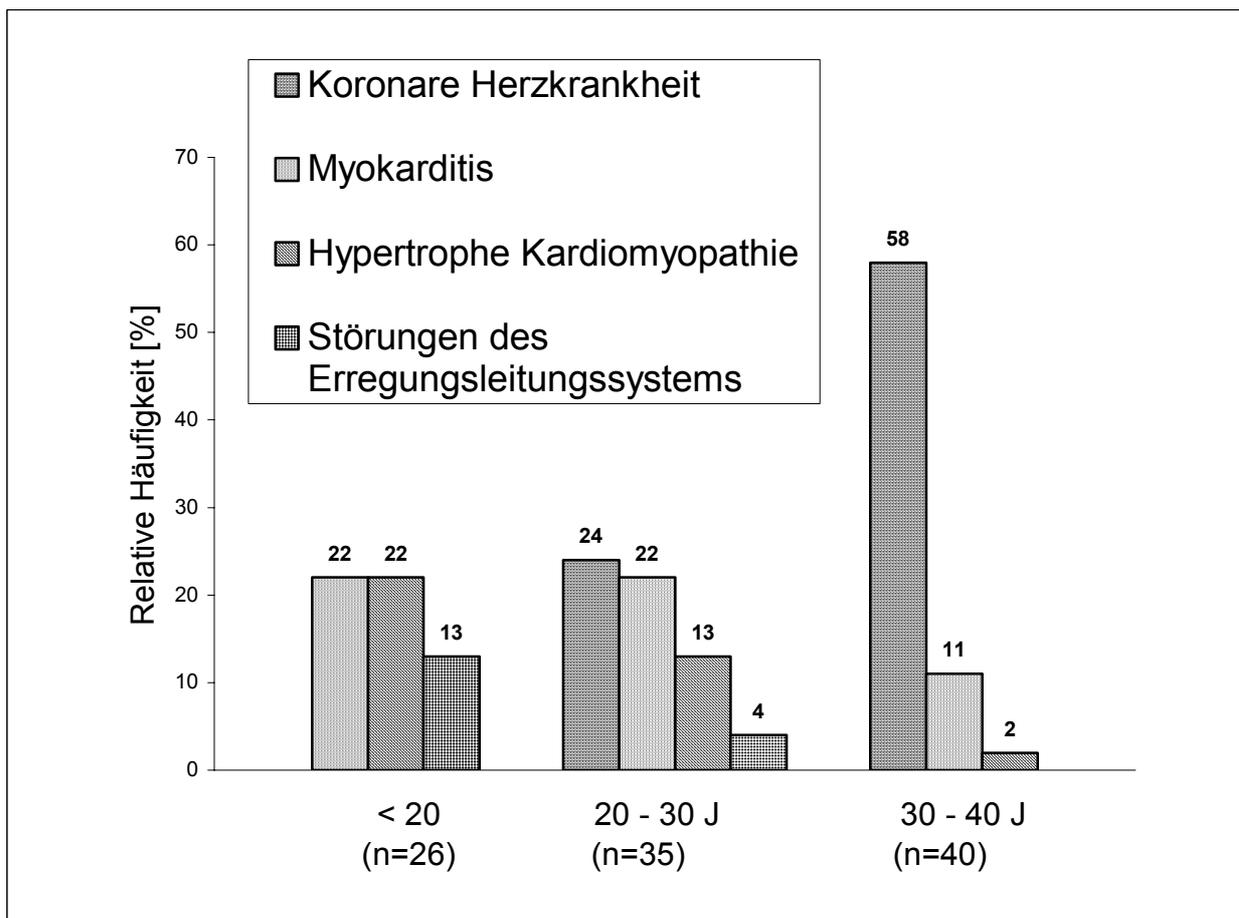


Abbildung 1: Ursachen des plötzlichen Herztodes bei 123 Patienten ≤40 Jahre mit plötzlichem Herztod nach DRORY et al. 1991.

Ätiologisch gesehen spielen neben bakteriellen und viralen Infektionen auch Toxine, allergische Reaktionen und autoimmunologische Prozesse eine Rolle (BECKER 1991).

Bakterielle Erkrankungen sind selten mit einer Myokarditis vergesellschaftet; weltweit am häufigsten ist die durch den Parasiten *Trypanosoma cruzi* verursachte Chagas Erkrankung (SCHOFIELD und DIAS 1999).

Häufige Erreger einer viralen Myokarditis sind die Enteroviren, vornehmlich die Coxsackieviren der Gruppe B, bei denen sich oft nur grippeartige Krankheitsbilder mit Lymphadenitis und Myalgien zeigen (MELNICK 1989). In Patienten, die an einer Myokarditis oder einer dilatativen Kardiomyopathie leiden, können durch Endomyokard-biopsien enterovirale Genome gefunden werden (WHY et al. 1994).

Die größte ätiologische Bedeutung kommt den Coxsackieviren der Gruppe B 1-5 zu, ferner den Adenoviren, verschiedenen Echoviren, das Mumpsvirus, Influenza-A-Virus, Adenoviren, Epstein-Barr-Virus und andere mehr. Seltener rufen Bakterien (z.B. *Borrelia burgdorferi*), Protozoen (z.B. Chagas, Toxoplasmose) oder Pilze eine Myokarditis hervor (MAISCH et al. 1993).

Myokarditiden anderer Genese werden von FEENSTRA et al. (1999) beschrieben. Danach tritt die Herzmuskelentzündung durch direkten toxischen Effekt von Medikamenten auf.

Auch einer Tumor- Behandlung mit Doxorubicin kann eine Kardiomyopathie nachfolgen (SINGAL und ILISKOVIC 1998).

In seltenen Fällen kommt eine idiopathische Riesenzell-Myokarditis bei jungen Erwachsenen vor (COOPER et al. 1997).

Bei über 80 Prozent von HIV-infizierten Menschen zeigt sich eine Myokarditis oder dilatative Kardiomyopathie im Krankheitsverlauf (BARBARO et al. 1998).

Eine Folgeerkrankung der Myokarditis, die dilatative Kardiomyopathie, kann als genetische Dystrophin-Defizienz oder durch Zerstörung des Dystrophin durch CVB3 entstehen (BADORFF et al. 2000).

### **2.1.1 Die coxsackievirale Myokarditis**

Die Vergesellschaftung der akuten Myokarditis mit Coxsackieviren der Gruppe B wird auf über 25% der diagnostizierten Fälle weltweit geschätzt (GRAVANIS und STERNBY 1991)

Die erste Beschreibung der Coxsackieviren findet sich im Jahre 1949 von MELNICK et al. nach einer Reihe von Fällen fieberhafter Erkrankungen in einem Randort New Yorks mit dem Namen Coxsackie.

Ende der fünfziger Jahre sieht man die Gruppe B der Coxsackieviren (CVB) als entscheidenden Faktor der Myokarditis bei Kindern an (DISNEY et al. 1953), außerdem als Ursache für aseptische Meningitiden und Pankreatitiden (SAVOIA und OXMAN 1990).

Die Coxsackieviren der Gruppe B3 (CVB3) gehören zur Familie der Picornaviridae und zum Genus der Enteroviren und sind in der Lage Myokarditis, dilatative Kardiomyopathie und die sogenannte Bornholm Erkrankung hervorzurufen (ARCHARD et al. 1987). Ferner kann es zu Infektionen des ZNS mit Meningitis oder des Pankreas mit der möglichen Entwicklung eines Diabetes kommen (MELNICK et al. 1989).

Durch spezifische Bindung an ein zelluläres Rezeptorprotein wird das Virus durch Endozytose in die Zelle aufgenommen. Das enterovirale Genom bindet durch die 5' terminale Region („internal ribosomal entry site“) an die zellulären Kofaktoren der Proteinsynthese. Die Synthese der zellulären Proteine und der RNA wird durch die virale 2A Proteinase blockiert („host shut off“) und es werden im Rahmen der akuten Virusreplikation im Zytoplasma überwiegend virale Proteine synthetisiert (RUECKERT 1990).

Von den coxsackieviralen Proteinen sind zwei Proteasen essentiell für den viralen Lebenszyklus: Die Protease 3C und 2A, welche das Dystrophin spaltet und damit das Protein irreversibel zerstört (RUECKERT 1996).

### **2.1.2 Die Myokarditis der Maus**

Das gegenwärtige Wissen um die Pathogenese der viralen Herzerkrankungen gründet sich unter anderem auf Studien des murinen Modells, da Enteroviren wie Coxsackieviren der Gruppe B3 in Menschen wie auch in Mäusen eine Myokarditis hervorrufen kann (KLINGEL 1992, KIRK et al. 1996).

KISHIMOTO und ABELMANN (1990) vergleichen T-Zell defiziente Mäuse, normale Mäuse und T-Zell defiziente Mäuse, die mit Milz-Zellen eines CVB3 infizierten Tieres rekonstituiert wurden. Die Tiere, welche Milz-Zellen erhalten haben erkrankten an einer schwereren Myokarditis, als T-Zell defiziente Tiere. Dies zeigt, dass Antigen (CVB3)-spezifische T-Zellen eine Rolle im Verlauf der Pathogenese der Myokarditis haben.

Zur Erforschung der Pathogenese der Bedeutung von funktionstüchtigen peripheren B- und T-Lymphozyten verwendet man wiederum das Tiermodell durch Infektion von severe combined immunodeficiency-Mäusen (SCID). Bei diesen Tieren führt die CVB3 Infektion zu einer hohen Mortalitätsrate, während immunkompetente Mäuse praktisch keine Mortalität aufweisen (SCHWIMMBECK et al. 2000).

Bei Mäusen, die mit CVB3 infiziert sind, ist das Dystrophin im Herzen funktionell und morphologisch nicht mehr in der Lage seine Aufgabe als cytoskeletales Protein auszuüben und kann somit eine dilatative Kardiomyopathie verursachen (BADORFF et al. 1999).

Im Mausmodell lässt sich die akute Virusmyokarditis in folgende Stadien einteilen (MALL 1995) :

- 1) Hämatogene Infektion kardialer Myozyten, anschließende Zell-zu-Zell-Infektion mit Ausbildung größerer infizierter Herde (Gruppenfasernekrosen), in dieser Phase noch keine Protektion durch Effektoren der lokalen Immunität, da noch keine Entzündungsinfiltration vorliegt.
- 2) Reaktive Entzündungsinfiltration zwei Tage nach Infektion mit Makrophagen und natürlichen Killer-Zellen in einer ersten Welle der Entzündungsantwort (unspezifische Immunantwort) gefolgt von T-Helferzellen (CD4) und zytotoxischen T-Lymphozyten (CD8) in einer zweiten Welle (spezifische Immunantwort).
- 3) Mit dem Maximum der Entzündungsinfiltration wird das Virus i.d.R. nach etwa 12 Tagen eliminiert.

Auch wenn das Virus im Herzmuskelgewebe und im Pankreas über Tage und Wochen persistieren kann, scheiden Mäuse mit dem Kot kein Virus aus und geben es damit auch nicht unbedingt an Artgenossen weiter (KIM et al. 2001).

Mit verschiedenen Knock-out-Modellen wird versucht den Pathomechanismus der Erkrankung zu erklären. In diesem Zusammenhang zeigt sich durch experimentelle Infektion von Wildtyp-Mäusen und Typ I-Interferon-Rezeptor defizienten Mäusen eine frühe Sterblichkeit bei den Typ I-Interferon-Rezeptor defizienten Tieren (WESSELY et al. 2001)

### **2.1.3 Die dilatative Kardiomyopathie**

Es kann gezeigt werden, dass die dilatative Kardiomyopathie die Folge einer viralen Erkrankung sein kann und zwar meist die Folge einer Enterovirus-Infektion mit dem Coxsackievirus der Gruppe B. Diese Annahme wird durch die Detektion von enteroviralem Genomen in Herzen von Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie bestätigt (MARTINO et al. 1994).

Die Präsenz des enteroviralen Genoms in Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie beträgt im Herzen etwa 15 bis 25% (BABOONIAN et al. 1997)

Als persistierendes molekulares Pathogen schädigt das Virus in der chronischen Phase durch den Verlust von Myozyten, durch Hypertrophie und Degeneration des kontraktiven Apparates mit reaktiver Myokardfibrose bis hin zur Dilatation des Herzmuskels und der daraus resultierenden myokardialen Dysfunktion. Die Coxsackievirale Protease 2A verändert und

verschlechtert damit die Struktur des cytoskelettalen Proteins Dystrophin (BADORFF et al. 1999).

In Mäusen können persistierende CVB3-Genome eine dilatative Kardiomyopathie induzieren (WESSELY et al. 1998).

### **2.1.4 Therapie der Myokarditis**

Der Einsatz von Immunsuppressiven Therapeutika sollte zurückhaltend beurteilt werden, ebenso der Einsatz alternativer Verfahren wie Interferon (KANDOLF und HOFSCHEIDER 1985), Immunabsorptionstechniken, Hyperimmunseren und antivirale Substanzen (SCHULTHEISS et al. 1992).

Gaben von Vorlastsenkern, Herzglycosiden und Diuretika, sowie  $\beta$ -Rezeptorenblocker tragen bisweilen zu einer Reduzierung der Symptome in verschiedenen Fällen bei (PACKER et al. 1993 und WAAGSTEIN et al. 1993).

Die wichtigsten Therapeutika lassen sich in verschiedene Gruppen einteilen (BÖTTGER und FLEISCHER 1994):

- Die  $\beta$ -Rezeptorenblocker als reversible Inhibitoren der endogenen Catecholamine senken die Herzfrequenz und erhöhen die myokardiale Kontraktilität und das Herzzeitvolumen.
- Die Gruppe der Nitrate und der Stickstoffmonoxid -(NO)-Donatoren, welche durch Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) zur Gefäßrelaxation und Dilatation führen und damit die Sauerstoffbilanz im Herzmuskelgewebe verbessern. Zudem werden die Vor- und Nachlast gesenkt und somit gleichzeitig der Bedarf an Sauerstoff vermindert.
- Die Gruppe der Angiotensin-Converting-Enzym-(ACE)-Hemmer entlastet das Myokard ebenfalls über die Herabsetzung des arteriellen Gefäßtonus.
- Als ultima ratio bleibt die Herztransplantation zur Behandlung der Dilatativen Kardiomyopathie, deren Vorstufe die Myokarditis ist (PADALCO et al. 2004).

Im Tiermodell kann eine Zunahme des kardialen Schadens festgestellt werden, ebenso wie die Inzidenz letaler Effekte (KILBURNE et al. 1956) bei einem frühen Einsatz von Kortikosteroiden. Ab dem 8.Tag post infectionem zeigt sich keine sichere Änderung der Mortalitätsrate (MATSUMORI 1992 und MAISCH et al. 1993).

HOFLING et al. (2000) zeigen, dass manche CVB3 Stränge ein Antigen-Epitop des Adenovirus 2 präsentieren und damit eine protektive Aktivität in Mäusen induzieren können.

CHAPMAN et al. (2000) immunisieren erfolgreich Mäuse mit attenuiertem CVB3.

### 2.2 Die Rolle der Infektabwehr

#### **Lympho-Hämatopoese:**

Nach der Geburt entstehen alle zellulären Komponenten hauptsächlich im Knochenmark. Die Blutzellen werden aus einer relativ kleinen Fraktion von hämatopoetischen Stammzellen gebildet, welche ursprünglich von TILL (1963) identifiziert worden sind.

Die hämatopoetischen Stammzellen verfügen über eine Selbsterneuerungs-Kapazität und sind pluripotent, d.h. sie sind in der Lage sich in myeloide Stammzellen zu differenzieren, aus welchen entweder Blutplättchen, Erythrozyten, polymorphkernige Leukozyten und Monozyten entstehen; oder aus den lymphoiden Stammzellen entwickeln sich B-Zellen und T-Zellen, sowie Natural-Killer-Zellen (OSAWA 1996); diese Stammzellen und damit das Knochenmark sind für die Forschung von großem Interesse.

Während die T-Zellen reifen, ist ihr unterschiedlicher Maturationszustand an der Expression einer Reihe von Oberflächenmarkern, wie z.B. CD4 für T-Helferzellen und CD8 für zytotoxische T-Zellen und durch die Umgestaltung der T-Zell-Rezeptor Gene zu erkennen (WU 1991).

Die Reifung der B-Zellen im Knochenmark weist viele Parallelen zur T-Zell Entwicklung auf. Auch hier zeigen sich die Reifungsstadien durch die Expression von Oberflächenmarkern wie z.B. B220 (HARDY 1991).

Die Empfänglichkeit oder Resistenz für Krankheiten impliziert ein komplexes Netzwerk aus genetischen und erworbenen Faktoren. Protektive Lymphozytenpopulationen gegen Viren sind vornehmlich cytotoxische T-Zellen, T-Helferzellen und B-Zellen. Die T-Helferzellen unterscheiden sich aufgrund der Cytokin- oder Lymphokin- Freisetzung (KUBY 1994).

Die major histocompatibility complex (MHC) Moleküle beschreiben einen Gen-Komplex, dessen Aufgabe darin besteht die Zell-Oberflächenmoleküle zu binden und sie verschiedenen T-Zellen zu präsentieren. Dieser Komplex wird in der Maus auch H-2 Komplex, beim Menschen jedoch HLA-Komplex genannt. Man unterscheidet MHC Klasse I und II. MHC Klasse I wird von nahezu allen kernhaltigen Zellen produziert und präsentiert Antigene an CD8-positive Zellen, also cytotoxischen T-Zellen. MHC Klasse II wird nur von Antigen präsentierenden Zellen (Makrophagen, B-Zellen) produziert, um prozessierte Antigen-Peptide an CD4-positive T-Zellen, also T-Helferzellen zu präsentieren (KUBY 1994).

In tierexperimentellen Untersuchungen konnte die antivirale Aktivität von cytotoxischen T-Zellen (CD8-positive T-Zellen) belegt werden (MATSUMORI 1992). In CD4 und CD8

defizienten Mäusen kann gezeigt werden, dass die zelluläre Inflammation und Mortalität der Tiere nach CVB3 Infektion deutlich ansteigt (KNOWLTON und BADORFF 1999).

Extrazelluläre Antigene werden durch sekretierte Antikörper eliminiert, während intrazelluläre Antigene erst über eine cytoplasmatische Degradation in Peptide gespalten werden müssen, die sich dann nach dem Transport durch Transporter for antigen processing (=TAP1) zum Endoplasmatischen Retikulum und sich dann schließlich mit MHC I verbinden (cytosolic pathway) (KUBY 1994).

WHITE et al. (1996) zeigen, dass IRF-1 die Transskription des Peptid-Transporters (TAP1) reguliert und diese ist bei IRF-1 Knock-out-Mäusen erniedrigt (PENNINGER et al. 1997).

### **Zelloberflächenmoleküle oder Co-Rezeptoren**

Die Erforschung immunologischer Vorgänge hat durch die Verfügbarkeit transgener und Knock-out-Mäuse eine große Entwicklung durchgemacht. Einen fundamentalen Beitrag leisteten KOHLER und MILSTEIN (1975) durch die Beschreibung monoklonaler Antikörper. Heutzutage sorgen monoklonale Antikörper, „fluorescence-activated cell sorter“ (FACS) und magnetische Separationstechnologien für eine schnelle Isolierung und Klassifizierung der Zellen.

Die Oberflächenmarker werden in der Literatur auch als sogenannte Co-Rezeptoren oder Aktivierungsmarker bezeichnet (JANEWAY 1992).

Der Aktivierungsmarker CD25 wird sowohl von T-Zellen, als auch von B-Zellen synthetisiert, nachdem ihr Antigenrezeptor gebunden ist. Die FACS-Messung ist eine exzellente Technik zur Erkennung und Quantifizierung des Expressionslevels der Aktivierungsmarker (KUBY 1994).

### **2.3 Der Interferon-Regulator-Faktor-1 (IRF-1)**

Interferon-Regulator-Faktoren kontrollieren die Funktionen und Aktivitäten von Interferonen (NGUYEN et al. 1997, MIYAMOTO et al. 1998, STARK et al. 1998).

Interferone (IFN) sind eine multifunktionelle Cytokinfamilie, die für die zelluläre Immunabwehr besonders bei Virusinfektionen verantwortlich ist, da diese von virusinfizierten Zellen sezerniert werden. Zu diesen Cytokinen gehören neben IFN  $\alpha$ , IFN $\beta$  und IFN $\gamma$  auch Prolaktin, der Tumor-Nekrosis-Faktor und verschiedene Interleukine, so dass dem IRF-1 auch eine entscheidende Rolle für die Wachstumskontrolle zukommt (ABDOLLAHI et al. 1991).

Als negative Wachstumsfaktoren werden sie von YAMADA et al. (1991), KIRCHHOFF et al. (1993) und VAUGHAN et al. (1997) gesehen. Ferner zeigt sich diese Funktion auch bei humanen koronaren Gefäßmuskelzellen (WESSELY et al. 2003).

Außerdem wird das IRF-1 als kritische Komponente der transkriptionalen Aktivierung von der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS2) gesehen. So zeigt sich in IRF-1 defizienten Mäusen eine vollständige Abwesenheit von NOS2 (KAMIJO et al. 1994) und diese Tiere sind somit hochempfindlich für eine CVB3 Infektion (LIU et al. 1995).

IRF-1 ist laut WHITE et al. (1996) ein regulierender Faktor beim Antigen-Processing, durch Transskription des Peptid Transporters (TAP1= transporter for antigen processing 1).

PENNINGER et al. (1997) zeigen die Verringerung an TAP1 und einen Rückgang an reifen CD8 positiven Thymozyten in Thymus und peripheren lymphatischen Organen bei IRF-1 defizienten Mäusen.

Auch die MHC I -Moleküle sind in ihrer Expression von IRF-1 abhängig (VAN KAER et al. 1992).

Weitere Funktionen zeigen TELGMANN et al. (2003) in einer Veröffentlichung über die Regulation des bovinen Oxytocin Rezeptorgen im endometrialen Gewebe während der Gravidität.

### **2.4 Die Rolle der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS2)**

Die Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS) umfassen eine Enzym-Familie, welche in NOS1, die neuronale NOS, NOS2, die induzierbare NOS (iNOS) und die NOS3, welche die endotheliale NOS verkörpert, unterteilt sind. Diese Formen sind alle im Herzen vorhanden und werden durch Cytokine wie Interleukin-1 $\beta$ , Tumor-Nekrosis-Faktor- $\alpha$ , Interferon- $\gamma$ , Interleukin-6 und durch Lipopolysaccharide induziert (HOIT 2001).

Die Wirtsantwort auf eine Infektion mit CVB3 ist sehr komplex. Im Rahmen der Immunabwehr spielen die Natürlichen Killer-Zellen (NK), Makrophagen und der Signal-Transsduktionsweg der Interferone eine entscheidende Rolle (ZARAGOZA et al. 1998).

Es kann gezeigt werden, dass die Makrophagen durch die Expression von NOS2 die Hauptquelle des NO sind (LOWENSTEIN et al. 1996).

In Mäusen, welche an einer viralen Myokarditis erkrankt sind, ist NO in der Lage die virale Replikation zu inhibieren (LOWENSTEIN 1999).

Interferon- $\gamma$  kann die Makrophagen dazu anregen NOS2 zu produzieren und damit NO, welches in der Lage ist die Virusreplikation zu hemmen und so den klinischen Verlauf einer Virusinfektion verbessert (DING et al. 1988, TUCKER et al. 1996, MIKAMI et al. 2001).

Schwerwiegende Myokarditiden und Pankreatitiden zeigen sich bei NOS2 Knock-out-Mäusen oder Mäusen, die in der frühen Phase der Infektion mit NOS2-Inhibitoren behandelt werden (ZARAGOZA et al. 1999).

Diese Mäuse entwickeln eine massive Schädigung des Myokard mit dystrophischer Calcifizierung (ZARAGOZA et al. 1998).

NO inaktiviert die coxsackievirale Protease 2A und vermindert damit die Virusreplikation und die Proteolyse des Dystrophin, welches ein Grundbaustein des Cytoskeletts des Herzens ist (RUECKERT 1996).

### **2.5 Knochenmarktransplantation**

Die Knochenmarktransplantation (KMT) ist eine der wichtigsten Strategien in der Behandlung von Leukämien, aplastischer Anämie, kongenitaler Immundefizienz und auch autoimmuner Erkrankungen (MARMONT 1994, THOMAS 1999, IKEHARA 2001).

Die von THOMAS und STORB (1970) etablierte „Aspirations-Methode“ beschreibt die Abnahme von Knochenmarkzellen (KMZ) durch Aspiration aus dem Darmbeinkamm beim Menschen.

Unter Verwendung der langen Röhrenknochen (Femur, Humerus) bei Affen kann die „Perfusions-Methode“ etabliert werden, bei der die KMZ nur minimal mit peripherem Blut kontaminiert werden (KUSHIDA et al. 2000).

Über den therapeutischen Ansatz im Bereich der Kardiomyozytenregeneration diskutieren HASSINK et al. (2003). Eine effektive Behandlung der Chagas-Erkrankung durch Knochenmarktransplantation kann in Patienten und Mäusen gezeigt werden. Hierbei ist nach intravenöser Injektion von Knochenmarkzellen eine signifikante Reduktion an inflammatorischen Infiltraten und interstitiellen Fibrosen, sowie eine Verbesserung der Herzfunktion zu beobachten (SOARES et al. 2004).

Als neue Therapie-Strategie bei Erkrankungen des glomerulären Filtrationsapparates sieht IMASAWA (2003) die Knochenmarktransplantation nach Studien an Mäusen mit Nephropathien, welche Knochenmarkzellen über die Schwanzvene erhalten haben.

### **2.6 In-situ-Hybridisierung**

Die In-situ-Hybridisierungs-(ISH)-Technik wird erstmals 1969 beschrieben (PARDUE und GALL 1969). Im gleichen Jahr wird sie auch von JOHN et al. (1969) veröffentlicht.

Übersichtsarbeiten werden 1994 von LEITCH et al. und 1996 von SWIGER und TUCKER angefertigt.

Die In-situ-Hybridisierung ist ein molekulargenetisches Verfahren zum Nachweis von DNS- und RNS-Molekülen in situ, d.h. im Gewebeverband. Eine wichtige Voraussetzung für die Einführung der ISH zum Nachweis enteroviraler Infektionen ist die molekulare Klonierung und vollständige Sequenzierung von CVB3 (KANDOLF und HOFSCHEIDER 1985, KANDOLF et al. 1985, KLUMP et al. 1990). Unter Verwendung der klonierten viralen cDNS als Gensonde, oder Sonden RNS besteht die Möglichkeit CVB3, hier die Ziel RNS, in einem einzigen diagnostischen Ansatz spezifisch akute und persistente Infektionen nachzuweisen (KANDOLF et al. 1985). Ziel- und Sonden-DNS müssen als Einzelstrang vorliegen, um durch das Bilden eines Hybrids zwischen Ziel- und Sonden-DNS wieder zu einem Doppelstrang vereinigt zu werden. Die Sonden-DNS ist mit autoradiographischen Silberkristallen markiert, welche die Hybridisierung von viraler RNA und einer radioaktiv markierten enterovirus-spezifischen Gensonde erkennbar machen, die dann detektiert und anschließend quantifiziert werden können (DECKER 2001). Auf der lichtmikroskopischen Ebene können diese Silberkristalle einzelnen infizierten Zellen zugeordnet werden. Daraus ergibt sich die Möglichkeit einer ätiologischen Diagnose in Verbindung eines histopathologischen Befundes (KANDOLF et al. 1987).

Ausgeprägte akute enterovirale Infektionsmuster können bei der Neugeborenenmyokarditis identifiziert werden (FOULIS et al. 1990).

Auch bei Patienten mit Dilatativer Kardiomyopathie gelingt ein Nachweis enteroviraler RNS auf diesem Weg (KANDOLF et al. 1993).

### **2.7 Echokardiographische Untersuchungen**

Die Echokardiographie an transgenen Tiermodellen ist bereits von TANAKA et al. (1996a) etabliert worden und liefert einen nützlichen Beitrag zur Beurteilung der Funktionalität des linken Ventrikels (HOIT et al. 1997, WILLIAMS et al. 1998).

Vergleichbare Studien an Hunden haben KASS et al. bereits 1987 durchgeführt.

Als nicht invasive Technik zur Untersuchung und Entwicklung der kardiovaskulären Strukturen und deren Funktion etablieren LEATHERBURY et al. (2003) die ultrasonographische Untersuchung an fetalen Mäusen.

Zur weiteren Differenzierung genetisch veränderter Mäuse hinsichtlich ihrer kardiovaskulären Eigenschaften nutzen sie COLLINS et al. (2003).

Der Einfluss der Wahl des Anästhetikum auf die Herzfunktion, während der echokardiographischen Untersuchung an Mäusen ist von ROTH et al. (2002) untersucht worden. Als Anästhetikum der Wahl sehen sie das Isofluran. Ferner sind der Ablauf der Untersuchung, sowie der genetische Hintergrund der Maus Kriterien für eine Veränderung der Kontraktilität des linken Ventrikels. So zeigen Stickstoffmonoxid-Synthase-defiziente Mäuse vier Monate nach einem myokardialen Infarkt eine verstärkte Kontraktilität des linken Ventrikel im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (SAM et al. 2001).

### **2.8 Das Tiermodell Maus**

Laut DOGGRELL und BROWN (1998) sollten zur ethischen Rechtfertigung des Tiermodells fünf Kriterien erfüllt sein:

- 1) Die menschliche Erkrankung sollte weitestgehend nachgeahmt werden.
- 2) Die provozierte Erkrankung sollte chronisch und stabil sein, um effektive Studien zu ermöglichen.
- 3) Im Tiermodell sollten Symptome reproduzierbar, vorhersehbar und kontrollierbar sein.
- 4) Tierschutzrelevante, ökonomische und technische Aspekte müssen berücksichtigt sein.
- 5) Die Messung von kardiologischen, biochemischen und hämodynamischen Parametern sollte möglich und etabliert sein.

In einer vorangegangenen Studie ist bereits untersucht worden mit welchen Virus-Titern eine Myokarditis induziert werden kann. Auch hier werden die Tiere intraperitoneal infiziert (WESSELY et al. 2001).

CVB3 löst auch bei Menschen eine Myokarditis aus, daher werden alle Untersuchungen an den Tieren, sowie deren Tötung und Organbearbeitung unter der Sterilbank durchgeführt und Abfälle autoklaviert (KLINGEL 1992).

Die Knochenmarktransplantation durch intravenöse Injektion ist eine einfache und vielfach angewendete Methode bei der Maus (IMASAWA 2003, SOARES et al. 2004).

Die Maus als Versuchstier ist nicht nur vom ökonomischen Blickwinkel aus interessant. Durch die Verfügbarkeit verschiedenster transgener bzw. Knock-out-Populationen und deren

## SCHRIFTTUM

---

unkomplizierte und doch tierartgerechte Haltung, sowie kurzen Gestationsabständen und hoher Fertilität, machen die Maus als Tiermodell besonders relevant (HASENFUSS 1998).

### 3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN

#### 3.1 Zielvorstellung und Aufbau der eigenen Arbeit

Ziel der eigenen Studie ist es den Stellenwert des IRF-1 bei der antiviralen Aktivität durch Infektion und Transplantation von IRF-1-/- Tieren und WT-Tieren weiter zu definieren.

Durch die FACS-Analyse wird der Anteil an bestimmten Zell-Fraktionen numerisch festgestellt und kann somit direkt verglichen werden mit den Werten der IRF-1-/- Tiere, der WT- Tiere, infiziert und nicht infiziert, sowie vor und nach Knochenmarktransplantation (KMT).

Durch die ISH zeigt sich im histologischen Zellverband die Menge und die Lokalisation der Virusreplikation bei den oben genannten Gruppen.

Mit dem Plaque-forming-Assay (PFA) wird ein quantitativer virologischer Nachweis in den verschiedenen Organen geführt.

Durch Beobachtung der Mäuse, sowie die per Ultraschall durchgeführten Untersuchungen über die Funktionalität am Mäuseherz, wird eine klinische Aussage über den Verlauf der Untersuchungen getroffen.

Die labortechnische Untersuchung dient dem Nachweis der Erkrankung in den Organen durch spezifische Enzymnachweise.

Einen Überblick über den Ablauf des experimentellen Teils der vorliegenden Studie verschafft die nachfolgende Tabelle 1.

## EIGENE UNTERSUCHUNGEN

---

**Tabelle 1: Darstellung des experimentellen Ablaufs der Untersuchungen.**

<b>IRF-1-/- und WT Gruppen</b>	<b>KMT-Gruppen</b>
n=22	n=26
Sonographische Untersuchung des Herzens zur Beurteilung der Kontraktilität des linken Ventrikel	
Untersuchung der Laborparameter Plaue-forming-Assay FACS-Analyse In-situ-Hybridisierung	
Messung oben genannter Daten vor der Infektion, am Tag 3 und am Tag 7 nach der Infektion mit CVB3	

CVB3: Coxsackievirus B3  
IRF-1-/-: Interferon-Regulator-Faktor-1 defizient  
WT: Wildtyp  
KMT: Knochenmarktransplantation  
n: Anzahl der Tiere

### 3.2 Gliederung des Gesamtprojektes

Das Ziel dieser Studie zugrundeliegenden Gesamtprojektes ist die Charakterisierung des Stellenwertes des Transkriptionsfaktors IRF-1 durch Vergleich von C57 Bl6 / J Wildtyp Mäusen (WT) und C57 Bl6 / IRF-1-defizienten Mäusen (IRF-1<sup>-/-</sup>) nach Infektion mit dem Coxsackievirus B3 (CVB3).

Durch Knochenmarktransplantation von Wildtyp-Knochenmark und IRF-1<sup>-/-</sup> Knochenmark kann die Auswirkung einer Defizienz an IRF-1 während einer CVB3-Infektion untersucht werden.

Der Transkriptionsfaktor IRF-1 soll gerade im Hinblick auf seine Relevanz in Verbindung mit viralen Infektionen genauer definiert werden. Zum Nachweis seiner antiviralen Aktivität und seiner grundlegenden Bedeutung auf die Immunantwort, die Virusreplikation und seines Einflusses auf die Morbidität und Mortalität der Tiere werden verschiedene Untersuchungen durchgeführt. Dazu gehören virologische Nachweise in der Zellkultur, FACS–Untersuchungen und der Virusgenomnachweis mit der In-situ-Hybridisierung (ISH). Außerdem werden Laborparameter bestimmt und echokardiographische Untersuchungen am Herzen durchgeführt.

Die Virusapplikation, Blutentnahmen, Echokardiographische Untersuchungen, Knochenmarkentnahme und -Aufbereitung, Knochenmarktransplantationen und virologischen Titeruntersuchungen werden im Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung und in den Laborräumen der Erwachsenen Kardiologie des Deutschen Herzzentrums durchgeführt.

Die Laborparameter werden von Synlab Vet Augsburg Leitershofstr.25 86157 Augsburg bestimmt.

Die Untersuchungen zur In-situ-Hybridisierung werden im Institut für Molekulare Pathologie der Universität Tübingen von Frau Dr. med. K. Klingel durchgeführt.

Die Bestimmung der verschiedenen Zellpopulationen wird in der Hämatologie der III. Medizinischen Klinik der Technischen Universität München bearbeitet.

### **3.3 Untersuchungsgut und Methodik**

#### **3.3.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen**

Als Versuchstiere werden insgesamt 48 Mäuse (Experiment 1: n=22; Experiment 2: n=26) männliche und weibliche C57 Bl6 / J (Zucht: C57 Bl6 / J BR, Charles River GmbH, Sulzfeld, Deutschland) und C57 Bl6 / IRF-1 Knock-out-Tiere (Zucht: PD Dr. M Lohoff, Institut für Klinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene, Friedrich –Alexander –Universität Erlangen –Nürnberg, Wasserturmstr. 3 91054 Erlangen) verwendet. Die Tiere wiegen zwischen 20 und 25 g und werden in Individually ventilated cages (JVC) untergebracht. Die Mäuse werden bei einer Raumtemperatur von 20 bis 23 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 60 % +/- 10% in unterschiedlichen Gruppenzahlen getrennt-geschlechtlich auf Holzfasereinstreu (Ssniff-bedding-3/4-entstaubt, Ssniff GmbH, Soest) in Makrolonkäfigen (Typ IV, Ehret GmbH, Emmendingen) gehalten. Eine Beleuchtungsanlage sorgt für einen zwölfstündigen Hell-Dunkelrhythmus (in der Hellphase 50 bis 100 LUX im Käfig). Bei dieser Haltungsform der Mäuse wird die ungestörte Gesundheit der Tiere, die für die Versuche notwendig ist, durch regelmäßige serologische, bakteriologische und parasitologische Untersuchungen gewährleistet. Ernährt werden die Tiere mit Standardfutter (Ssniff-Alleinfuttermittel für Ratten und Mäuse R/M-H, Ssniff GmbH, Soest) und Wasser ad libitum.

Das vorliegende Tierversuchsvorhaben wurde von der Regierung von Oberbayern gemäß des §8 des Deutschen Tierschutzgesetzes vom 25.05.1998 genehmigt.

### 3.3.2 Versuchsplan und Gruppeneinteilung

#### 3.3.2.1 EXPERIMENT 1

#### **(Untersuchung und Beurteilung der Überlebenskurve, des Virustiters, der Zellpopulationen sowie der In-situ-Hybridisierung (ISH) )**

Für das Experiment 1 stehen insgesamt 22 Tiere zur Verfügung.

Die Versuchsgruppe (n=6) der Wildtyp-Mäuse (WT) werden mit CVB3 infiziert und am dritten Tag getötet.

Die Kontrollgruppe (n=3) der WT- Mäuse wird nicht infiziert und spontan getötet.

Die Versuchsgruppe (n=6) der IRF-1-/- Mäuse werden mit CVB3 infiziert und am dritten Tag getötet.

Die Kontrollgruppe (n=3) der IRF-1-/- Mäuse ist nicht infiziert und die Euthanasie dieser Tiere wird spontan vorgenommen.

Ferner besteht eine Versuchsgruppe (n=4) aus WT Tieren, welche mit CVB3 infiziert und je nach Allgemeinbefinden am siebten Tag die Euthanasie erfolgt.

Die infizierten Tiere unterstehen in den Tagen nach der Infektion mit CVB3, hinsichtlich ihres Allgemeinbefindens und Verhaltens aufmerksamer Beobachtung.

Von allen Tieren wird kurz vor der Tötung Blut zur Bestimmung der Laborparameter GPT und Lipase entnommen.

Nach Tötung der Tiere durch cervikale Dislokation, kommt es zur Entnahme von sechs Organen (Herz, Lunge, Leber, Milz, Niere und Pankreas) und diese werden zur FACS-Analyse, Titerbestimmung und ISH entsprechend aufbereitet.

Einen Überblick über die Einteilung des EXPERIMENT 1 verschafft die nachfolgende Tabelle 2.

## EIGENE UNTERSUCHUNGEN

---

**Tabelle 2: Einteilung der Versuchsgruppe EXPERIMENT 1 (n=22)**

<b>Experiment 1 n=22</b>	<b>Infektion mit CVB3 Tötung Tag 3 nach der Infektion</b>	<b>Infektion mit CVB3 Tötung Tag 7 nach der Infektion</b>	<b>Nicht infiziert</b>
<b>Versuchsgruppe WT-Mäuse</b>	<b>n=6</b>	<b>n=4</b>	<b>n=3</b>
<b>Versuchsgruppe IRF-1-/- Mäuse</b>	<b>n=6</b>		<b>n=3</b>

IRF-1-/-: Interferon-Regulator-Faktor-1 defizient  
WT: Wildtyp  
CVB3: Coxsackievirus der Gruppe B3  
n: Anzahl der Tiere

### 3.3.2.2 EXPERIMENT 2

#### **(Einfluss der Knochenmarkstransplantation (KMT) auf die CVB3 Infektion IRF-1 defizienter Tiere durch Beurteilung des Virustiters, der Zellpopulationen und der In-situ-Hybridisierung drei und sieben Tage nach der Infektion und der Überlebenskurve)**

Diese Versuchsgruppe beinhaltet insgesamt 26 Tiere. Weitere 5 unbehandelte männliche IRF-1 defiziente Tiere und 5 unbehandelte männliche WT-Tiere werden zur Knochenmarkentnahme getötet.

Eine Versuchsgruppe mit WT- Tieren, bestehend aus acht Mäusen (n=8), wird mit Knochenmark von IRF-1 -/- Mäusen transplantiert (WT<sup>IRF</sup>). Von diesen acht Mäusen werden vier Tiere nach Anwachsen des Knochenmarks mit CVB3 infiziert und nach drei Tagen getötet. Vier Tiere werden als Kontrollgruppe nicht infiziert und spontan getötet.

In der nächsten Versuchsgruppe werden acht IRF-1 -/- Mäuse (n=8) mit Knochenmark von Wildtyp-Mäusen transplantiert (IRF<sup>WT</sup>) und wiederum werden vier Tiere nach Rekonstitution des Knochenmarks mit CVB3 infiziert und nach drei Tagen getötet. Auch hier werden wieder vier Tiere als Kontrollgruppe nicht infiziert und spontan getötet.

In einer anderen Versuchsgruppe werden fünf IRF-1 -/- Mäuse (n=5) mit Knochenmark von Wildtyp-Mäusen transplantiert (IRF<sup>WT</sup>) und mit CVB3 infiziert. Diese Mäuse werden je nach Allgemeinbefinden erst am siebten Tag nach der Infektion getötet, um Aussagen über die Sterblichkeit nach der KMT treffen zu können.

In der letzten Versuchsgruppe werden fünf WT Mäuse (n=5) mit Knochenmark von IRF-1 -/- Mäusen transplantiert (WT<sup>IRF</sup>) und ebenfalls erst am siebten Tag nach der Infektion getötet.

Die infizierten Tiere werden in den Tagen nach der Infektion mit CVB3, hinsichtlich ihres Allgemeinbefindens und Verhaltens aufmerksam beobachtet. Von allen Tieren wird vor der Tötung, zur Bestimmung der Laborparameter GPT und Lipase, Blut entnommen.

Nach Tötung der Tiere durch cervikale Dislokation, werden 6 Organe (Herz, Lunge, Leber, Milz, Niere und Pankreas) entnommen und zur FACS-Analyse, Titerbestimmung und ISH entsprechend aufbereitet.

Einen Überblick über die Versuchsgruppen von EXPERIMENT 2 gibt die Tabelle 3.

## EIGENE UNTERSUCHUNGEN

---

Tabelle 3: Einteilung der Versuchsgruppen von EXPERIMENT 2 (n=26)

<b>Experiment 2 n=26</b>	<b>Infektion mit CVB3 Tötung Tag 3 nach der Infektion</b>	<b>Infektion mit CVB3 Tötung Tag 7 nach der Infektion</b>	<b>Nicht infiziert</b>
<b>Versuchsgruppe WT<sup>IRF</sup>-Mäuse</b>	<b>n=4</b>	<b>n=5</b>	<b>n=4</b>
<b>Versuchsgruppe IRF<sup>WT</sup>-Mäuse</b>	<b>n=4</b>	<b>n=5</b>	<b>n=4</b>

CVB3: Cocksackievirus der Gruppe B3  
WT<sup>IRF</sup>: Wildtyp-Mäuse mit Knochenmark von IRF-1 -/- Mäusen transplantiert  
IRF<sup>WT</sup>: IRF-1 -/- Mäuse mit Knochenmark von Wildtyp-Mäusen transplantiert  
n: Anzahl der Tiere

### 3.4 Versuchsdurchführung

#### 3.4.1 Infektion und Betreuung der Mäuse

Bei den zu infizierenden Tieren handelt es sich um C57 Bl6 / J Mäuse und C57 Bl6 / IRF-1 Knock-out Mäusen, welche zwischen 20 und 25 g wiegen und einen einwandfreien Gesundheitszustand aufweisen.

Das Virus (CVB3) wird bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert, auf Eis aufgetaut und bei Raumtemperatur von ca.  $20^{\circ}\text{C}$  den Mäusen appliziert. Die Infektion wird unter der Sterilbank durchgeführt und die Arbeitsfläche anschließend desinfiziert. Es werden 0,1 ml von CVB3 in einer Verdünnungsstufe von  $10^5$  PFU (Plaque forming units) aufgezogen und der sicher fixierten Maus intraperitoneal verabreicht. Dabei sollte vorzugsweise eine kurze Kanüle mit geringem Durchmesser (Syringe 25 to 27 g,  $\frac{1}{2}$  inch Nadel) verwendet werden, um bei Abwehrbewegungen des Tieres Verletzungen im Abdomen zu vermeiden (siehe Abbildung 2). Danach werden die Mäuse regelmäßig hinsichtlich Allgemeinbefinden, Futteraufnahme, Kotabsatz und Aktivität kontrolliert.



**Abbildung 2: Intraperitoneale Injektion an einer Wildtyp-Maus.**

### 3.4.2 Blutentnahme und Tötung

Da zur Untersuchung der GPT-Aktivität und Lipase-Aktivität Serum von etwa 1ml Vollblut benötigt wird, werden die Mäuse durch i.p. Applikation von Midazolam (DORMICUM ® 5mg/kg KG), Medetomidin (DOMITOR ® 0,5mg/kg KG) und Fentanyl (FENTANYL ® 0,05mg/kg KG), in Narkose gelegt und sobald das Toleranzstadium erreicht ist, Blut durch Herzpunktion entnommen. Die Tiere werden hierzu in Dorsallage gebracht und die Kanüle unter dem Cartilago xiphoideus im Winkel von 20 bis 30° von der Horizontal Achse des Sternums auf das Herz zugeschoben (siehe Abb.3) und nach Punction eines Ventrikels langsam Blut entzogen. Direkt im Anschluss werden die Tiere durch cervicale Dislokation getötet.

Man lässt das Blut etwa eine  $\frac{3}{4}$  Stunde gerinnen und zentrifugiert es dann 10min bei 1200 U/min (Megafuge 1,0 R). Das Serum wird zur Bestimmung der o.g. Laborparameter an das Labor Augsburg (Synlab Vet Augsburg Leitershofenstr. 25 86157 Augsburg) geschickt.



Abbildung 3: Blutentnahme aus dem Herzen einer Wildtyp-Maus.

### **3.4.3 Organentnahme**

Nach Tötung der Tiere durch cervicale Dislokation werden von 6 Organen Proben entnommen. Auch die Organentnahme und Bearbeitung erfolgt unter der Sterilbank, welche danach sorgfältig gereinigt und desinfiziert wird. Von Herz, Lunge, Leber, Milz, Niere und Pankreas werden Teile entfernt und für die In-situ-Hybridisierung in 4% Paraformaldehyd eingelegt und nach 24 Stunden in 70% Ethanol umgebettet. Für die Titerbestimmung mit der Plaque-forming-assay-Methode (PFA) werden die Organproben erst in flüssigem Stickstoff Schock gefroren und danach bei  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

Zur FACS-Analyse wird nur die Milz herangezogen, welche sofort weiter verarbeitet wird (siehe 3.4.4).

### **3.4.4 Organbearbeitung zur FACS-Analyse**

#### **1. Aufarbeitung**

Nach der möglichst schnellen Entnahme der Milz aus dem Tierkörper wird sie (mind. 1/3 des Gesamt-Organs) mit einem Skalpell zerkleinert und mit 20 ml Medium (DULBECCO's Phosphate Buffered Saline Nr.: 8537 Firma: Sigma Eschenstr. 5 82024 Taufkirchen) aufgenommen und zweimal durch einen Filter (Zellsieb  $70\mu\text{m}$  Nylon, Firma Becton Dickinson Laborbedarf Franklin Lakes New York USA, Katalognummer. 352350) gespült, um eine Einzelzellsuspension herzustellen. Die so gewonnene Suspension zentrifugiert man 10 min bei 1200 U/min (Megafuge 1,0 R Heraeus Instrumente Deutschland). Der Überstand wird abgezogen und verworfen.

#### **2. Antikörperfärbung**

Zur Antikörperfärbung bereitet man 96 Well-Platten mit Rundboden vor und markiert die Wells (pro Ansatz ein well).

Das Zellpellet wird in PBS BSA (Phosphate Buffered Saline) aufgenommen, es wird etwa  $100\mu\text{l}$  pro Ansatz verwendet. Diese Lösung wird gut resuspendiert und  $100\mu\text{l}$  von dieser Zellsuspension je well aufgetragen.

Zu allen Färbungen wird ein sogenannter Fc- Block und ein Antikörper aufgetragen: CD 45-Cy-Chrom Anti Maus, Firma Pharmingen,  $0,1\text{mg}/0,5\text{ml}$  Nr: 553082, welcher alle Leukozyten

## EIGENE UNTERSUCHUNGEN

---

anfärbt. Von dem Fc- Block und dem CD 45 Antikörper werden je 10 $\mu$ l in 180 $\mu$ l PBS-BSA vermischt und davon 5 $\mu$ l pro well aufgetragen.

Als Einzelansätze werden hier Antikörper gegen zum Beispiel CD 11b- Phycoerythrin (PE) Anti Maus (Integrin  $\alpha$ M chain) 0,2mg/ml, Firma Pharmingen, Nr: 553311 verwendet, davon werden 5 $\mu$ l in 50 $\mu$ l PBS-BSA gemischt und 5 $\mu$ l pro Ansatz aufgetragen. Dieser Ansatz färbt alle myeloiden Zellen an.

Zur Anfärbung der B-Zellen verwendet man den Antikörper CD 45/ B220- PE Anti Maus 0,2mg/ ml, auch von diesem werden 5 $\mu$ l in 50 $\mu$ l PBS-BSA gelöst und 5 $\mu$ l pro Ansatz appliziert.

Zur Anfärbung der Zellen (Thy1.2, CD4, CD8, CD11b und B220) kommt der Antikörper CD 90- PE Anti Maus (0,2mg/ ml, Firma Pharmingen, Nr:553006) in oben beschriebener Verdünnung zur Anwendung.

Von der genannten Fc- Block/ CD 45 Mischung werden nun 5 $\mu$ l pro well aufgetragen und mit der Zellsuspension resuspendiert. Danach gibt man die übrigen Antikörper in die jeweiligen Ansätze und resuspendiert die Lösungen.

Darauf folgt die Inkubation von einer Stunde bei 4°C.

### 4. Waschen

Nach der Inkubation erfolgt die Zentrifugation der 96 well Platte bei 1200 rpm, 4°C über 5min (Megafuge 1,0 R, Heraeus Instrumente Deutschland). Anschließend wird der Überstand verworfen.

Mit einer Multipipette wird das verbliebene Zellpellet mit 150 $\mu$ l PBS-BSA pro well vorsichtig resuspendiert und erneut wie oben zentrifugiert. Dieser Vorgang wird dreimal wiederholt.

### 5. Messung

Zum Rest PBS-BSA wird nun Propidiumjodid (5mg/ ml) hinzugegeben in einer Verdünnung von 2 $\mu$ l auf 20ml.

Direkt vor der Messung einer Probe legt man sich etwa 400 $\mu$ l PBS-BSA- Propidiumjodid vor, welches dann der Zellsuspension zugegeben wird. Nach Durchmischung dieser Suspension kann die Messung beginnen.

## EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Die Proben werden nun mit dem FACS Gerät EPICS ® XL der Firma Beckman Coulter (Beckman Coulter GmbH Europark Fichtenhain B13 47807 Krefeld Deutschland) gemessen und ausgewertet (siehe Abb. 4).

Dabei wird jede Zelle durch einen Punkt repräsentiert und durch zwei Werte beschrieben (x-y Darstellung).

Die Achsen repräsentieren die Lichtintensitäten (siehe Abb. 4).

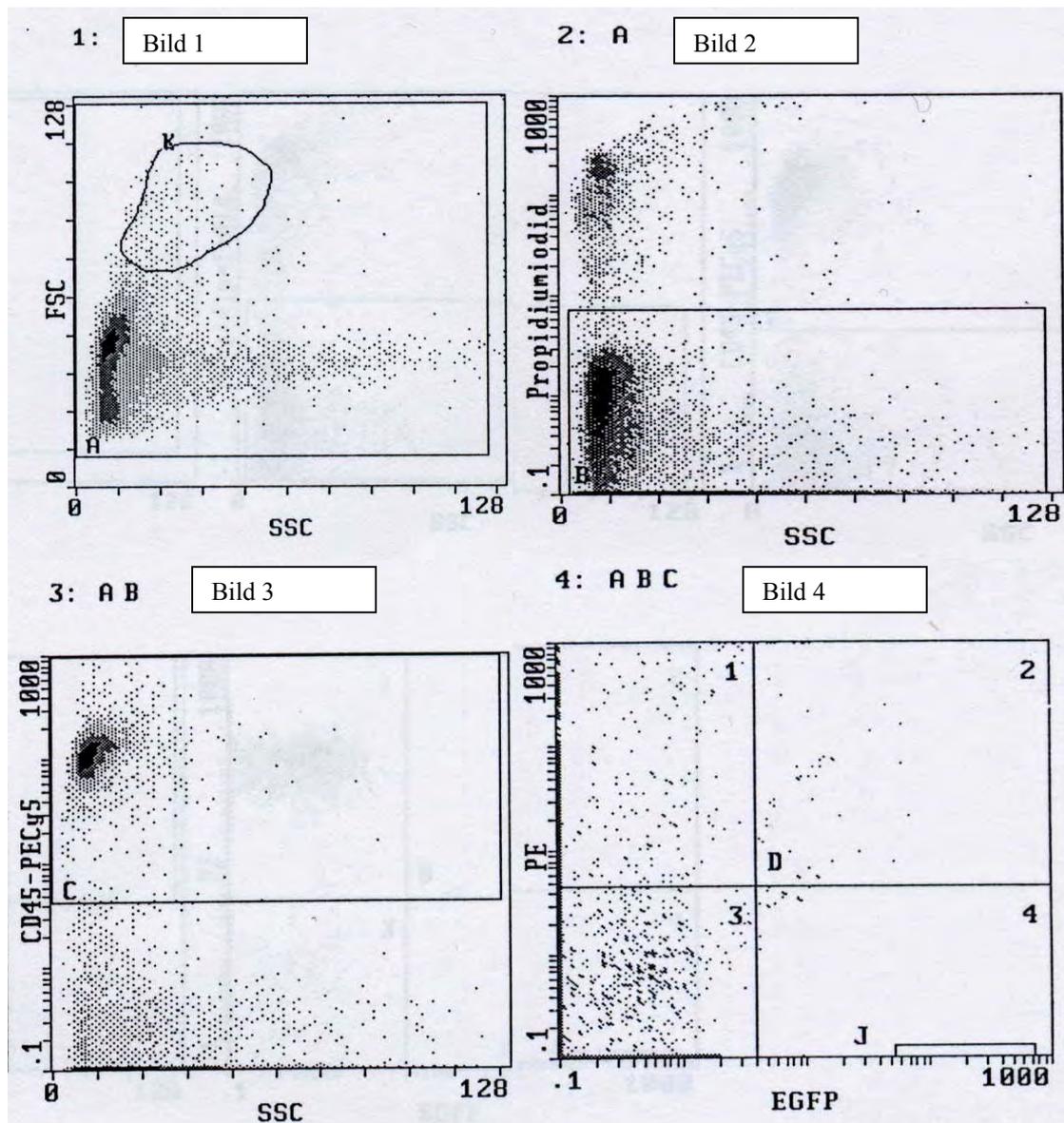


Abbildung 4: Punktwolkendarstellung durch das FACS Gerät der Firma Beckman Coulter eines Wildtyp Tieres am dritten Tag nach der Infektion.

**Bild 1 der Abb. 4:** Dieses Bild zeigt mit den Parametern Seitwärtsstreulicht (SSC) die Lichtbrechung und Reflexion gemessen im 90° Winkel proportional zur Granularität und

Vorwärtsstreulicht (FSC) die Lichtbeugung gemessen entlang der Achse einfallenden Lichts proportional zur Zellgröße (siehe Abb. 5).



Abbildung 5: Merkmale des FSC und SSC nach der FACS Academy aus dem Becton Dickinson Trainings-Handbuch.

Durch Setzen des ersten Analysefensters (Gate A) kann ein Ausschluss von Detritus und Zellklumpen erfolgen.

**Bild 2 der Abb. 4:** Dieses Bild zeigt mit den Parametern Propidiumjodid (PI) und SCC eine Unterteilung in tote und vitale Zellen. Eine Abgrenzung der toten Zellen findet durch Gate B statt. PI negative Zellen sind vitale Zellen, da PI nur bei nicht intakter Zellmembran in den Zellkern eindringen kann (Interkalation).

**Bild 3 der Abb. 4:** Dieses Bild zeigt durch den Antikörper CD45 Cy5 und SCC eine Filterung, deutlich gemacht durch Gate C, der Leukozyten und Abtrennung von Erythrozyten, Thrombozyten und anderen nicht hämatopoetischen Zellen. In Gate C sind nur noch vitale Leukozyten zu sehen.

**Bild 4 der Abb. 4:** Dieses Bild zeigt nun durch Punktwolkendarstellung die drei zuvor gesetzten Gates (A, B und C). Im vierten Gate D wird durch den jeweilige Antikörper (CD11b, B220, CD4, CD8 und Thy1.2) und das Fluorochrom Phycoerythrin eine weitere Zellpopulation abgegrenzt.

Alle Signale werden vom FACS Gerät aufgelistet und in Prozent angegeben.

### 3.4.5 Knochenmarkgewinnung

Knochenmark wird nur von männlichen Spendertieren entnommen. Femur, Tibia und Fibula werden mit einem Skalpell von Muskeln und Sehnen befreit und die Epiphyse eröffnet. Einen Zugang zum Knochenmarkskanal wird mit einer dünnen Kanüle gebohrt und anschließend mit VLE RPMI Medium 1640 (Firma Biochrom AG Stuttgart, Katalognummer: F1415, versetzt mit 1% Glutamin, 1% Penicillin-Streptomycin und 10% FCS) das Knochenmark ausgespült. Durch Filterung (Zellsieb 70µm Nylon, Firma Becton Dickinson Laborbedarf Franklin Lakes New York USA, Katalognummer: 352350) wird eine Einzelzellsuspension hergestellt und der Zellgehalt anschließend in der NEUBAUER Zählkammer ausgezählt.

Daraufhin wird die Zellsuspension fünf Minuten bei 1200 U/min zentrifugiert (MEGAFUGE 1.0 R), der Überstand abgesaugt und das Pellet mit HANKS' Balanced Salt Solution (SIGMA CHEMICAL CELL CULTURE) resuspendiert. Die Zellsuspension ist damit bereit zur intravenösen Injektion.

### 3.4.6 Bestrahlung und Knochenmarktransplantation (KMT)

Vor der Knochenmarktransplantation werden die Empfänger-Mäuse in einem Bestrahlungsapparat mit der Strahlenquelle Caesium 137 (Firma Buchler GmbH Braunschweig) verbracht und mit einer subletalen Dosis von ca. 8,5 Gray 220 sec bestrahlt, um ihr Knochenmark zu inaktivieren. Die Tiere werden zur Bestrahlung zu zweit in einen Plastiktopf gesetzt, dabei sind sie keinen Schmerzen ausgesetzt.

Das gewonnene Knochenmark wird den bestrahlten weiblichen und über 16 Wochen alten Empfängertieren intravenös verabreicht, nachdem mit einer Wärmelampe etwa 10 min lang der Käfig mit den Mäusen erwärmt wird, damit die Schwanzvenen zur Punktion sichtbar sind und ein sicheres Platzieren der Kanüle möglich ist. Zur Injektion werden die Tiere in einem Mouse Restrainer (siehe Abb.6) fixiert, an dessen Ende der Schwanz herausgezogen werden kann.

Sodann werden etwa 20 Einheiten einer Insulin-Spritze (BD MICRO-FINE U-40 Insulin 29G) von der Knochenmark-Zellsuspension injiziert und die Tiere wieder in den Käfig verbracht. Über 10 bis 14 Tage bekommen die Mäuse per os ein Antibiotikum (Firma BAYER CIPROBAY 100 5mg/kg KG zweimal täglich) verabreicht. Die Tiere verbleiben nun 6-8 Wochen im Käfig.

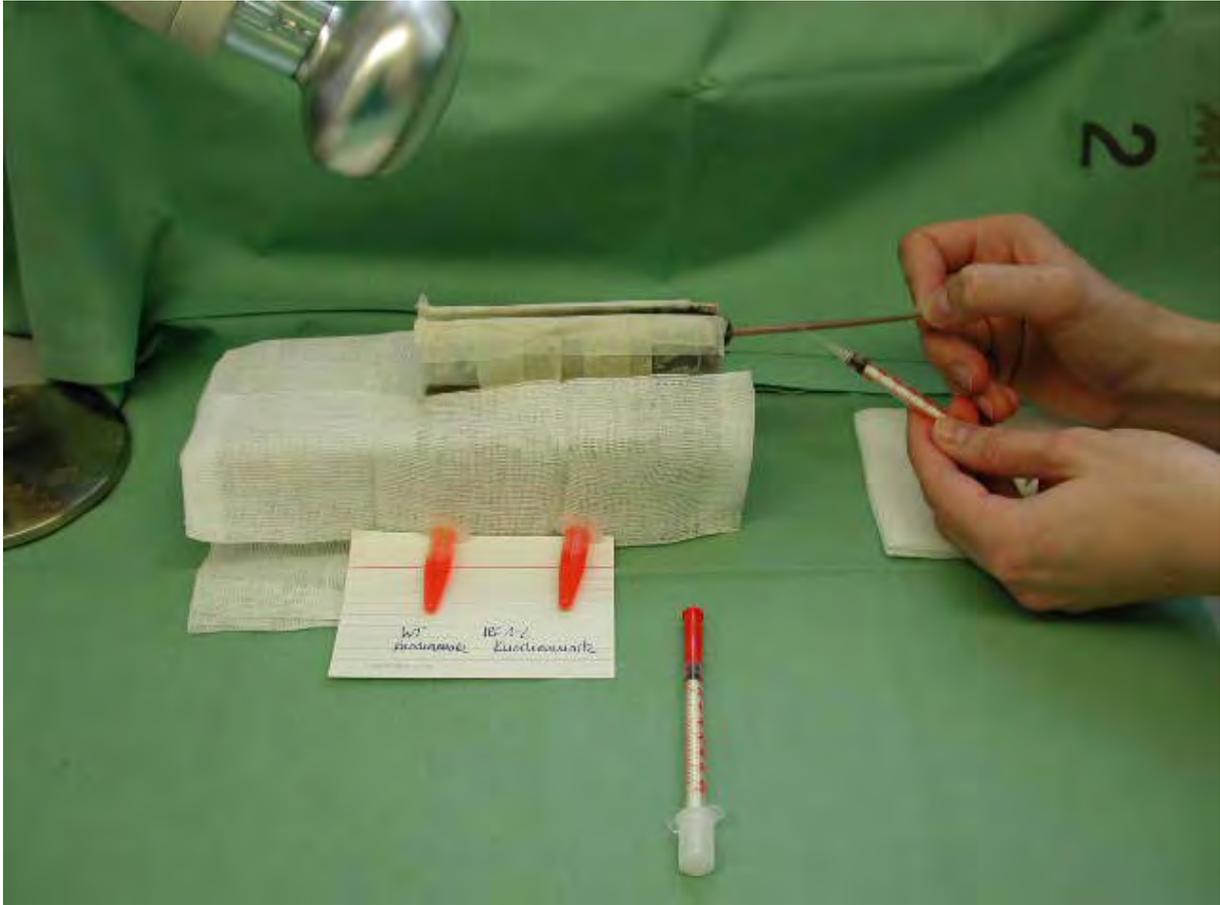


Abbildung 6: Durchführung der Knochenmarktransplantation, das Tier befindet sich im Mouse Restrainer und wird mit einer Wärmelampe bestrahlt.

### 3.4.7 Plaque-forming-Assay

In verschiedenen Arbeitsschritten wird der Virustiter in den zuvor genannten Mäuseorganen bestimmt.

Zuerst werden die Organe gewogen, um hinterher den Virustiter pro Gramm Organ bestimmen zu können.

Darauf folgt die Homogenisierung, der in 1ml DMEM (GIBCO) eingelegten Organe im Homogenisator (Art - Micra D8) bei ca. 25k rpm unter dem Abzug.

Nach dreimaligem Einfrieren (bei  $-70^{\circ}\text{C}$ ) und Auftauen wird die Suspension 10 min bei 4300 rpm zentrifugiert (Megafuge 1,0R) und der Überstand in Kryovialröhrchen transferiert.

Aus diesem Überstand kann nun die Verdünnungsreihe hergestellt werden.

Mit HeLa-Zellen (siehe Kapitel 3.4.6.1) wird in 12-Well-Platten ein konfluenten Zellrasen gezüchtet auf welchen die Verdünnungsreihen und eine Kontrolle (bestehend aus Medium) aufgetragen werden. Dieser Vorgang stellt die Infektion der Zellen dar.

Nach einer Stunde im Brutschrank wird der Overlay mit einer Pipette gleichmäßig aufgetragen und etwa eine Stunde bei Raumtemperatur stehen gelassen, bis der Overlay sich verfestigt hat.

Dieser Overlay ist ein 1:1 Gemisch aus 3,9g Sea Plaque Agarose (Firma BIO WITTAKER Katalognummer: 50101) gelöst in 160 ml doppelt destilliertem Wasser und 2x DMEM (5,4g DULBECCO's Modifiziertes Eagle Medium (Firma Gibco Invitrogen Corporation, Technologiepark Karlsruhe, Katalognummer: 52100-039) mit 8 ml FCS (Fetales Kalb Serum hitzeinaktiviert, Firma Gibco Invitrogen Corporation, Karlsruhe, Katalognummer: 26170-043), 4ml Penicillin-Streptomycin (Lösung mit 10,000 units Penicillin und 10mg Streptomycin pro ml in 0,9 % Natrium-Chlorid (Firma Sigma, Taufkirchen Katalognummer: P0781), 20ml Natrium Bicarbonat (7,5% Natrium Bikarbonat, Firma Gibco Invitrogen Corporation, Karlsruhe, Katalognummer: 25080-060), 4ml Natrium Pyruvat (Natrium Pyruvat, Firma Gibco Invitrogen Corporation, Karlsruhe, Katalognummer: 11360-039) und ca. 160ml doppelt destilliertem Wasser ist.

Der pH Wert dieser Mischung sollte nach Sterilfiltration bei etwa 6,9 liegen.

Wenn die Plaques nach etwa 2-3 Tagen groß genug sind, werden die Zellen mit einem Essigsäure-Methanol-Gemisch im Verhältnis 1:3 fixiert.

Nach kurzem Einwirken werden Überstand und Agar abgekippt, vorsichtig unter fließend Wasser gewaschen und mit 1,5% Kristallviolett gefärbt.

Nach Trocknung sind die Plaques auszählbar und daraus der Virustiter pro Gramm des jeweiligen Organ zu bestimmen (siehe Abb. 7).

### **3.4.7.1 Kultur von HeLa-Zellen (epitheliale Cervix Zellen eines humanen Adenokarzinom)**

Grundlage der Plaque-forming-Assays (Abb. 6) ist das Aussäen von HeLa-Zellen, welche später infiziert werden.

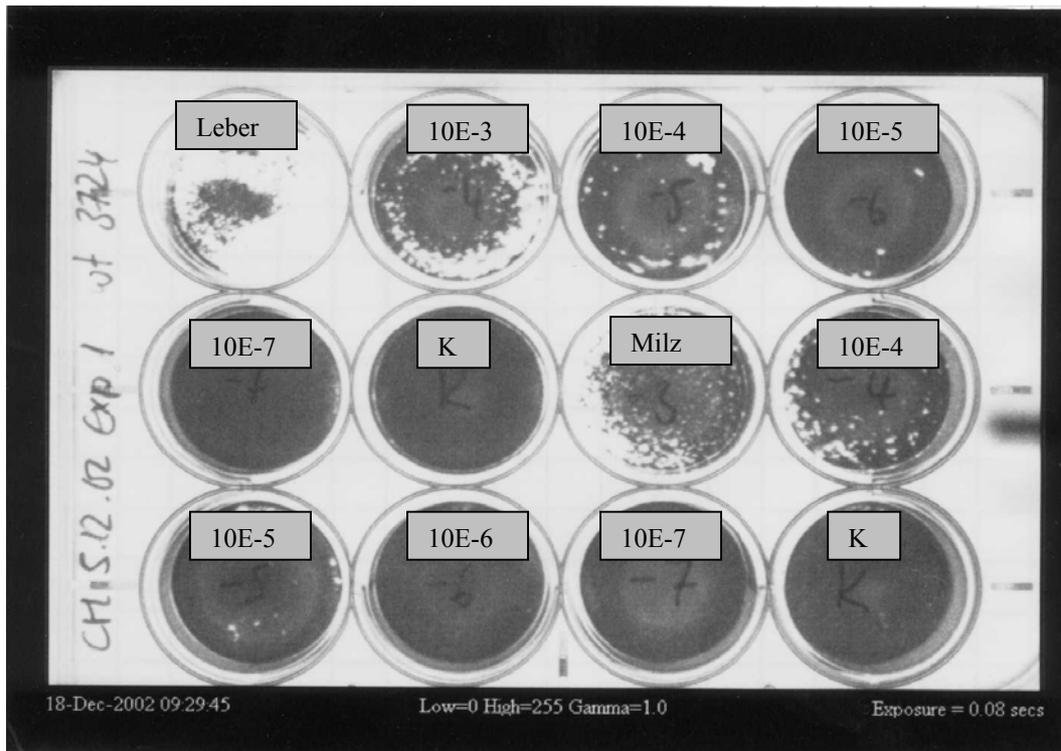
Diese HeLa-Zellen (ATCC-PROMOCHEM / LGC) werden in flüssigem Stickstoff aufbewahrt, zum Gebrauch im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut, in die vorbereitete Kulturflasche (175 cm<sup>2</sup>) mit angewärmten Medium (DMEM mit Glutamax; Fa. GIBCO, 1% Penicillin/Streptomycin der Firma SIGMA, 5 % FCS (hitzeinaktiviertes fetales Kalb Serum) Firma GIBCO) pipettiert und durch leichtes Schwenken verteilt.

Steriles Arbeiten, Abflammen und Desinfektion sind bei allen Arbeitsgängen angezeigt, um Kontaminationen zu vermeiden.

Die Kulturflasche wird dann im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert und nach 12-24 h, nach Adhärenz der Zellen, das Medium gewechselt.

Bei etwa 90-100 % Konfluenz der Zellen werden diese auf folgende Weise gesplittet:

Das Medium wird abgesaugt und die Zellen mit 5-10 ml DPBS (DULBECCO'S PHOSPHATE BUFFERED SALINE Firma SIGMA) gewaschen, um Reste des Mediums zu entfernen. Daraufhin werden 3 ml TRYPSIN / EDTA- Lösung (Firma GIBCO Invitrogen Corporation Katalognummer: 25300-054) in die Flasche pipettiert, durch leichtes Schwenken verteilt und für einige Minuten in den Brutschrank verbracht. Durch leichtes Klopfen an die Flasche lösen sich die Zellen und können dann mit Medium ausgespült werden. Nach Zählung der Zellen (NEUBAUER ZÄHLKAMMER ) werden diese erneut in 175 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen verbracht oder für den Plaque-forming-Assay in 12 Wells ausgesät.



**Abbildung 7: Plaque-forming-Assay eines WT Tieres am dritten Tag nach Infektion in der Leber und Milz in den Verdünnungsstufen 10E-3 bis 10E-7 und Kontrollen (K).**

Abb. 7 zeigt den Plaque-forming-Assay auf einer 12 well Platte. In die Wells wurden HeLa-Zellen ausgesät und ein konfluenter Zellrasen erzeugt, darauf werden 150 µl der Verdünnungsreihen der Leber und Milz von 10E-3 bis 10E-7 auf den Zellrasen pipettiert (siehe 3.4.7).

Das Virus zerstört die HeLa- Zellen und der vorher konfluente Zellrasen zeigt Lücken, sogenannte Plaques, welche in einer Verdünnungsstufe ausgezählt werden, in der man die Plaques gut voneinander abtrennen kann.

Durch Verrechnung des Organgewichtes, der auf den Zellrasen aufgetragenen Menge an Organverdünnung und der Zahl der ausgezählten Plaques bei der jeweiligen Verdünnungsstufe kann der Virustiter des jeweiligen Organs in plaque-forming-units (pfu) ermittelt werden.

Zur Berechnung bedient man sich folgender Formel:

$$\frac{1}{\text{g Organ}} \times \frac{1000 \mu\text{l Verdünnung insges.}}{150 \mu\text{l tatsächl. Menge}} \times \text{Verdünnungsstufe} \times \text{Plaques}$$

### 3.4.8 In-situ-Hybridisierung

Nach Entnahme aus dem Tierkörper werden die Organe für die In-situ-Hybridisierung in 4% Paraformaldehyd eingelegt und 24 Stunden später in 70% Ethanol umgebettet.

Unter Verwendung der klonierten viralen cDNS als Gensonde, oder Sonden RNS besteht die Möglichkeit CVB3, hier die Ziel RNS, in einem einzigen diagnostischen Ansatz spezifisch akute und persistente Infektionen nachzuweisen. Ziel und Sonden DNS müssen als Einzelstrang vorliegen, um durch das Bilden eines Hybrids zwischen Ziel und Sonden DNS wieder zu einem Doppelstrang vereinigt zu werden. Die Sonden DNS ist mit autoradiographischen Silberkristallen markiert, welche die Hybridisierung von viraler RNA und einer radioaktiv markierten enteroviruspezifischen Gensonde erkennbar machen, die dann detektiert und anschließend quantifiziert werden können. Auf der lichtmikroskopischen Ebene können diese Silberkristalle einzelnen infizierten Zellen zugeordnet werden. Daraus ergibt sich die Möglichkeit einer ätiologischen Diagnose in Verbindung eines histopathologischen Befundes.

Die In-situ-Hybridisierung wird von Frau Dr. med. K. Klingel im Institut für Molekulare Pathologie der Universität Tübingen durchgeführt.

Die Menge an detektiertem Virusgenom ist in einen Bereich von eins bis vier eingegrenzt. Bereich eins steht für einen sehr niedrigen Virusgenomgehalt, während Bereich vier für einen sehr hohen Gehalt an CVB3 Virusgenomen steht.

### 3.4.9 Untersuchung der linksventrikulären Kontraktilität

Zur Untersuchung der Auswirkungen der CVB3 Infektion auf den Herzmuskel und dessen Funktionalität nach 0, 3 und 7 Tagen post infectionem bedient man sich des Herzultraschalls. Hierzu werden die Mäuse mit 1,5% Isofluran (FORENE® Abbot GmbH, Wiesbaden) in Sauerstoff (Firma. Linde, München) in Narkose gelegt, im Brustbereich rasiert und mit einer 10MHz Sonde auf einer 100mm x 100mm x 10mm dicken Sonopad Vorlaufstrecke (Firma SONOTEC Ultraschallsensorik Halle GmbH Gutenbergstr. 1-2 06112 Halle-Saale Best.Nr.: 04011001) auf dem Bauch liegend untersucht.

Durch Einsatz der oben genannten Vorlaufstrecke ist eine bestmögliche Auflösung und hohe Abbildungsgüte zu erreichen. Außerdem ist durch diese Silikon-Kunststoffmischung nur eine geringe Varianz hinsichtlich des Abstandes zwischen Schallkopf und Maus möglich.

Dabei wird versucht möglichst wenig Druck auf die Brustwand auszuüben.

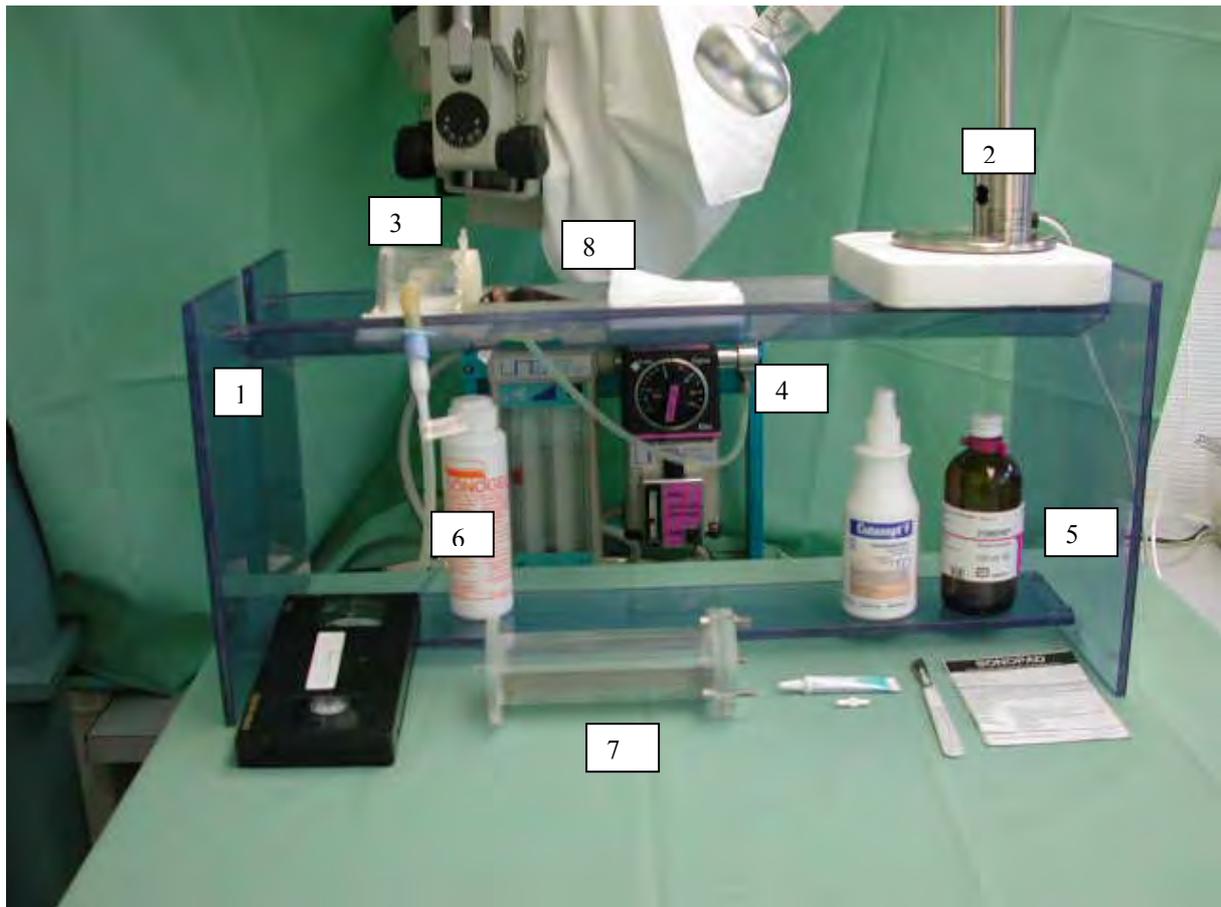
Bei dem verwendeten Gerät handelt es sich um ein Vingmed Technology „Vivid Five“ Ultraschall-Gerät der Firma GE Ultraschall, Solingen.

Während der Untersuchung liegt die Maus auf einem Gestell aus Plexiglass, welches es ermöglicht von unten parasternal durch die Vorlaufstrecke zu schallen, während die Maus über eine Kopfkammer spontan atmend das Narkosegas inspiriert.

Während der Untersuchung ist ein EKG angeschlossen und die Körpertemperatur der Maus wird mit einem Thermometer überwacht. Gegebenenfalls kann die Maus mit einer Wärmelampe gewärmt werden (siehe Abb. 8).

Durch die Messung der Distanzen des linken Ventrikel in der Systole und Diastole (siehe Abb. 15) kann die Kontraktilität in Prozent errechnet werden:

$$\frac{\text{Diastole [mm]} - \text{Systole [mm]}}{\text{Diastole [mm]}} \times 100 = \text{FS [\%]}$$



- 1 = Plexiglassapparatur
- 2 = Wärmelampe
- 3 = Kopfkammer mit Zu- und Ableitungsschläuchen
- 4 = Narkosegerät
- 5 = Flasche Isofluran und Cutasept
- 6 = Ultraschall Kontaktgel
- 7 = Präoxygenierungskammer bzw. zur Narkoseeinleitung
- 8 = Maus auf Vorlaufstrecke liegend

**Abbildung 8: Ansicht auf die Apparatur zur echokardiographischen Untersuchung: Die Maus liegt auf der Vorlaufstrecke; von unten wird der Schallkopf durch die Öffnung in der Plexiglassapparatur (1) hindurch parasternal an die Maus gehalten.**

### 3.4.10 Statistische Berechnung und Dokumentation

Die statistische Auswertung erfolgt mit SPSS 11.5 (SPSS Inc., Chicago, USA). Es erfolgt die Bestimmung von Mittelwert und Standardabweichungen (deskriptive Masszahlen) für die Ergebnisse aller Versuche. Bivariate Vergleiche wurden durch den Mann-Whitney-U Test durchgeführt. Adjustierung für multiples Testen wurden nicht vorgenommen. Alle Tests beziehen sich auf eine zweiseitige Fragestellung.

Für die Berechnung der Irrtumswahrscheinlichkeit wird ein Wert von  $p < 0,05$  als statistisch signifikant, Werte von  $p < 0,01$  als statistisch hochsignifikant beurteilt. Nicht statistisch

## **EIGENE UNTERSUCHUNGEN**

---

signifikante Werte sind als „n.s.“ gekennzeichnet. Statistisch signifikante Werte werden mit „s.“ gekennzeichnet.

3.5 Ergebnisse

3.5.1 Sterblichkeit nach Infektion

Die folgende Abbildung zeigt den Verlauf der Überlebenskurve in den einzelnen Gruppen.

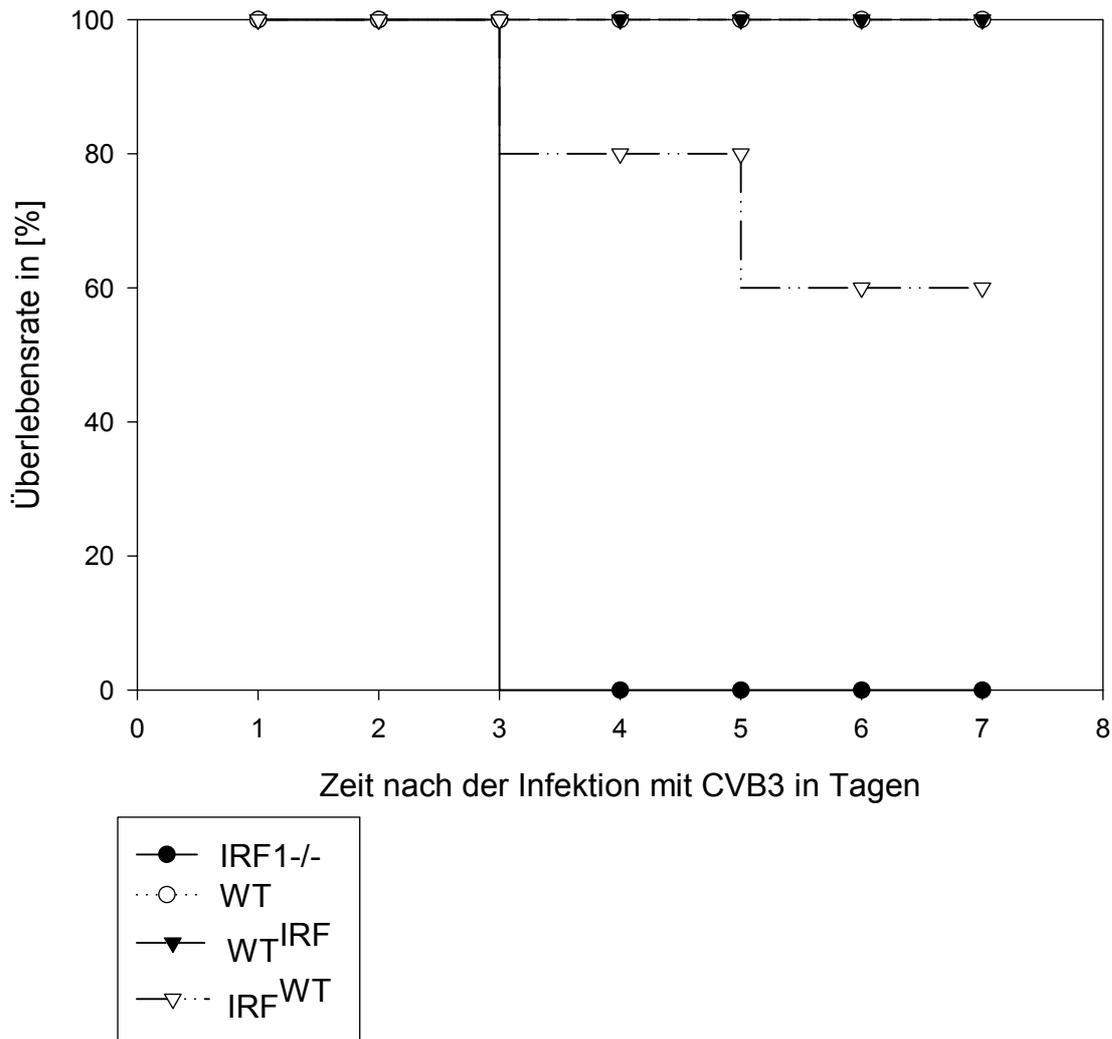


Abbildung 9: Überlebenskurve der transplantierten und nicht transplantierten Gruppen aus Experiment 1 und 2 nach der Infektion mit CVB3.

Die Überlebenskurve in Abbildung 9 zeigt, dass von der Testgruppe der Wildtypiere (n = 9) alle Tiere den Tag sieben nach der Infektion mit CVB3 überlebt haben, wohingegen alle Tiere der Testgruppe der IRF-1-/- Mäuse (n = 9) am dritten Tag verstorben sind.

Ferner überleben 80% der IRF-1-/--Tiere (IRF<sup>WT</sup>), welche nach der Bestrahlung Knochenmark von Wildtypieren erhalten haben bis zum fünften Tag, 60% überleben bis zum siebten Tag.

## EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Die Wildtyptiere (WT<sup>IRF</sup>), welche nach der Bestrahlung Knochenmark von IRF-1<sup>-/-</sup> Tieren erhalten haben überleben bis zum siebten Tag.

### 3.5.2 Ergebnisse der Titeranalyse durch Plaque-forming-Assay (PFA)

#### 3.5.2.1 Titer der Gruppen aus Experiment 1 am Tag 3 und 7 in den Organen Herz, Lunge, Leber, Milz und Niere.

Von allen infizierten Tieren sind Herz, Lunge, Leber, Milz und Niere zur Titeranalyse entnommen worden.

In der Gruppe der IRF-1<sup>-/-</sup> Mäuse haben keine Tiere den dritten Tag nach der Infektion überlebt, daher sind keine Ergebnisse dieser Mäuse am siebten Tag vorhanden.

Von den Kontrolltieren, welche nicht infiziert sind, wurden keine Plaque-forming-Assay angefertigt.

**Tabelle 4 : Ermittelte Daten der PFA-Analyse bei WT und IRF-1<sup>-/-</sup> am dritten Tag nach der Infektion in den Organen Herz, Lunge, Leber, Milz und Niere.**

Gruppe	Titer [pfu/g Organ]				
PFA	Herz	Lunge	Leber	Milz	Niere
WT 3d	8.880.000	1.024.615	24.420.000	2.623.636	198.805
	8.880.000	164.444	3.586.153	2.378.571	262.894
	4.036.364	249.750	95.142.857	71.357.142	15.488.372
	3.600.000	95.142	19.821.428	14.568.750	-
	3.552.000	2.775.000	10.325.581	1.902.857	9.123.288
	3.552.000	4.440.000	222.000.000	15.670.588	33.300.000
<b>MW</b>	<b>5.416.727</b>	<b>1.458.159</b>	<b>62.549.337</b>	<b>18.083.591</b>	<b>9.728.893</b>
<b>STABW</b>	<b>2.688.823</b>	<b>1.777.930</b>	<b>84.817.863</b>	<b>26.846.683</b>	<b>13.146.973</b>
IRF1 <sup>-/-</sup> 3d	1.332.000	1.856.065	13.058.823	11.892.857	624.375
	2.283.428	4.440.000	19.980.000	11.100.000	756.818
	1.051.579	1.332.000	8.880.000	17.482.500	634.285
	3.330.000	2.664.000	49.950.000	7.215.000	1.737.391
	2.296.551	512.307	3.330.000	11.988.000	2.171.739
<b>MW</b>	<b>2.058.711</b>	<b>2.160.874</b>	<b>19.039.764</b>	<b>11.935.671</b>	<b>1.184.921</b>
<b>STABW</b>	<b>903.557</b>	<b>1.495.431</b>	<b>18.317.449</b>	<b>3.665.888</b>	<b>721.061</b>
<b>p-Wert</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
<b>Signifikanz</b>	<b>n.s.</b>	<b>n.s.</b>	<b>n.s.</b>	<b>n.s.</b>	<b>n.s.</b>

WT: Wildtyp  
 IRF-1<sup>-/-</sup>: Interferon-Regulator-Faktor 1 defizient  
 MW: Mittelwert  
 STABW: Standardabweichung

## EIGENE UNTERSUCHUNGEN

p-Wert: Irrtumswahrscheinlichkeit  
n.s.: nicht signifikant  
s.: signifikant  
d3: Tag 3 nach der Infektion

Bei der Virustiteranalyse der Organe Herz, Lunge, Leber, Milz und Niere ergibt sich kein signifikanter Unterschied in der Höhe der Virustiter drei Tage nach der Infektion zwischen den Testgruppen (siehe Tabelle 4).

**Tabelle 5 : Ermittelte Daten der PFA-Analyse bei WT-Tieren am dritten und siebten Tag nach der Infektion in den Organen Herz, Lunge, Leber, Milz und Niere.**

Gruppe	Titer [pfu/g Organ]				
PFA	Herz	Lunge	Leber	Milz	Niere
WT 3d	8.880.000	1.024.615	24.420.000	2.623.636	198.805
	8.880.000	164.444	3.586.153	2.378.571	262.894
	4.036.364	249.750	95.142.857	71.357.142	15.488.372
	3.600.000	95.142	19.821.428	14.568.750	0
	3.552.000	2.775.000	10.325.581	1.902.857	9.123.288
	3.552.000	4.440.000	222.000.000	15.670.588	33.300.000
<b>MW</b>	<b>5.416.727</b>	<b>1.458.159</b>	<b>62.549.337</b>	<b>18.083.591</b>	<b>9.728.893</b>
<b>STABW</b>	<b>2.688.823</b>	<b>1.777.930</b>	<b>84.817.863</b>	<b>26.846.683</b>	<b>13.146.973</b>
WT 7d	13.320	0	0	0	0
	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0
<b>MW</b>	<b>4.440</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>STABW</b>	<b>7.690</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>p-Wert</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>Signifikanz</b>	<b>s.</b>	<b>n.s.</b>	<b>n.s.</b>	<b>n.s.</b>	<b>n.s.</b>

WT: Wildtyp  
IRF-1-/: Interferon-Regulator-Faktor 1 defizient  
MW: Mittelwert  
STABW: Standardabweichung  
p-Wert: Irrtumswahrscheinlichkeit  
n.s.: nicht signifikant  
s.: signifikant  
d3: Tag 3 nach der Infektion  
d7: Tag 7 nach der Infektion

Die Untersuchung der Virustiter am dritten und am siebten Tag nach der Infektion mit CVB3 zeigt im Organ Herz eine signifikante Abnahme der Viruslast [Herz: p-Wert: 0,029 = s.].

In den Organen Lunge, Leber, Milz und Niere ist aufgrund der hohen Standardabweichungen am dritten Tag kein signifikanter Unterschied festzustellen, am siebten Tag nach der Infektion ist kein Virus mehr nachweisbar.

## EIGENE UNTERSUCHUNGEN

### 3.5.2.2 Titer der Gruppen aus Experiment 2 am Tag 3 und 7

Von allen infizierten Tieren sind Herz, Lunge, Leber, Milz und Niere zur Titeranalyse entnommen worden.

**Tabelle 6 : Ermittelte Daten der PFA Analyse an den transplantierten Gruppen in den Organen Herz, Lunge, Leber, Milz und Niere am dritten Tag nach der Infektion.**

Gruppe	Titer [pfu/g Organ]				
PFA	Herz	Lunge	Leber	Milz	Niere
IRF <sup>WT</sup> 3d	341.538	701.053	4.995.000	7.051.765	2.018.182
	999.000	518.000	9.081.818	8.325.000	1.070.357
	4.662.000	2.331.000	17.526.315	11.100.000	6.660.000
	666.000	1.332.000	17.793.893	4.329.000	5.994.000
<b>MW</b>	<b>1.667.134</b>	<b>1.220.513</b>	<b>12.349.256</b>	<b>7.701.441</b>	<b>3.935.634</b>
<b>STABW</b>	<b>2.014.538</b>	<b>818.326</b>	<b>6.356.289</b>	<b>2.912.736</b>	<b>2.801.515</b>
WT <sup>IRF</sup> 3d	1.332.000	1.332.000	6.660.000	7.992.000	4.662.000
	1.332.000	701.052	7.326.000	3.996.000	1.332.000
	1.998.000	5.328.000	13.320.000	3.330.000	5.661.000
	4.440.000	8.658.000	13.875.000	14.152.500	5.661.000
<b>MW</b>	<b>2.275.500</b>	<b>4.004.763</b>	<b>10.295.250</b>	<b>7.357.625</b>	<b>4.329.000</b>
<b>STABW</b>	<b>1.476.758</b>	<b>3.717.604</b>	<b>3.829.500</b>	<b>4.969.729</b>	<b>2.052.749</b>
<b>p-Wert</b>	<b>0,286</b>	<b>0,400</b>	<b>0,686</b>	<b>0,686</b>	<b>0,800</b>
<b>Signifikanz</b>	<b>n.s.</b>	<b>n.s.</b>	<b>n.s.</b>	<b>n.s.</b>	<b>n.s.</b>

IRF<sup>WT</sup>: Interferon-Regulator-Faktor 1 defiziente Tiere wurden mit Knochenmark von Wildtyptieren transplantiert.

WT<sup>IRF</sup>: Wildtyptiere wurden mit Knochenmark von IRF-1<sup>-/-</sup> Tieren transplantiert

d3: Tag 3 nach der Infektion

MW: Mittelwert

STABW: Standardabweichung

p-Wert: Irrtumswahrscheinlichkeit

n.s.: nicht signifikant

s.: signifikant

Zwischen den transplantierten Gruppen am dritten Tag nach der Infektion ist kein signifikanter Unterschied festzustellen. Die höchste Viruslast in beiden Gruppen ist am dritten Tag in der Leber zu messen.

## EIGENE UNTERSUCHUNGEN

**Tabelle 7 : Ermittelte Daten der PFA Analyse in der transplantierten Gruppe IRF<sup>WT</sup> in den Organen Herz, Lunge, Leber, Milz und Niere am dritten und siebten Tag nach der Infektion.**

Gruppe	Titer [pfu/g Organ]				
PFA	Herz	Lunge	Leber	Milz	Niere
IRF <sup>WT</sup> 3d	341.538	701.053	4.995.000	7.051.765	2.018.182
	999.000	518.000	9.081.818	8.325.000	1.070.357
	4.662.000	2.331.000	17.526.315	11.100.000	6.660.000
	666.000	1.332.000	17.793.893	4.329.000	5.994.000
<b>MW</b>	<b>1.667.134</b>	<b>1.220.513</b>	<b>12.349.256</b>	<b>7.701.441</b>	<b>3.935.634</b>
<b>STABW</b>	<b>2.014.538</b>	<b>818.326</b>	<b>6.356.289</b>	<b>2.912.736</b>	<b>2.801.515</b>
IRF <sup>WT</sup> 7d	3.996.000	22.200	222.000	399.600	29.137.500
	39.960	0	0	0	0
	0	0	0	0	0
<b>MW</b>	<b>1.345.320</b>	<b>7.400</b>	<b>74.000</b>	<b>133.200</b>	<b>9.712.500</b>
<b>STABW</b>	<b>2.295.643</b>	<b>12.817</b>	<b>128.171</b>	<b>230.709</b>	<b>16.822.543</b>
<b>p-Wert</b>	<b>0,400</b>	<b>0,057</b>	<b>0,077</b>	<b>0,057</b>	<b>0,543</b>
<b>Signifikanz</b>	<b>n.s.</b>	<b>n.s.</b>	<b>n.s.</b>	<b>n.s.</b>	<b>n.s.</b>

IRF<sup>WT</sup>: Interferon-Regulator-Faktor 1 defiziente Tiere wurden mit Knochenmark von Wildtypieren transplantiert.

d3: Tag 3 nach der Infektion

d7: Tag 7 nach der Infektion

MW: Mittelwert

STABW: Standardabweichung

p-Wert: Irrtumswahrscheinlichkeit

n.s.: nicht signifikant

s.: signifikant

In der transplantierten Gruppe IRF<sup>WT</sup> ist zwischen Tag 3 und Tag 7, aufgrund der großen Schwankungen innerhalb der Gruppen kein signifikanter Unterschied festzustellen.

Tendenziell nimmt der Virustiter vom dritten auf den siebten Tag in den Organen Lunge, Leber, Milz und Niere ab. Im Herz ist der höchste Virustiter zu vermerken.

## EIGENE UNTERSUCHUNGEN

**Tabelle 8 : Ermittelte Daten der PFA Analyse in der transplantierten Gruppe WT<sup>IRF</sup> in den Organen Herz, Lunge, Leber, Milz und Niere am dritten und siebten Tag nach der Infektion.**

Gruppe	Titer [pfu/g Organ]				
PFA	Herz	Lunge	Leber	Milz	Niere
WT <sup>IRF</sup> 3d	1.332.000	1.332.000	6.660.000	7.992.000	4.662.000
	1.332.000	701.052	7.326.000	3.996.000	1.332.000
	1.998.000	5.328.000	13.320.000	3.330.000	5.661.000
	4.440.000	8.658.000	13.875.000	14.152.500	5.661.000
<b>MW</b>	<b>2.275.500</b>	<b>4.004.763</b>	<b>10.295.250</b>	<b>7.357.625</b>	<b>4.329.000</b>
<b>STABW</b>	<b>1.476.758</b>	<b>3.717.604</b>	<b>3.829.500</b>	<b>4.969.729</b>	<b>2.052.749</b>
WT <sup>IRF</sup> 7d	1.665.000	0	0	0	0
	3.996.000	0	0	0	66.600
	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0
	63.428	22.200	8.325	8.325	0
<b>MW</b>	<b>1.144.885</b>	<b>44.400</b>	<b>1.665</b>	<b>1.665</b>	<b>133.200</b>
<b>STABW</b>	<b>1.745.741</b>	<b>9.928</b>	<b>3.723</b>	<b>3.723</b>	<b>29.784</b>
<b>p-Wert</b>	<b>0,262</b>	<b>0,016</b>	<b>0,016</b>	<b>0,016</b>	<b>0,016</b>
<b>Signifikanz</b>	<b>n.s.</b>	<b>s.</b>	<b>s.</b>	<b>s.</b>	<b>s.</b>

WT<sup>IRF</sup>: Wildtypiere wurden mit Knochenmark von IRF-1-/- Tieren transplantiert.  
d3: Tag 3 nach der Infektion  
d7: Tag 7 nach der Infektion  
MW: Mittelwert  
STABW: Standardabweichung  
p-Wert: Irrtumswahrscheinlichkeit  
n.s.: nicht signifikant  
s.: signifikant

In der transplantierten Gruppe der WT<sup>IRF</sup> Tiere sind im Herz vom Tag 3 auf Tag 7 keine signifikanten Veränderungen festzustellen. Die Menge an detektierten Virusgenomen bleibt nahezu gleich.

Dagegen zeigen Lunge, Leber, Milz und Niere [Lunge: p-Wert. 0,016 = s., Leber: p-Wert: 0,016 = s., Milz: p-Wert: 0,016 = s. und Niere: p-Wert. 0,016 = s.] eine signifikante Abnahme an detektierten Virusgenomen vom dritten auf den siebten Tag.

## EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Tabelle 9 : Vergleich der transplantierten Gruppen IRF<sup>WT</sup> und WT<sup>IRF</sup> in den Organen Herz, Lunge, Leber, Milz und Niere am siebten Tag nach der Infektion.

Gruppe	Titer [pfu/g Organ]				
PFA	Herz	Lunge	Leber	Milz	Niere
IRF <sup>WT</sup> 7d	3.996.000	22.200	222.000	399.600	29.137.500
	39.960	0	0	0	0
	0	0	0	0	0
<b>MW</b>	<b>1.345.320</b>	<b>7.400</b>	<b>74.000</b>	<b>133.200</b>	<b>9.712.500</b>
<b>STABW</b>	<b>2.295.643</b>	<b>12.817</b>	<b>128.171</b>	<b>230.709</b>	<b>16.822.543</b>
WT <sup>IRF</sup> 7d	1.665.000	0	0	0	0
	3.996.000	0	0	0	66.600
	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0
	63.428	22.200	8.325	8.325	0
<b>MW</b>	<b>1.144.885</b>	<b>44.400</b>	<b>1.665</b>	<b>1.665</b>	<b>133.200</b>
<b>STABW</b>	<b>1.745.741</b>	<b>9.928</b>	<b>3.723</b>	<b>3.723</b>	<b>29.784</b>
<b>p-Wert</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0,732</b>	<b>0,732</b>	<b>0,732</b>
<b>Signifikanz</b>	<b>n.s.</b>	<b>n.s.</b>	<b>n.s.</b>	<b>n.s.</b>	<b>n.s.</b>

IRF<sup>WT</sup>: Interferon-Regulator-Faktor 1 defiziente Tiere wurden mit Knochenmark von Wildtyptieren transplantiert.

WT<sup>IRF</sup>: Wildtypiere wurden mit Knochenmark von IRF-1-/- Tieren transplantiert.

d7: Tag 7 nach der Infektion

MW: Mittelwert

STABW: Standardabweichung

p-Wert: Irrtumswahrscheinlichkeit

n.s.: nicht signifikant

s.: signifikant

Am siebten Tag zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden transplantierten Gruppen in den untersuchten Organen (siehe Tabelle 9).

### 3.5.3 Ergebnisse der In-situ-Hybridisierung (ISH) im Experiment 1

#### 3.5.3.1 Virusgenomnachweis in den verschiedenen Organen am Tag 3 nach der Infektion in den nicht transplantierten Gruppen

Tabelle 10 : Ermittelte Daten der ISH an den Testgruppen IRF-1-/- und WT am Tag 3 an den Organen Herz, Lunge, Leber, Milz, Pankreas und Niere.

Gruppe	Detektion [1-4]					
ISH	Herz	Lunge	Leber	Milz	Pankreas	Niere
WT3dinf	3	0	0,5	1,5	4	1
	3	0	0	2	4	0
	2	0	0	1	4	0
	2	0	0,5	0	4	1
	3	0	2	1	4	0
	3	0	3	2	4	2
	2	0	3	2	?	2
<b>MW</b>	<b>2,57</b>	<b>0</b>	<b>1,28</b>	<b>1,35</b>	<b>4</b>	<b>0,86</b>
<b>STABW</b>	<b>0,53</b>	<b>0</b>	<b>1,35</b>	<b>0,75</b>	<b>0</b>	<b>0,9</b>
IRF1-/-3dinf	1,5	0,5	0	1	?	3
	0	1	2,5	0	3,5	0
	0	0	2	0	?	0
	2,5	0	1	0	3,5	0,5
	2	0,5	0	1,5	?	1,5
	3	0,5	2	1,5	4	0
	1,5	0	3	0,5	4	0
	3	0,5	3	2	4	0
<b>MW</b>	<b>1,68</b>	<b>0,375</b>	<b>1,69</b>	<b>0,8125</b>	<b>3,8</b>	<b>0,625</b>
<b>STABW</b>	<b>1,19</b>	<b>0,35</b>	<b>1,1</b>	<b>0,8</b>	<b>0,27</b>	<b>1,09</b>
<b>p-Wert</b>	<b>0,105</b>	<b>0,026</b>	<b>0,677</b>	<b>0,219</b>	<b>0,182</b>	<b>0,513</b>
<b>Signifikanz</b>	<b>n.s.</b>	<b>s.</b>	<b>n.s.</b>	<b>n.s.</b>	<b>n.s.</b>	<b>n.s.</b>

WT: Wildtyp  
 IRF-1-/-: Interferon-Regulator-Faktor 1 defizient  
 MW: Mittelwert  
 STABW: Standardabweichung  
 p-Wert: Irrtumswahrscheinlichkeit  
 n.s.: nicht signifikant  
 s.: signifikant  
 d3: Tag 3 nach der Infektion

Beim Vergleich der WT-Tiere und der IRF-1 defizienten Tiere am Tag drei nach der Infektion ergibt sich eine signifikante Reduktion der Viruslast in den WT-Tieren im Organ Lunge [Lunge: p-Wert: 0,026 = s.].

## EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Der molekulargenetische Nachweis von Virusgenomen wird am Institut für Molekulare Pathologie an der Universität Tübingen von Frau Dr. med. K. Klingel durchgeführt. Die Ergebnisse werden in einem Bereich von 1-4 angegeben. Bereich 1 steht für einen sehr niedrigen und Bereich 4 für den höchsten Nachweis an Virusgenomen.

Von allen infizierten Tieren sind Herz, Lunge, Leber, Milz, Pankreas und Niere zur Titeranalyse entnommen worden.

In der Gruppe der IRF-1-/- Mäuse haben keine Tiere den dritten Tag nach der Infektion überlebt, daher sind keine Ergebnisse dieser Mäuse am siebten Tag vorhanden.

Von den Kontrolltieren, welche nicht infiziert sind, können in keinem der untersuchten Organe Virusgenome festgestellt werden.

**Tabelle 11 : Ermittelte Daten der ISH an den Testgruppen WT am Tag 3 und WT am Tag 7 an den Organen Herz, Lunge, Leber, Milz, Pankreas und Niere.**

Gruppe	Detektion [1-4]					
ISH	Herz	Lunge	Leber	Milz	Pankreas	Niere
WT 3d	3	0	0,5	1,5	4	1
	3	0	0	2	4	0
	2	0	0	1	4	0
	2	0	0,5	0	4	1
	3	0	2	1	4	0
	3	0	3	2	4	2
	2	0	3	2	?	2
<b>MW</b>	<b>2,57</b>	<b>0</b>	<b>1,28</b>	<b>1,35</b>	<b>4</b>	<b>0,86</b>
<b>STABW</b>	<b>0,53</b>	<b>0</b>	<b>1,35</b>	<b>0,75</b>	<b>0</b>	<b>0,9</b>
WT 7d	3	0	0	1	0	1
	2,5	0	0	1	1,5	0
	2	0	0	1	1	1
<b>MW</b>	<b>2,5</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0,83</b>	<b>0,67</b>
<b>STABW</b>	<b>0,5</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0,76</b>	<b>0,58</b>
<b>p-Wert</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0,142</b>	<b>0,367</b>	<b>0,012</b>	<b>1</b>
<b>Signifikanz</b>	<b>n.s.</b>	<b>n.s.</b>	<b>n.s.</b>	<b>n.s.</b>	<b>s.</b>	<b>n.s.</b>

WT: Wildtyp  
 MW: Mittelwert  
 STABW: Standardabweichung  
 p-Wert: Irrtumswahrscheinlichkeit  
 n.s.: nicht signifikant  
 s.: signifikant  
 d3: Tag 3 nach der Infektion  
 d7: Tag 7 nach der Infektion

Im Pankreas zeigt sich sieben Tage nach der Infektion ein signifikanter Rückgang der Viruslast beim Vergleich der WT-Tiere am dritten und am siebten Tag [Pankreas: p-Wert:

## EIGENE UNTERSUCHUNGEN

0,012 = s.]. Besonders im Herz ist die Anzahl der detektierten Virusgenome von Tag 3 auf Tag 7 gleichgeblieben.

In den anderen Organen zeigen sich keine signifikanten Veränderungen.

### 3.5.4 Ergebnisse der In-situ-Hybridisierung (ISH) im Experiment 2

#### 3.5.4.1 Virusgenomnachweis in den verschiedenen Organen am Tag 3/7 nach der Infektion in den transplantierten Gruppen

**Tabelle 12 : Ermittelte Daten der ISH an den transplantierten Testgruppen IRF<sup>WT</sup> und WT<sup>IRF</sup> am Tag 3 in den Organen Herz, Lunge, Leber, Milz, Pankreas und Niere.**

Gruppe	Detektion [1-4]					
ISH	Herz	Lunge	Leber	Milz	Pankreas	Niere
IRF <sup>WT</sup> d3	1	0	0	1	3,5	1
	1	0	0	1,5	3,5	1
	0	0	0,5	1	3,5	1,5
	1	0	2	1,5	3,5	2
<b>MW</b>	<b>0,75</b>	<b>0</b>	<b>0,63</b>	<b>1,25</b>	<b>3,5</b>	<b>1,38</b>
<b>STABW</b>	<b>0,5</b>	<b>0</b>	<b>0,95</b>	<b>0,29</b>	<b>0</b>	<b>0,48</b>
WT <sup>IRF</sup> d3	1	0	2	1,5	3,5	1,5
	1,5	0	2	1,5	3,5	1,5
	0	0	0	1,5	3,5	2
	1	1	2,5	1	3,5	1,5
<b>MW</b>	<b>0,88</b>	<b>0,25</b>	<b>1,63</b>	<b>1,38</b>	<b>3,5</b>	<b>1,63</b>
<b>STABW</b>	<b>0,63</b>	<b>0,5</b>	<b>1,11</b>	<b>0,25</b>	<b>0</b>	<b>0,25</b>
<b>p-Wert</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0,4</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0,629</b>
<b>Signifikanz</b>	<b>n.s.</b>	<b>n.s.</b>	<b>n.s.</b>	<b>n.s.</b>	<b>n.s.</b>	<b>n.s.</b>

IRF<sup>WT</sup>: Interferon-Regulator-Faktor 1 defiziente Tiere wurden mit Knochenmark von Wildtyptieren transplantiert.

WT<sup>IRF</sup>: Wildtyptiere wurden mit Knochenmark von IRF-1-/- Tieren transplantiert.

d3: Tag 3 nach der Infektion

MW: Mittelwert

STABW: Standardabweichung

p-Wert: Irrtumswahrscheinlichkeit

n.s.: nicht signifikant

s.: signifikant

Am dritten Tag nach der Infektion ist in keinem der untersuchten Organe zwischen den beiden transplantierten Gruppen ein signifikanter Unterschied festzustellen (siehe Tabelle 12).

## EIGENE UNTERSUCHUNGEN

**Tabelle 13 : Vergleich der ISH-Daten der Testgruppe WT<sup>IRF</sup> am Tag 3 und Tag 7 in den Organen Herz, Lunge, Leber, Milz, Pankreas und Niere.**

Gruppe	Detektion [1-4]					
ISH	Herz	Lunge	Leber	Milz	Pankreas	Niere
WT <sup>IRF</sup> d3	1	0	2	1,5	3,5	1,5
	1,5	0	2	1,5	3,5	1,5
	0	0	0	1,5	3,5	2
	1	1	2,5	1	3,5	1,5
<b>MW</b>	<b>0,88</b>	<b>0,25</b>	<b>1,63</b>	<b>1,38</b>	<b>3,5</b>	<b>1,63</b>
<b>STABW</b>	<b>0,63</b>	<b>0,5</b>	<b>1,11</b>	<b>0,25</b>	<b>0</b>	<b>0,25</b>
WT <sup>IRF</sup> d7	2	0	0	1,5	2,5	1
	0	0	0	0	3,5	1
	1,5	0	0	1	1	1
	0	0	0	1	2,5	1,5
	0	0	0	1	?	0
<b>MW</b>	<b>0,7</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0,9</b>	<b>2,38</b>	<b>0,9</b>
<b>STABW</b>	<b>0,97</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0,55</b>	<b>1,03</b>	<b>0,55</b>
<b>p-Wert</b>	<b>0,857</b>	<b>0,444</b>	<b>0,048</b>	<b>0,175</b>	<b>0,143</b>	<b>0,04</b>
<b>Signifikanz</b>	<b>n.s.</b>	<b>n.s.</b>	<b>s.</b>	<b>n.s.</b>	<b>n.s.</b>	<b>s.</b>

WT<sup>IRF</sup>: Wildtypiere wurden mit Knochenmark von IRF-1-/- Tieren transplantiert.  
d3: Tag 3 nach der Infektion  
d7: Tag 7 nach der Infektion  
MW: Mittelwert  
STABW: Standardabweichung  
p-Wert: Irrtumswahrscheinlichkeit  
n.s.: nicht signifikant  
s.: signifikant

Ein Vergleich der transplantierten Gruppe WT<sup>IRF</sup> am dritten und siebten Tag zeigt eine signifikante Reduktion der Virusgenome in der Leber [p-Wert: 0,048 = s.) und in der Niere [p-Wert: 0,04 = s.].

In den anderen Organen ist die Virusreduktion zwischen Tag 3 und Tag 7 nicht signifikant (siehe Tabelle 13).

## EIGENE UNTERSUCHUNGEN

**Tabelle 14 : Vergleich der ISH-Daten der Testgruppe IRF<sup>WT</sup> am Tag 3 und Tag 7 in den Organen Herz, Lunge, Leber, Milz, Pankreas und Niere.**

Gruppe	Detektion [1-4]					
ISH	Herz	Lunge	Leber	Milz	Pankreas	Niere
IRF <sup>WT</sup> d3	1	0	0	1	3,5	1
	1	0	0	1,5	3,5	1
	0	0	0,5	1	3,5	1,5
	1	0	2	1,5	3,5	2
<b>MW</b>	<b>0,75</b>	<b>0</b>	<b>0,63</b>	<b>1,25</b>	<b>3,5</b>	<b>1,38</b>
<b>STABW</b>	<b>0,5</b>	<b>0</b>	<b>0,95</b>	<b>0,29</b>	<b>0</b>	<b>0,48</b>
IRF <sup>WT</sup> d7	1	0	0	1	4	0
	1,5	0	0	1	4	0
	1	0	0	0	4	0
<b>MW</b>	<b>1,17</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0,67</b>	<b>4</b>	<b>0</b>
<b>STABW</b>	<b>0,29</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0,58</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>p-Wert</b>	<b>0,571</b>	<b>1</b>	<b>0,429</b>	<b>0,286</b>	<b>0,029</b>	<b>0,029</b>
<b>Signifikanz</b>	<b>n.s.</b>	<b>n.s.</b>	<b>n.s.</b>	<b>n.s.</b>	<b>s.</b>	<b>s.</b>

IRF<sup>WT</sup>: Interferon-Regulator-Faktor 1 defiziente Tiere wurden mit Knochenmark von Wildtyptieren transplantiert.

d3: Tag 3 nach der Infektion

d7: Tag 7 nach der Infektion

MW: Mittelwert

STABW: Standardabweichung

p-Wert: Irrtumswahrscheinlichkeit

n.s.: nicht signifikant

s.: signifikant

Ein Vergleich der transplantierten Gruppe IRF<sup>WT</sup> am dritten und siebten Tag zeigt einen signifikanten Anstieg der Virusgenome im Pankreas [p-Wert: 0,029 = s.] und in der Niere [p-Wert: 0,029 = s.].

In den anderen Organen ist die Virusreduktion zwischen Tag 3 und Tag 7 nicht signifikant (siehe Tabelle 14).

## EIGENE UNTERSUCHUNGEN

**Tabelle 15 : Ermittelte Daten der ISH an den transplantierten Testgruppen am Tag 7 in den Organen Herz, Lunge, Leber, Milz, Pankreas und Niere.**

<b>Gruppe</b>	<b>Detektion [1-4]</b>					
<b>ISH</b>	<b>Herz</b>	<b>Lunge</b>	<b>Leber</b>	<b>Milz</b>	<b>Pankreas</b>	<b>Niere</b>
IRF <sup>WT</sup> d7	1	0	0	1	4	0
	1,5	0	0	1	4	0
	1	0	0	0	4	0
<b>MW</b>	<b>1,17</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0,67</b>	<b>4</b>	<b>0</b>
<b>STABW</b>	<b>0,29</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0,58</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
WT <sup>IRF</sup> d7	2	0	0	1,5	2,5	1
	0	0	0	0	3,5	1
	1,5	0	0	1	1	1
	0	0	0	1	2,5	1,5
	0	0	0	1	?	0
<b>MW</b>	<b>0,7</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0,9</b>	<b>2,38</b>	<b>0,9</b>
<b>STABW</b>	<b>0,97</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0,55</b>	<b>1,03</b>	<b>0,55</b>
<b>p-Wert</b>	<b>0,571</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0,643</b>	<b>0,057</b>	<b>0,125</b>
<b>Signifikanz</b>	<b>n.s</b>	<b>n.s</b>	<b>n.s</b>	<b>n.s</b>	<b>n.s</b>	<b>n.s</b>

IRF<sup>WT</sup>: Interferon-Regulator-Faktor 1 defiziente Tiere wurden mit Knochenmark von Wildtyptieren transplantiert

WT<sup>IRF</sup>: Wildtyptiere wurden mit Knochenmark von IRF-1-/- Tieren transplantiert.

d7: Tag 7 nach der Infektion

MW: Mittelwert

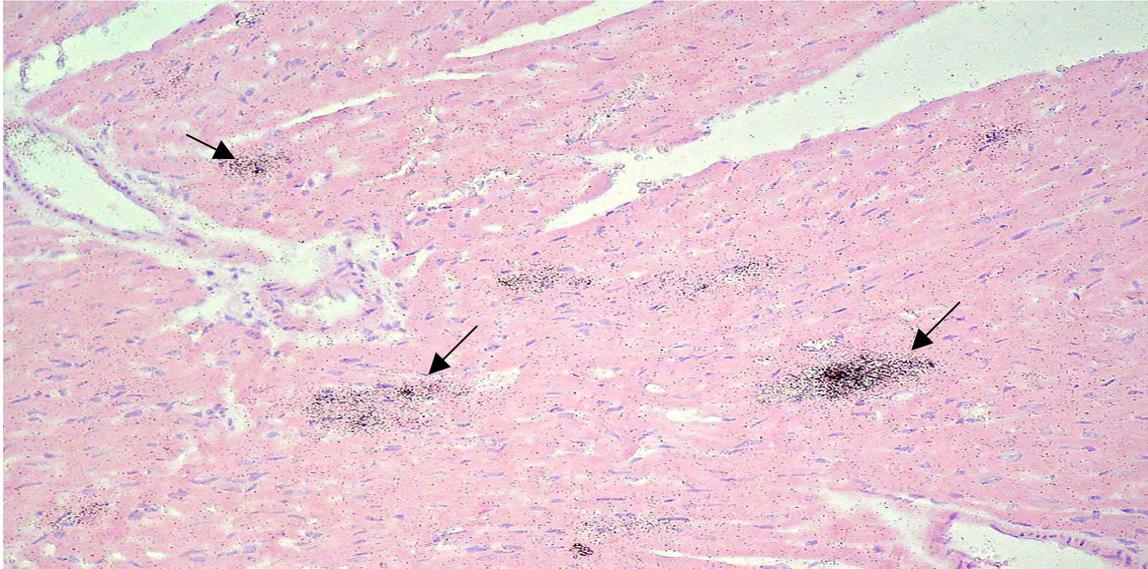
STABW: Standardabweichung

p-Wert: Irrtumswahrscheinlichkeit

n.s.: nicht signifikant

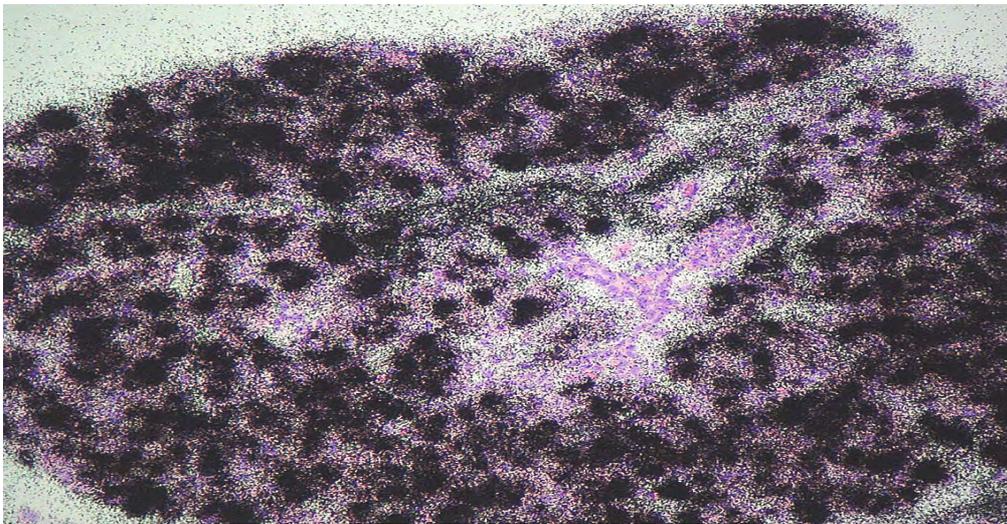
s.: signifikant

Am siebten Tag nach der Infektion ist in keinem der untersuchten Organe zwischen den beiden transplantierten Gruppen, IRF<sup>WT</sup> und WT<sup>IRF</sup> ein signifikanter Unterschied festzustellen (siehe Tabelle 15).



**Abbildung 10 : Histologischer Schnitt vom Herz eines WT<sup>IRF</sup> Tieres am dritten Tag nach der Infektion mit CVB3.**

Die schwarz angefärbten Partikel (siehe Pfeile) zeigen die autoradiographischen Silberkristalle, welche die Hybridisierung in den einzelnen infizierten Myozyten sichtbar machen.



**Abbildung 11 : Das Pankreas eines WT<sup>IRF</sup> Tieres am dritten Tag nach der Infektion mit CVB3**

Die schwarz angefärbten Areale zeigen die autoradiographischen Silberkristalle, welche die Hybridisierung in den einzelnen infizierten Zellen sichtbar machen. Die hohe lokale Dichte spricht für eine hohe Kopienzahl replizierender viraler Genome im Rahmen der akuten Infektion.

### 3.5.5 Ergebnisse der FACS-Analyse im Experiment 1

#### 3.5.5.1 Daten der verschiedenen FACS Parameter am Tag 0/3/7 nach der Infektion

Untersucht werden die CD 11b positiven Zellen, welche die Makrophagen, Monozyten und natürlichen Killerzellen darstellen, die B220 positiven Zellen, die für die B-Zellen stehen, außerdem der Pan T-Zellmarker Thy 1.2, sowie die CD 4 positiven Zellen, welche die T-Helfer-Zellen repräsentieren und die CD 8 positiven Zellen, die die zytotoxischen T-Zellen zeigen.

**Tabelle 16 : Ermittelte Daten der FACS-Parameter an den Testgruppen IRF1-/- und WT ohne Infektion.**

Gruppe	Messung [%]				
FACS	CD 11b	B 220	Thy 1.2	CD 4	CD 8
WT	7,6	68,7	30	18,3	10,4
	5	61	48	24	15
	4	63	30	18	12
	6	66,3	29	18	10,4
<b>MW</b>	<b>5,65</b>	<b>64,75</b>	<b>34,25</b>	<b>19,58</b>	<b>11,95</b>
<b>STABW</b>	<b>1,54</b>	<b>3,42</b>	<b>9,18</b>	<b>2,95</b>	<b>2,17</b>
IRF1-/-	11,9	54,5	42,9	26,5	11,9
			25	17	5,4
	6,6	62	26	24	3,5
	10	57	34	28,4	2,55
<b>MW</b>	<b>9,5</b>	<b>57,83</b>	<b>31,96</b>	<b>23,98</b>	<b>5,84</b>
<b>STABW</b>	<b>2,69</b>	<b>3,82</b>	<b>8,32</b>	<b>4,99</b>	<b>4,21</b>
<b>p-Wert</b>	<b>0,114</b>	<b>0,114</b>	<b>0,629</b>	<b>0,429</b>	<b>0,114</b>
<b>Signifikanz</b>	<b>n.s.</b>	<b>n.s.</b>	<b>n.s.</b>	<b>n.s.</b>	<b>n.s.</b>

WT: Wildtyp  
 IRF1-/-: Interferon-Regulator-Faktor 1 defizient  
 MW: Mittelwert  
 STABW: Standardabweichung  
 p-Wert: Irrtumswahrscheinlichkeit  
 n.s.: nicht signifikant  
 s.: signifikant

Bei der Untersuchung der nicht infizierten Gruppen IRF1-/- und WT ist kein signifikanter Unterschied bei den einzelnen getesteten FACS-Parametern festzustellen.

Ein deutlicher Trend ist zwischen WT-Tieren und IRF-1 defizienten Mäusen beim Vergleich des Parameter CD 8 zugunsten der WT-Tiere zu sehen.

## EIGENE UNTERSUCHUNGEN

**Tabelle 17 : Ermittelte Daten der FACS-Parameter an den Testgruppen WT und IRF-1-/- am dritten Tag nach der Infektion.**

Gruppe	Messung [%]				
FACS	CD 11b	B 220	Thy 1.2	CD 4	CD 8
WT 3d	7,8	62,7	26,5	15,7	10,5
	11,5	65,5	17,8	8,4	8,1
	4,8	77	17,3	9,6	0,5
	8,6	72	21	13	0,3
<b>MW</b>	<b>8,18</b>	<b>69,3</b>	<b>20,85</b>	<b>11,68</b>	<b>4,85</b>
<b>STABW</b>	<b>2,75</b>	<b>6,44</b>	<b>4,23</b>	<b>3,32</b>	<b>5,23</b>
IRF1-/- 3d	8	43,2	24,1	27,2	3,62
	5,2	59,1	31,8	30	2,34
	6,4	48	37,9	33	0,5
	3,9	68	23,3	22,3	0,65
	6	66,3	29	18	10,4
<b>MW</b>	<b>5,9</b>	<b>56,92</b>	<b>29,22</b>	<b>26,1</b>	<b>3,5</b>
<b>STABW</b>	<b>1,51</b>	<b>10,99</b>	<b>5,09</b>	<b>6</b>	<b>4</b>
<b>p-Wert</b>	<b>0,286</b>	<b>0,19</b>	<b>0,063</b>	<b>0,016</b>	<b>0,96</b>
<b>Signifikanz</b>	<b>n.s.</b>	<b>n.s.</b>	<b>n.s.</b>	<b>s.</b>	<b>n.s.</b>

WT: Wildtyp  
 IRF-1-/-: Interferon-Regulator-Faktor 1 defizient  
 MW: Mittelwert  
 STABW: Standardabweichung  
 p-Wert: Irrtumswahrscheinlichkeit  
 n.s.: nicht signifikant  
 s.: signifikant  
 d3: Tag 3 nach der Infektion

Am dritten Tag nach der Infektion mit CVB3 zeigt sich bei den CD 4 positiven Zellen ein signifikant höherer Wert bei den IRF1 -/- Tieren im Vergleich zu den WT-Tieren [CD 4: p-Wert: 0,016 = s.].

Bei den anderen Parametern ist kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden infizierten Gruppen festzustellen.

## EIGENE UNTERSUCHUNGEN

**Tabelle 18 : Ermittelte Daten der FACS-Parameter an den Testgruppen WT am Tag 3 und WT am Tag 7 nach der Infektion.**

Gruppe	Messung [%]				
FACS	CD 11b	B 220	Thy 1.2	CD 4	CD 8
WT 3d	7,8	62,7	26,5	15,7	10,5
	11,5	65,5	17,8	8,4	8,1
	4,8	77	17,3	9,6	0,5
	8,6	72	21	13	0,3
<b>MW</b>	<b>8,18</b>	<b>69,3</b>	<b>20,85</b>	<b>11,68</b>	<b>4,85</b>
<b>STABW</b>	<b>2,75</b>	<b>6,44</b>	<b>4,23</b>	<b>3,32</b>	<b>5,23</b>
WT 7d	15,2	66	24,7	9,4	7,1
	12,5	62,4	21,1	10,2	6,59
	9,68	60,8	20,6	10,3	6,35
<b>MW</b>	<b>12,46</b>	<b>63,07</b>	<b>22,13</b>	<b>9,97</b>	<b>6,68</b>
<b>STABW</b>	<b>2,76</b>	<b>2,66</b>	<b>2,24</b>	<b>0,48</b>	<b>0,39</b>
<b>p-Wert</b>	<b>0,114</b>	<b>0,229</b>	<b>0,629</b>	<b>0,057</b>	<b>1</b>
<b>Signifikanz</b>	<b>n.s.</b>	<b>n.s.</b>	<b>n.s.</b>	<b>n.s.</b>	<b>n.s.</b>

WT: Wildtyp  
 IRF-1-/-: Interferon-Regulator-Faktor 1 defizient  
 MW: Mittelwert  
 STABW: Standardabweichung  
 p-Wert: Irrtumswahrscheinlichkeit  
 n.s.: nicht signifikant  
 s.: signifikant  
 d3: Tag 3 nach der Infektion  
 d7: Tag 7 nach der Infektion

Keiner der FACS-Parameter zeigt vom dritten auf den siebten Tag eine signifikante Veränderung bei den WT-Tieren.

3.5.6 Ergebnisse der FACS-Analyse im Experiment 2

3.5.6.1 Daten der verschiedenen FACS Parameter am Tag 3/7 nach der Infektion

Tabelle 19 : Ermittelte Daten der FACS-Parameter an den transplantierten Testgruppen IRF<sup>WT</sup> und WT<sup>IRF</sup> am Tag 3 nach der Infektion.

Gruppe	Messung [%]				
FACS	CD 11b	B 220	Thy 1.2	CD 4	CD 8
IRF <sup>WT</sup> 3d	5,03	59,2	23,3	21,2	0,54
	18,3	48,2	23,5	21	2,5
	7,26	55,6	37,2	26	6,16
	5,72	72,7	24,4	16,6	2,94
<b>MW</b>	<b>9,08</b>	<b>58,93</b>	<b>27,1</b>	<b>21,2</b>	<b>3,04</b>
<b>STABW</b>	<b>6,22</b>	<b>10,26</b>	<b>8,75</b>	<b>3,84</b>	<b>2,33</b>
WT <sup>IRF</sup> 3d	22,7	31,6	29,7	24,1	1,75
	14,1	25,2	55	44	2,81
	23,7	8,66	41,5	43,1	1,45
	24,7	9,93	44,5	42,7	0,73
<b>MW</b>	<b>21,3</b>	<b>18,85</b>	<b>42,88</b>	<b>38,47</b>	<b>1,69</b>
<b>STABW</b>	<b>4,87</b>	<b>11,35</b>	<b>10,41</b>	<b>9,6</b>	<b>0,86</b>
<b>p-Wert</b>	<b>0,057</b>	<b>0,029</b>	<b>0,057</b>	<b>0,057</b>	<b>0,486</b>
<b>Signifikanz</b>	<b>n.s.</b>	<b>s.</b>	<b>n.s.</b>	<b>n.s.</b>	<b>n.s.</b>

IRF<sup>WT</sup>: Interferon-Regulator-Faktor 1 defiziente Tiere wurden mit Knochenmark von Wildtypieren transplantiert.

WT<sup>IRF</sup>: Wildtypiere wurden mit Knochenmark von IRF-1<sup>-/-</sup> Tieren transplantiert.

d3: Tag 3 nach der Infektion

MW: Mittelwert

STABW: Standardabweichung

p-Wert: Irrtumswahrscheinlichkeit

n.s.: nicht signifikant

s.: signifikant

Die transplantierten Gruppen unterscheiden sich nur im Bereich der B-Zellen signifikant [B 220: p-Wert: 0,029 = s.]. Hier zeigt sich am dritten Tag nach der Infektion eine signifikante Reduzierung der B-Zellen in Tieren, welche mit IRF-1 defizientem Knochenmark transplantiert wurden.

## EIGENE UNTERSUCHUNGEN

**Tabelle 20 : Ermittelte Daten der FACS-Parameter an de transplantierten Testgruppe IRF<sup>WT</sup> am Tag 3 und Tag 7 nach der Infektion.**

Gruppe	Messung [%]				
FACS	CD 11b	B 220	Thy 1.2	CD 4	CD 8
IRF <sup>WT</sup> 3d	5,03	59,2	23,3	21,2	0,54
	18,3	48,2	23,5	21	2,5
	7,26	55,6	37,2	26	6,16
	5,72	72,7	24,4	16,6	2,94
<b>MW</b>	<b>9,08</b>	<b>58,93</b>	<b>27,1</b>	<b>21,2</b>	<b>3,04</b>
<b>STABW</b>	<b>6,22</b>	<b>10,26</b>	<b>8,75</b>	<b>3,84</b>	<b>2,33</b>
IRF <sup>WT</sup> 7d	17,2	57,3	15,7	10,1	5,07
	15,6	66,4	12	8,2	3,8
	16	63,4	14,6	12,9	3,9
<b>MW</b>	<b>16,27</b>	<b>52,37</b>	<b>14,1</b>	<b>10,4</b>	<b>4,26</b>
<b>STABW</b>	<b>0,83</b>	<b>4,64</b>	<b>1,9</b>	<b>2,36</b>	<b>0,71</b>
<b>p-Wert</b>	<b>0,4</b>	<b>0,629</b>	<b>0,057</b>	<b>0,057</b>	<b>0,4</b>
<b>Signifikanz</b>	<b>n.s.</b>	<b>n.s.</b>	<b>n.s.</b>	<b>n.s.</b>	<b>n.s.</b>

IRF<sup>WT</sup>: Interferon-Regulator-Faktor 1 defiziente Tiere wurden mit Knochenmark von Wildtyptieren transplantiert.

d3: Tag 3 nach der Infektion

d7: Tag 7 nach der Infektion

MW: Mittelwert

STABW: Standardabweichung

p-Wert: Irrtumswahrscheinlichkeit

n.s.: nicht signifikant

s.: signifikant

Die transplantierte Gruppe IRF<sup>WT</sup> zeigt während des Infektionsverlaufs vom dritten auf den siebten Tag keine signifikante Veränderung in den FACS-Parametern.

## EIGENE UNTERSUCHUNGEN

**Tabelle 21 : Ermittelte Daten der FACS-Parameter an der transplantierten Testgruppe WT<sup>IRF</sup> am Tag 3 und Tag 7 nach der Infektion.**

Gruppe	Messung [%]				
FACS	CD 11b	B 220	Thy 1.2	CD 4	CD 8
WT <sup>IRF</sup> 3d	22,7	31,6	29,7	24,1	1,75
	14,1	25,2	55	44	2,81
	23,7	8,66	41,5	43,1	1,45
	24,7	9,93	44,5	42,7	0,73
<b>MW</b>	<b>21,3</b>	<b>18,85</b>	<b>42,88</b>	<b>38,47</b>	<b>1,69</b>
<b>STABW</b>	<b>4,87</b>	<b>11,35</b>	<b>10,41</b>	<b>9,6</b>	<b>0,86</b>
WT <sup>IRF</sup> 7d	7,45	40,7	23,3	15,6	4,6
	3,96	74,5	20,6	15,7	4,62
	6,23	64,5	30,3	21,2	6,68
	6,85	63,3	27,8	20,3	5,39
<b>MW</b>	<b>6,12</b>	<b>60,75</b>	<b>25,5</b>	<b>18,2</b>	<b>5,32</b>
<b>STABW</b>	<b>1,53</b>	<b>14,28</b>	<b>4,37</b>	<b>2,97</b>	<b>0,98</b>
<b>p-Wert</b>	<b>0,029</b>	<b>0,029</b>	<b>0,057</b>	<b>0,029</b>	<b>0,029</b>
<b>Signifikanz</b>	<b>s.</b>	<b>s.</b>	<b>n.s.</b>	<b>s.</b>	<b>s.</b>

WT<sup>IRF</sup>: Wildtypiere wurden mit Knochenmark von IRF-1<sup>-/-</sup> Tieren transplantiert.  
d3: Tag 3 nach der Infektion  
d7: Tag 7 nach der Infektion  
MW: Mittelwert  
STABW: Standardabweichung  
p-Wert: Irrtumswahrscheinlichkeit  
n.s.: nicht signifikant  
s.: signifikant

Vom dritten auf den siebten Tag zeigt die transplantierte Gruppe der WT<sup>IRF</sup>-Mäuse signifikante Veränderungen im Bereich der CD 11b positiven Zellen, der B 220, der CD 4 und CD 8 positiven Zellen. Im Bereich der CD 11b und der CD 4 positiven Zellen ist der gemessene Wert vom dritten auf den siebten Tag der Infektion signifikant erniedrigt [CD 11b: p-Wert: 0,029 = s., CD 4: p-Wert: 0,029 = s.].

Die CD 8 positiven Zellen, welche die zytotoxischen T-Zellen repräsentieren, steigen im Infektionsverlauf signifikant an [CD 8: p-Wert: 0,029 = s.].

## EIGENE UNTERSUCHUNGEN

**Tabelle 22 : Vergleich der FACS-Parameter an den transplantierten Testgruppen IRF<sup>WT</sup> und WT<sup>IRF</sup> am Tag 7 nach der Infektion.**

Gruppe	Messung [%]				
FACS	CD 11b	B 220	Thy 1.2	CD 4	CD 8
IRF <sup>WT</sup> 7d	17,2	57,3	15,7	10,1	5,07
	15,6	66,4	12	8,2	3,8
	16	63,4	14,6	12,9	3,9
<b>MW</b>	<b>16,27</b>	<b>52,37</b>	<b>14,1</b>	<b>10,4</b>	<b>4,26</b>
<b>STABW</b>	<b>0,83</b>	<b>4,64</b>	<b>1,9</b>	<b>2,36</b>	<b>0,71</b>
WT <sup>IRF</sup> 7d	7,45	40,7	23,3	15,6	4,6
	3,96	74,5	20,6	15,7	4,62
	6,23	64,5	30,3	21,2	6,68
	6,85	63,3	27,8	20,3	5,39
<b>MW</b>	<b>6,12</b>	<b>60,75</b>	<b>25,5</b>	<b>18,2</b>	<b>5,32</b>
<b>STABW</b>	<b>1,53</b>	<b>14,28</b>	<b>4,37</b>	<b>2,97</b>	<b>0,98</b>
<b>p-Wert</b>	<b>0,057</b>	<b>1</b>	<b>0,057</b>	<b>0,057</b>	<b>0,229</b>
<b>Signifikanz</b>	<b>n.s.</b>	<b>n.s.</b>	<b>n.s.</b>	<b>n.s.</b>	<b>n.s.</b>

IRF<sup>WT</sup>: Interferon-Regulator-Faktor 1 defiziente Tiere wurden mit Knochenmark von Wildtypieren transplantiert.

WT<sup>IRF</sup>: Wildtypiere wurden mit Knochenmark von IRF-1-/- Tieren transplantiert.

d7: Tag 7 nach der Infektion

MW: Mittelwert

STABW: Standardabweichung

p-Wert: Irrtumswahrscheinlichkeit

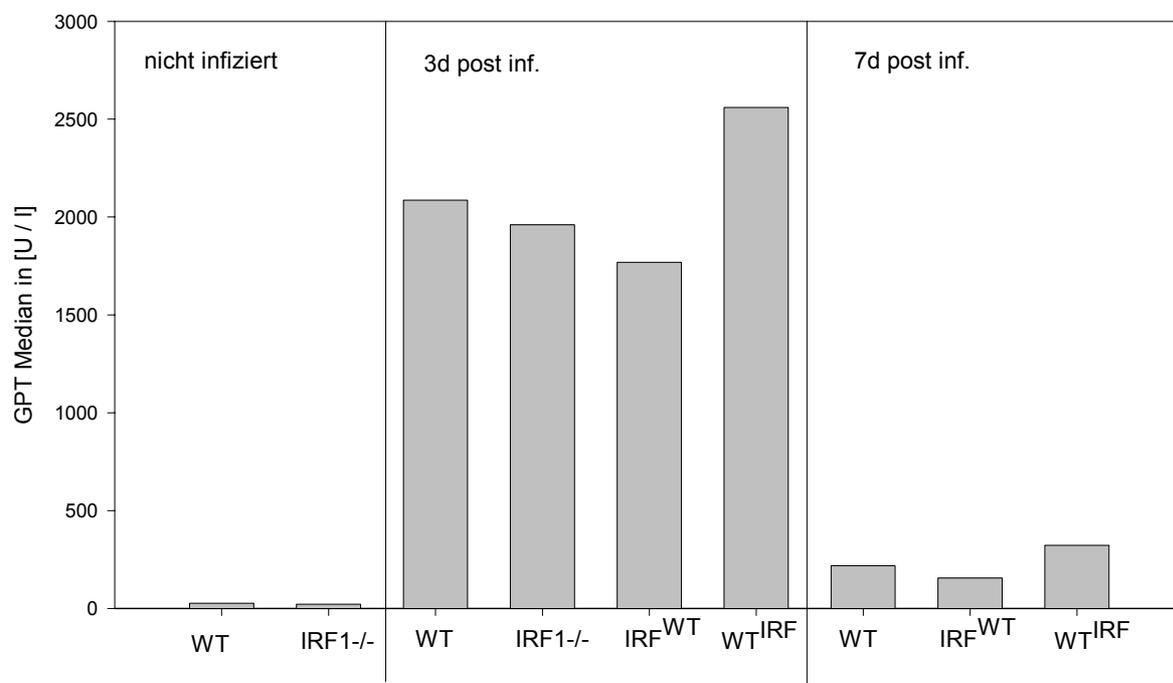
n.s.: nicht signifikant

s.: signifikant

Am siebten Tag nach der Infektion unterscheiden sich die transplantierten Gruppen bei keinem der untersuchten Parameter signifikant.

### 3.5.7 Ergebnisse der Labor- Analyse im Experiment 1 und 2

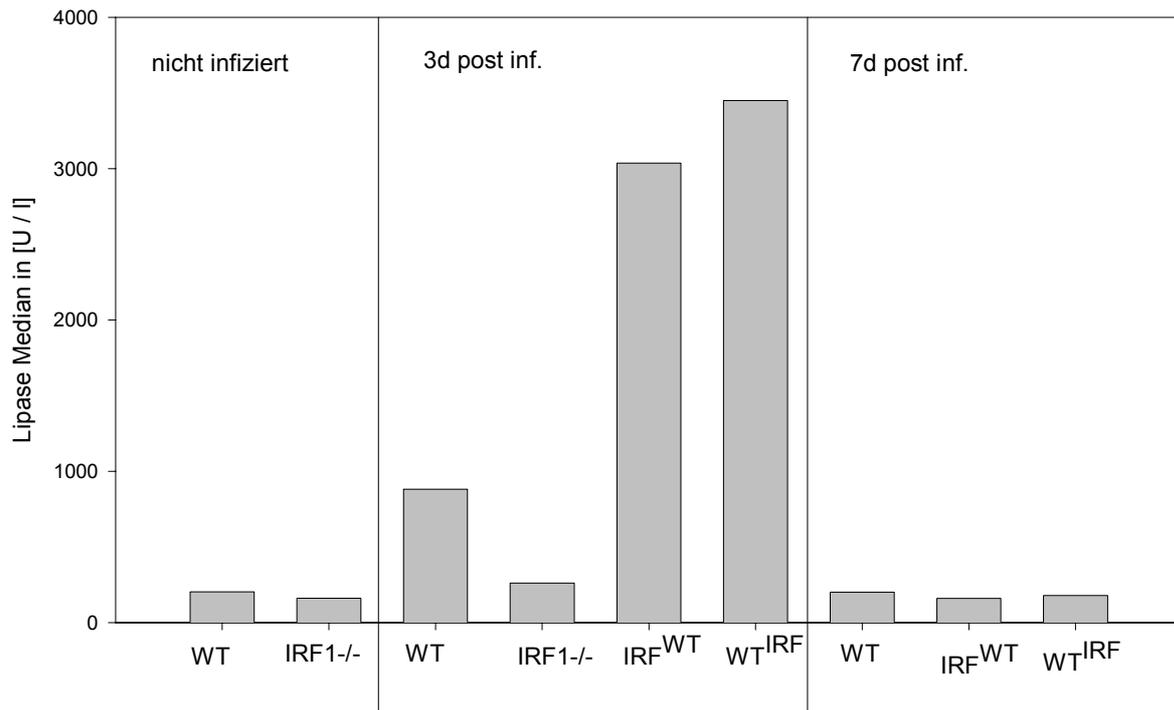
#### 3.5.7.1 Daten der verschiedenen Laborparameter am Tag 0/ 3/ 7 nach der Infektion



WT: Wildtyp  
 IRF-1-/-: Interferon-Regulator-Faktor 1 defizient  
 IRF<sup>WT</sup>: Interferon-Regulator-Faktor 1 defiziente Tiere wurden mit Knochenmark von Wildtyptieren transplantiert.  
 WT<sup>IRF</sup>: Wildtyptiere wurden mit Knochenmark von IRF-1-/- Tieren transplantiert  
 d3 post inf.: Tag 3 nach der Infektion  
 d7 post inf.: Tag 7 nach der Infektion

**Abbildung 12 : Ermittelte Daten der Serum-GPT-Aktivität an den nicht transplantierten und transplantierten Testgruppen am Tag 0/3/7.**

Es können keine Signifikanzen errechnet werden, dennoch ist die Tendenz deutlich abzulesen: Alle Gruppen zeigen am 3. Tag nach der Infektion einen Anstieg der GPT Werte (siehe Abb. 12). Am siebten Tag nach der Infektion sind alle Gruppen wieder im Normbereich zu finden.



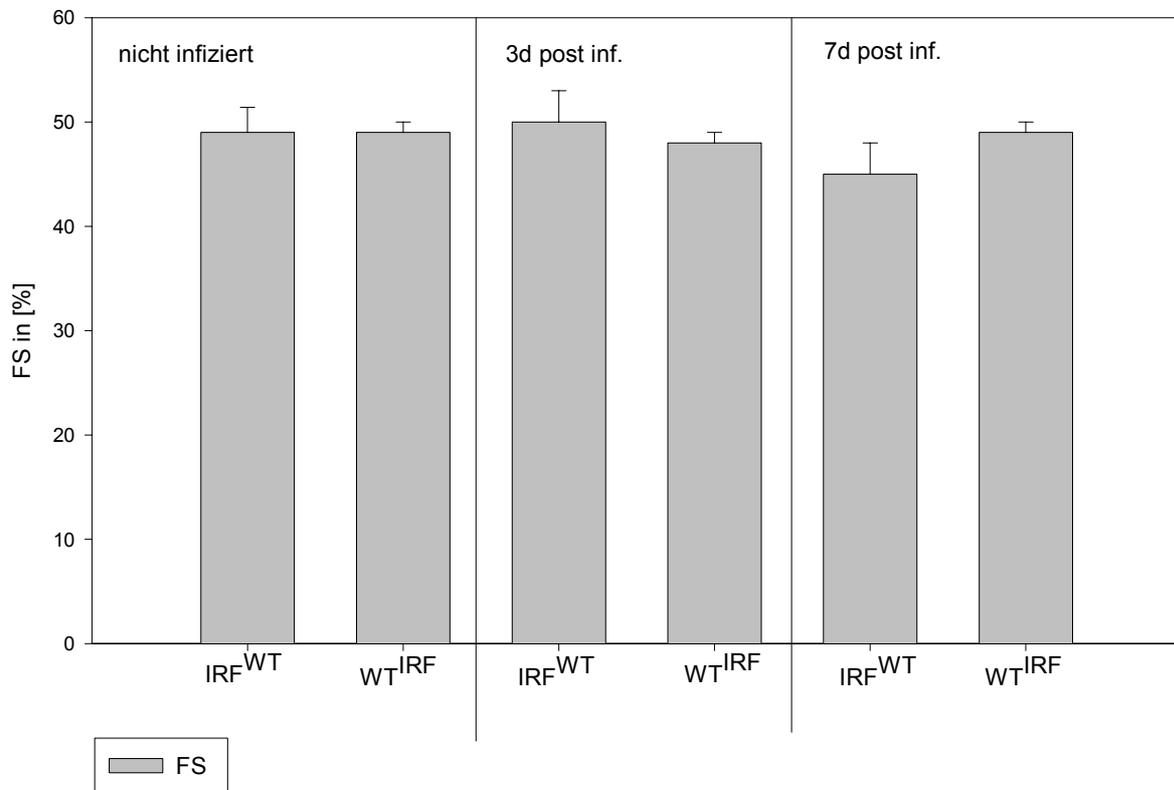
WT: Wildtyp  
 IRF-1-/-: Interferon-Regulator-Faktor 1 defizient  
 IRF<sup>WT</sup>: Interferon-Regulator-Faktor 1 defiziente Tiere wurden mit Knochenmark von Wildtyptieren transplantiert.  
 WT<sup>IRF</sup>: Wildtyptiere wurden mit Knochenmark von IRF-1-/- Tieren transplantiert  
 d3 post inf.: Tag 3 nach der Infektion  
 d7 post inf.: Tag 7 nach der Infektion

**Abbildung 13 : Ermittelte Daten der Serum-Lipase-Aktivität an den nicht transplantierten und transplantierten Testgruppen am Tag 0/3/7.**

Aufgrund der geringen Tierzahl ist es hier nur möglich einen Trend aufzuzeigen.

Am siebten Tag fallen alle Gruppen deutlich ab und nähern sich den Ausgangswerten an.

3.5.8 Ergebnisse der Echokardiographischen Untersuchung im Experiment 2

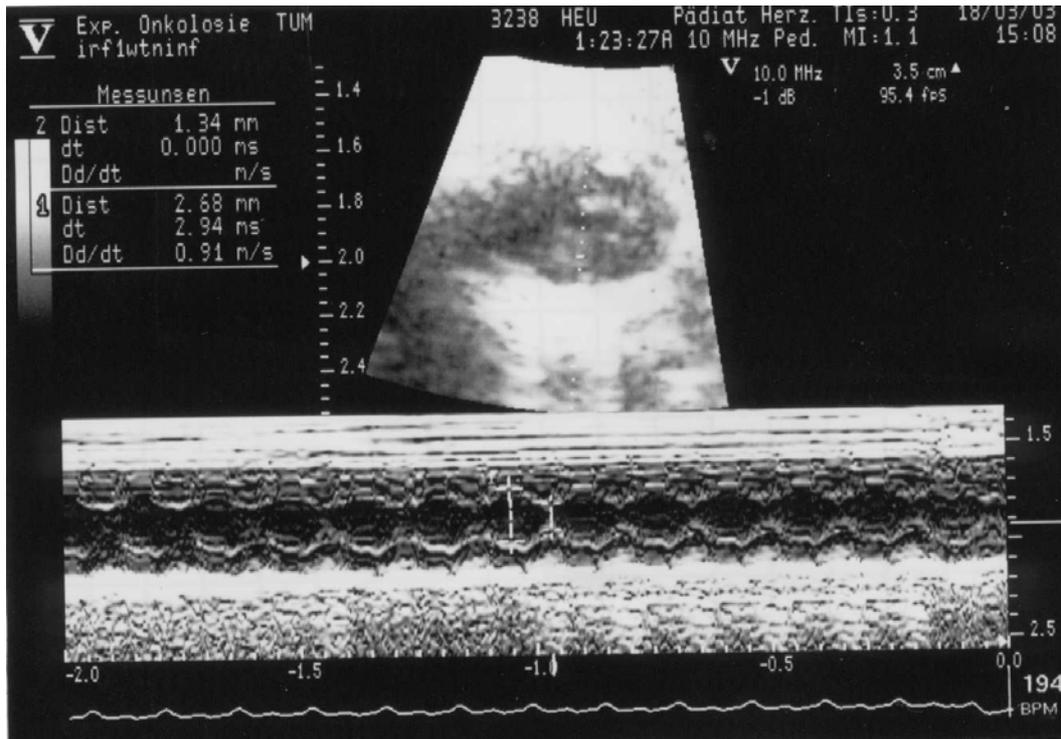


IRF<sup>WT</sup>: Interferon-Regulator-Faktor 1 defiziente Tiere wurden mit Knochenmark von Wildtypieren transplantiert. (n = 3 nicht infiziert, n = 5 am Tag 3, n = 5 am Tag 7)  
 WT<sup>IRF</sup>: Wildtypiere wurden mit Knochenmark von IRF-1<sup>-/-</sup> Tieren transplantiert. (n = 3 nicht infiziert, n = 5 am Tag 3, n = 5 am Tag 7)  
 d3 post inf.: Tag 3 nach der Infektion  
 d7 post inf.: Tag 7 nach der Infektion  
 FS: Fractional Shortening

**Abbildung 14 : Messung der linksventrikulären Kontraktilität (FS) an den transplantierten Gruppen am Tag 0/3/7 nach der Infektion.**

Bei der Messung der FS (Abb. 14) ist zwischen den Tieren der nicht infizierten Gruppen kein signifikanter Unterschied festzustellen.

Auch in den infizierten Gruppen ist weder am dritten noch am siebten Tag eine signifikante Veränderung der Kontraktilität zu messen.



**Abbildung 15 : Messung der Kontraktilität des linken Ventrikels.**

Eine Untersuchung der FS ist durch die beschriebene Apparatur (siehe Abb. 8) und die Vorlaufstrecke gut durchzuführen.

Die Strukturen sind aufgrund der guten Auflösung der 10 MHz-Sonde und der Vorlaufstrecke gut zu erkennen und abzugrenzen.

In der Abb. 15 beträgt der gemessene FS Wert im Mittel 52%.

### 4 DISKUSSION

Das Coxsackievirus B3 (CVB3) ist einer der maßgeblichen Verursacher einer virusinduzierten akuten oder chronischen Herzerkrankung (HENKE et al. 2002). Eine effektive Therapie ist derzeit noch nicht möglich, es gibt aber viele Ansätze hinsichtlich einer Vakzinierung (CHAPMAN et al. 2000; HENKE et al. 2002), oder einer Behandlung mit Interferon induzierenden Ampligenen (PADALKO et al. 2004).

Es kann gezeigt werden, dass CVB3 an die Coxsackie- und Adenovirus-Rezeptoren bindet, welche in hohem Grad im Herz, der Leber, der Lunge und den Nieren von Mäusen vorkommen (BERGELSON et al. 1998). In der vorliegenden Studie kann durch die Titeranalyse und die In-situ-Hybridisierung diese Aussage unterstützt und erweitert werden, da der höchste Anteil der CVB3 Genome im Pankreas detektiert werden konnte.

Auf molekularbiologischer Ebene wird versucht die Zusammenhänge und Interaktionen der Virus-Rezeptoren und ihren Einfluss auf den Kardiotropismus zu erklären (SELINKA et al. 2003).

Die Charakterisierung des Faktors IRF-1 mit IRF-1<sup>-/-</sup> Mäusen steht im konsekutiven Zusammenhang mit vorangegangenen Studien an Typ I-Interferon-Rezeptor defizienten Mäusen, welche nach Infektion mit CVB3 eine frühe Sterblichkeit zeigen (WESSELY et al. 2001). IRF-1<sup>-/-</sup> Mäuse zeigen 3 Tage nach der Virusexposition eine Sterblichkeit von 100%.

#### 4.1 Der Transskriptionsfaktor IRF-1

Die eminente Stellung des Interferon-Regulator-Faktor 1 (IRF-1) wird durch viele Studien gestützt. Seine Funktion als positiver und negativer Wachstumsfaktor wird schon früh von ABDOLLAHI et al. (1991) und YAMADA et al. (1991) erkannt. Neuere Studien zeigen zusätzliche Funktionen des IRF-1 bei der Differenzierung und Proliferation verschiedener Zelltypen und definieren ihn als Tumorsuppressor (TANAKA und TANIGUCHI 2000). Die reduzierte Maturation und Differenzierung der CD 4 und CD 8-Zellen zeigt die FACS-Analyse bei transplantierten und nicht transplantierten Mäusen.

Unter bestimmten Voraussetzungen begünstigt IRF-1 die Apoptose. Dies kann anhand von Untersuchungen an embryonalen Fibroblasten aus IRF-1<sup>-/-</sup> Mäusen gezeigt werden (TANAKA et al. 1994 und 1996b).

Ferner wird durch IRF-1 die Aktivität von Interferonen und damit die zelluläre Immunabwehr reguliert (NGUYEN et al. 1997). Durch die hier erhobenen Daten der FACS-Analyse kann

die Auswirkung einer Defizienz von IRF-1<sup>-/-</sup> auf die zelluläre Immunabwehr im Zusammenhang mit einer CVB3 Infektion weiter eruiert werden.

IRF-1 ist wesentlich am Antigen-Processing beteiligt (WHITE et al. 1996).

1994 zeigen KAMIJO et al., dass bei Defizienz von IRF-1 eine vollständige Abwesenheit von der iNOS festzustellen ist, deren Einfluss auf den klinischen Verlauf von Virusinfektionen hinlänglich durch Veröffentlichungen von DING et al. (1988), LIU et al. (1995) und TUCKER et al. (1996) bekannt ist.

Auch die Maturation der T-Zellen, speziell der CD 8-positiven Zellen, in Thymus und peripheren lymphatischen Organen ist von IRF-1 abhängig (PENNINGER et al. 1997).

## 4.2 Material und Methoden

### 4.2.1 Das Tiermodell Maus

Das Tiermodell der Maus zeigt hier den wesentlichen Vorteil, dass durch gentechnische Manipulation ein IRF-1 defizientes Tier (REIS et al. 1992, WHITE et al. 1996) gezüchtet werden kann. In vorangegangenen Studien über die Myokarditis hat sich das transgene Tiermodell bewährt und wesentliche Erkenntnisse über die coxsackievirale Myokarditis gründen sich auf das Knock-out-Modell. Außerdem ist es von entscheidendem Vorteil, dass Enteroviren auch bei Mäusen eine dem Menschen ähnliche Myokarditis hervorruft (KLINGEL 1992).

Im Verlauf anderer Studien sind bereits verschiedene transgene Mäuse wie NOS2 defiziente Mäuse (ZARAGOZA et al. 1998 und 1999), NK defiziente Mäuse (GODENY und GAUNTT 1987), T-Zell defiziente Mäuse (KISHIMOTO und ABELMANN 1990), sowie TAP1 defiziente Tiere (VAN KAER et al. 1992 und MATSUYAMA et al. 1993) gezüchtet und untersucht worden, damit ist ein direkter Vergleich mit Mäusen mit unverändertem Genpool möglich, was Aussagen über die übergeordnete Funktion des Faktors IRF-1 zulässt.

Ferner ist die Durchführung der echokardiographischen Untersuchung der linksventrikulären Kontraktilität ein etabliertes Verfahren und eine Möglichkeit klinische Aussagen über die nachgeahmte Erkrankung zu treffen (TANAKA et al. 1996a, SAM et al. 2001).

In der vorliegenden Studie wird außer der Infektion durch intraperitoneale Injektion und der Knochenmarktransplantation durch intravenöse Injektion in die Schwanzvene kein weiterer chirurgischer Eingriff vorgenommen, so dass dieses Experiment leicht zu reproduzieren und ohne große Varianzen durchzuführen ist.

### 4.2.2 Coxsackievirus der Gruppe B3

In der vorliegenden Studie wurde das aufbereitete Coxsackievirus von einer infektiösen cDNS Kopie der Woodruff Variante von CVB3 nach KNOWLTON et al. (1996) verwendet. Aufgrund der Pathogenität für den Menschen werden alle Untersuchungen am lebenden Tier oder an den entnommenen Organen unter der Sterilbank durchgeführt.

Bei der echokardiographischen Untersuchung wird mit Handschuhen gearbeitet und der Arbeitsplatz gereinigt und desinfiziert. Verbrauchsmaterialien und auch der Tierkörper werden autoklaviert und als S2 Abfall entsorgt.

### 4.2.3 Plaque-forming-Assay

Der Plaque-forming-Assay ist eine bewährte Methode zur Organtiterbestimmung bzw. der Quantifizierung von CVB3 in den einzelnen Organen (KISHIMOTO und ABELMANN 1990, KNOWLTON et al. 1996, WESSELY et al. 1998). Diese Methode ist auch von in Laborarbeiten ungeübten Personen leicht zu erlernen und durchzuführen.

Nachteil dieser Methode ist besonders in der Virämiephase die Verwischung der Ergebnisse in den einzelnen Organen durch den hohen Blutgehalt der Organe.

### 4.2.4 In-situ-Hybridisierung

Zur Detektion und Quantifizierung enteroviraler Genome im Gewebeverband wird die ISH bereits 1987 von KANDOLF, sowie von KLINGEL (1992) erfolgreich bei Mäusen angewendet.

Im Zusammenhang mit CVB3 infizierten Typ I-Interferon-Rezeptor defizienten Mäusen ist die ISH erneut in Anwendung (WESSELY et al. 2001). Der Vorteil dieser Methode im Vergleich zum Plaque-forming-Assay ist die Untersuchung im Gewebeverband, so dass sowohl Aussagen über die Verteilung des Virus in den einzelnen Organen gemacht werden können, als auch der histo-pathologische Zustand beurteilt werden kann. Dies lässt auch weitere Aussagen über mögliche Todesursachen zu.

### 4.2.5 FACS-Analyse

Die Analyse verschiedener Zell-Populationen mit monoklonalen Antikörpern ist ein etabliertes Verfahren zur numerischen Erfassung markierter Zellen. So zeigen WHITE et al. (1996) den Mangel an CD8-positiven Zellen in IRF-1 defizienten Mäusen.

Zur Messung lymphoider Vorläufer-Zellen nach Transplantation in mit Cytomegalovirus infizierter Mäuse, nutzen ARBER et al. (2003) die FACS-Analyse. Auch sie nutzen die Milz zur Untersuchung der Zell-Populationen.

### 4.2.6 Echokardiographische Untersuchung

Die Durchführung der ultrasonographischen Untersuchung der linksventrikulären Kontraktilität ist ein etabliertes Verfahren und stellt eine Möglichkeit dar, klinische Aussagen über die nachgeahmte Erkrankung im Tiermodell zu treffen (TANAKA et al. 1996a, SAM et al. 2001).

Eine Differenzierung genetisch veränderter Mäuse, in diesem Falle der IRF-1 Knock-out Mäuse, hinsichtlich ihrer kardiovaskulären Eigenschaften kann hier nicht vorgenommen werden (COLLINS et al. 2003).

Der Einfluss des Anästhetikums auf die FS wurde von ROTH et al. (2002) geprüft. Sie zeigen, dass die Auswirkungen des Isofluran verglichen mit anderen Anästhetika gering sind. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Studie auch mit Isofluran gearbeitet. Mit der beschriebenen Apparatur (siehe Abb. 8) ist eine einfache Anwendung der Inhalationsmethode gegeben.

Eine qualitative Verbesserung ist durch die in dieser Studie erstmals angewendete Vorlaufstrecke der Firma Sonopad, welche sich durch ihre akustischen Eigenschaften wie Schallgeschwindigkeit und Impedanz optimal an die Kontur des Untersuchungsgebiets anpasst und so Störechos und Bildverzerrungen in hohem Maße vermieden werden. Ein weiterer Vorteil liegt in der physiologischen Lagerung der Maus, welche bauchwärts auf dem Gelkissen zu liegen kommt und so der Druck auf die Brustwand gering zu halten ist. Dies sehen auch NEMOTO et al. (2002) als wichtige Vermeidung einer Fehlerquelle an.

Ebenso ist die Kontrolle der Rektaltemperatur und die Erhaltung der Körpertemperatur auf 37°C mit einer Wärmelampe von großer Wichtigkeit (NEMOTO et al. 2002).

### 4.3 Auswertung der Ergebnisse

Durch die Darstellung einer Überlebenskurve ist es möglich, eine Aussage über die zeitliche Entwicklung und Agravierung der Infektion *in vivo* zu machen. Am Todestag der Tiere können direkt im Anschluss Untersuchungen, zur Aufklärung der Todesursache durchgeführt werden. Vor Tötung des Tieres wird mit einer Insulinspritze Blut entnommen und nach Abtrennung des Serum die verschiedenen Laborparameter bestimmt. Nach der Tötung der Maus werden die Organe entnommen und für die verschiedenen Untersuchungen zerlegt und eingebettet. Damit sind alle Organe konserviert und können zu einem späteren Zeitpunkt weiter verarbeitet werden.

Für die FACS-Analyse muss 1/3 der Milz sofort post mortem in ein entsprechendes Medium verbracht werden, anschließend eine Einzelzellsuspension hergestellt und, nach Behandlung mit den verschiedenen Antikörpern, die FACS Auswertung durchgeführt werden.

Deutlich zeigt sich bei der Auswertung der Überlebenskurve, dass das Überstehen einer Infektion mit CVB3 von dem Vorhandensein des Faktor IRF-1 abhängt. Es zeigt sich eine Mortalität von 100% am dritten Tag post infectionem bei den IRF-1 defizienten Tieren. Dieser Phänotyp kann durch eine Knochenmarktransplantation attenuiert werden, wie das Überleben der Gruppe der IRF<sup>WT</sup> zeigt.

Die Analyse des Virustiters mit dem Plaque-forming-Assay ist ein etabliertes Verfahren, welches auch ohne große Labor- und Zellkulturerfahrung nach kurzer Einarbeitungszeit durchgeführt werden kann. Es ist darauf zu achten, dass die unmittelbar *post mortem* entnommenen Organe erst in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann bei -70 °C gelagert werden.

In den so fixierten Organen ist das im Organismus zirkulierende Blut noch vorhanden und verfälscht dadurch, besonders in der Virämiephase am dritten Tag, den Titergehalt des jeweiligen Organs.

Dies erklärt den relativ einheitlichen Titergehalt in allen Organen am dritten Tag nach der Infektion.

Bei den nicht transplantierten Gruppen (Experiment 1) ist am siebten Tag nur im Herz ein Virusgehalt nachweisbar.

Dieser ist im Vergleich zum dritten Tag signifikant erniedrigt.

Bei den transplantierten Gruppen (Experiment 2) sind am dritten Tag wieder ähnliche Virustiter zu sehen, am siebten Tag ist im Herz in beiden transplantierten Gruppen Virus

## DISKUSSION

---

nachweisbar. Nur in der Gruppe der WT<sup>IRF</sup> Tiere zeigt sich auch in den anderen Organen noch Virusgehalt.

Diese Ergebnisse zeigen deutlich die Kardiotropie von CVB3. Ferner offenbart sich, dass eine Virusclearance am 7. Tag nur bei nicht defizienten Tieren erfolgt ist.

Die In-situ-Hybridisierung (ISH) ist eine exakte Methode zum Nachweis von Virusgenomen mit Gensonden. Voraussetzung ist eine vollständige Sequenzierung des zu detektierenden Virus.

Die höchste Viruslast ist am dritten Tag bei den nicht transplantierten Tieren im Pankreas zu finden. Am siebten Tag ist die Virusmenge im Herzen tendenziell höher als in anderen Organen, in Leber und Lunge kann kein Virus mehr detektiert werden.

In den transplantierten Gruppen (Experiment 2) ist die größte Viruslast, sowohl am dritten Tag wie auch am siebten Tag im Pankreas zu sehen. In der Gruppe der IRF<sup>WT</sup> zeigt sich eine signifikante Reduktion an Virusgenomen in Pankreas und Niere.

Die FACS- Analyse ist ein etabliertes, exaktes und, bei optimaler Organbearbeitung, zuverlässiges Verfahren zur Erfassung spezieller Zellpopulationen durch Markierung von Oberflächenfaktoren.

Die Untersuchung der B-, T- und myeloiden Zellpopulationen zeigt eine Korrelation zwischen dem Überleben einer CVB3-Infektion und einem funktionstüchtigem Zellapparat.

Der Anteil der myeloiden Zellen wie Monozyten, Natürlichen Killer-Zellen und Makrophagen (CD 11b) steigt bei den WT-Tieren vom Ausgangswert, über den dritten bis zum siebten Tag post infectionem stetig an, während bei den IRF-1<sup>-/-</sup> Tieren der Ausgangswert am dritten Tag eine fallende Tendenz aufweist.

In den transplantierten Gruppen zeigen die IRF<sup>WT</sup> einen ähnlichen Verlauf wie die WT Tiere, bei den WT<sup>IRF</sup> Mäusen steigt der Anteil an CD 11b positiven Zellen am dritten Tag signifikant an und fällt am siebten Tag auf den Ausgangswert zurück.

Die relative CD 4 (T-Helfer-Zellen) Expression ist bei den IRF-1<sup>-/-</sup> signifikant höher, der Anteil an CD 8 (cytotoxischen T-Zellen) niedriger im Ausgangswert und am 3. Tag nach der Infektion. Dieses Bild zeigt sich bei den transplantierten Gruppen nicht mehr. Die Defizienz an CD 8-positiven Zellen kann durch die Knochenmarktransplantation aufgehoben werden.

Die B-Zellen (B220) zeigen bei den nicht transplantierten Gruppen vor und nach der Infektion (d3 und d7) wenig Veränderungen.

In den transplantierten Gruppen fällt der Anteil der B-Zellen am dritten Tag post infectionem in der Testgruppe der WT<sup>IRF</sup> signifikant ab (siehe Tabelle 19). Eine signifikante Rekonstruktion zeigt sich am siebten Tag (siehe Tabelle 21). Offensichtlich ist der B-Zellapparat

## DISKUSSION

---

bei IRF-1-/- Tieren nicht in der Lage in gleicher Geschwindigkeit zu reagieren wie die WT-Tiere.

Untersuchungen der Laborparameter und deren Interpretation unterliegen einer starken Limitierung. Aufgrund des geringen Gesamtblutvolumens müssen oftmals Verdünnungen des Serum hergestellt werden, um die gewünschte Menge an Parametern bestimmen zu können.

Auch die häufig auftretende Hämolyse führt zu einer Verfälschung der Werte und bedingt eine relativ große Varianz zwischen den Einzeltieren.

Deutlich zeigt sich jedoch bei allen infizierten Tieren am dritten Tag der Anstieg der Serum-GPT-Aktivität und deren signifikanter Abfall am siebten Tag, wobei die höchsten Werte am dritten und siebten Tag in der Gruppe der WT<sup>IRF</sup> Tiere zu finden sind.

Ein ähnliches Bild zeigt sich auch bei der Beurteilung der Serum-Lipase-Aktivität.

Die echokardiographischen Untersuchungen werden hier erstmals mit einer Vorlaufstrecke der Firma SONOPAD durchgeführt, welche eine optimale Auflösung bei physiologischer Lagerung der Maus ermöglicht.

Dies ist eine weitere Möglichkeit *in vivo* festzustellen, ob die Infektion Auswirkungen auf die Kontraktilität des linken Ventrikel (FS) hat. Die Untersuchung ist relativ rasch durch einen geübten Untersucher bei einer Vielzahl von Mäusen durchzuführen. Die Tiere selbst werden durch die Untersuchung nur in geringem Maße gestresst, da sie nach Abatmung des Narkosegases innerhalb weniger Minuten wach sind.

Wichtig anzumerken ist die korrekte Vorbereitung der Maus durch Rasur im seitlichen Thoraxbereich, sowie die Lagerung, die Thermoregulation und Befeuchtung der Vorlaufstrecke, um ein optimales Ergebnis zu erzielen.

Diese vorliegende Untersuchung stellt eine sinnvolle Ergänzung der labortechnischen Analysen dar, da hier klinisch relevante, funktionelle Aspekte im Vordergrund stehen.

Beim Vergleich der einzelnen Gruppen zeigt sich keine signifikante Veränderung der FS zwischen nicht infizierten und infizierten Tieren (Tag 3 und 7). Somit kann ein Tod der Tiere durch eine Herzinsuffizienz ausgeschlossen werden.

### 4.4 Schlussfolgerung

Das Ziel der vorliegenden Dissertation ist es, die Bedeutung des Transskriptionsfaktors IRF-1 im Hinblick auf die coxsackievirale Myokarditis bei der Maus zu untersuchen.

Es kann deutlich gezeigt werden, dass es ohne IRF-1 kein Überleben einer coxsackieviralen Infektion geben kann, da sich eine Defizienz gravierend auf die Populationen der myeloiden Zellen und dem Verhältnis von Thy1.2, CD4 und CD8 auswirkt und damit auf die Virusclearance Einfluss nimmt. Somit erfolgt keine Inhibition der Virusreplikation zum kritischen Zeitpunkt der Infektion (zweiter bis vierter Tag nach der Infektion), da die Rekonstitution bei defizienten Tieren, entweder zu langsam oder überhaupt nicht erfolgt.

Nachfolgende Untersuchungen der NO Synthese an Präparaten der Mäuse aus diesem Experiment sind momentan in Bearbeitung durch Frau Dr. med. K. Klingel, Institut für Molekulare Pathologie Universität Tübingen.

Weitere Studien an defizienten Tieren sind bereits in Vorbereitung, um nun therapeutisch die durch die IRF-1 Defizienz ausgelöste Immunschwäche auszugleichen oder in der frühen Phase der Infektion die Replikation durch Chemotherapeutika und/ oder Interferone zu beeinflussen. Ein anderer Ansatz ist die Applikation einer rekombinanten Coxsackievirus Variante im Sinne einer Vakzinierung (HENKE et al. 2002).

### **Charakterisierung des pathophysiologischen Stellenwertes des Transkriptionsfaktors Interferon-Regulator-Faktor-1 (IRF-1) bei der Coxsackievirus- Infektion der Maus.**

Das Coxsackievirus B3, ein Mitglied der Familie der Picornaviren ist immer noch eine der Hauptursachen für eine virusinduzierte akute oder chronische Herzerkrankung bei Menschen unter 40 Jahren.

In der vorliegenden Studie soll der Stellenwert des Transskriptionsfaktors IRF-1 und seine direkten und indirekten antiviralen Effekte auf eine Infektion mit CVB3 am Tiermodell untersucht werden.

Dazu werden im Experiment 1 sechs Wildtyp-Mäuse (WT) und sechs IRF-1<sup>-/-</sup> Mäuse mit einer Infektionsdosis von 100 $\mu$ l der Konzentration 10E6pfu /ml intraperitoneal infiziert. Jeweils drei Tiere aus jeder Gruppe dienen als nicht infizierte Kontrollen. Aufgrund der Sterblichkeit der IRF-1<sup>-/-</sup> Mäuse am dritten Tag nach der Infektion werden auch die sechs WT Tiere am dritten Tag getötet. Eine separate Gruppe von WT Tieren (n = 4) wird erst am siebten Tag euthanasiert.

Nach echokardiographischer Untersuchung der FS und Blutentnahme werden die Tiere getötet und bei allen Mäusen die Organe für die FACS- Analyse, die Titeranalyse und die ISH-Untersuchung entnommen und aufbereitet.

Im Experiment 2 werden die Tiere subletal bestrahlt und mit unterschiedlichem Knochenmark transplantiert (WT oder IRF-1<sup>-/-</sup> Knochenmark). 13 bestrahlte WT Tiere werden mit Knochenmark von IRF-1<sup>-/-</sup> Tieren transplantiert (WT<sup>IRF</sup>) und 13 IRF-1<sup>-/-</sup> Mäuse bekommen nach Bestrahlung Knochenmark von Wildtyptieren (IRF<sup>WT</sup>). Jeweils vier Tiere pro Testgruppe werden wie in Experiment 1 infiziert und am 3. Tag getötet, jeweils fünf Tiere pro Gruppe werden infiziert und hinsichtlich der Überlebenszeit mituntersucht. Die oben genannten Untersuchungen werden am jeweiligen Todestag durchgeführt.

Die anderen 4 Tiere je Gruppe dienen als nicht infizierte Kontrollen.

Der Faktor IRF-1 ist essentiell für das Überleben einer coxsackieviralen Infektion. Durch Knochenmarktransplantation kann der Phänotyp der Mortalität am dritten Tag nach der Infektion bei den IRF-1<sup>-/-</sup> Mäusen attenuiert werden. Dies zeigt sich in der Überlebenskurve (siehe Abb. 9). Das Überleben einer CVB3 Infektion entscheidet sich in der frühen Phase der Infektion, zwischen dem zweiten und vierten Tag. Zu diesem Zeitpunkt sind bei den IRF-1<sup>-/-</sup> Tieren zu wenig Makrophagen, Monozyten und natürliche Killer-Zellen (CD11b) vorhanden. Durch diesen Mangel sind die IRF-1<sup>-/-</sup> Mäuse nicht in der Lage die Virusreplikation und

## ZUSAMMENFASSUNG

---

frühe Schädigung zu kompensieren und ist so ein wichtiger Faktor, der zum Tod der Mäuse führt. Auch die Aktivierung der B-Zellen (B220) und der T-Zellen (Thy 1.2, CD4 und CD8) setzt erst nach der entscheidenden Phase ein. Die Virusclearance steht in engem Zusammenhang mit der Menge an cytotoxischen T-Zellen (CD 8), die Defizienz an CD8-positiven Zellen kann durch die Transplantation mit WT Knochenmark aufgehoben werden. Keine signifikant unterschiedlichen Ergebnisse ergab die echokardiographische Untersuchung der Mäuse.

6

### SUMMARY

#### **The patho-physiological assessment of Interferon Regulatory Factor-1 (IRF-1) in the coxsackieviral infection in mice.**

The Coxsackievirus B3 belonging to the family of Picorna virus is still one of the main causes for an acute and chronic heart disease induced by virus, which affects humans under age of 40.

The objections of this thesis lie to determine the impact and the antiviral effect of IRF-1 and the bone marrow transplantation on an infection by CVB3 with an animal-model.

In the first experiment, six Wildtype- (WT) and six IRF<sup>-/-</sup> mice are infected intraperitoneally with a dose rate of 10E5 pfu/ml. Additionally, three further mice of each group (WT and IRF<sup>-/-</sup>) are utilized as blanks, which are not infected. Since the mortality of the infected IRF<sup>-/-</sup> mice occurs on the third day, the WT mice are also eliminated on the same day. Additionally, four WT mice were killed on the seventh day in order to compare the results in the second experiment.

Having conducted an ultrasonographic analysis of the FS and a blood withdrawal, all the mice are killed and the organs of them are taken out and prepared for the FACS, the PFA analysis and the ISH analysis.

In the second experiment, the mice are irradiated subletally and transplanted with bone marrow of WT and IRF<sup>-/-</sup> mice. Altogether, 13 WT mice are irradiated and obtained bone marrow of IRF<sup>-/-</sup> mice (WT<sup>IRF</sup>) and 13 IRF<sup>-/-</sup> mice are irradiated and obtained bone marrow of WT-mice (IRF<sup>WT</sup>), respectively. Four mice per group are infected alike in experiment 1, killed on the third day, and analyzed. The other five mice are killed on the seventh day. The last four mice per group are utilized as blanks.

All analyses mentioned above are conducted at the day of death for each individual mouse. The factor IRF-1 is essential for the survival of a coxsackieviral infection. The phenotype of mortality can be attenuated by transplantation of bone marrow for the infected IRF<sup>-/-</sup> mice on the third day, which can be stated in the survival curve. The clearance of virus is related closely to the amount of cytotoxic T-cells. The deficiency of CD 8 positive cells can be ceased by the transplantation of WT bone marrow.

No significant results yield the ultrasonographic analysis of the mice.

7 LITERATURVERZEICHNIS

ARBER C., BITMANSOUR A., SPARER TE., HIGGINS JP., MOCARSKI ES., WEISSMAN IL., SHIZURU JA., BROWN JM.

Common lymphoid progenitors rapidly engraft and protect against lethal murine cytomegalovirus infection after hematopoietic stem cell transplantation.  
Blood 2002; 12: 3834.

ARCHARD L.C., RICHARDSON P.J., OLSEN E.G., DUBOWITZ V., SEWRY C. BOWLES N.E.

The role of Coxsackievirus B viruses in the pathogenesis of myocarditis, dilated cardiomyopathy and inflammatory muscle disease.  
Biochem Soc Symp 1987; 53: 51-62.

ABDOLLAHI A., LORD KA., HOFFMAN-LIEBERMANN B., LIEBERMANN DA.

Interferon regulatory factor 1 is a myeloid differentiation primary response gene induced by interleukin 6 and leukemia inhibitory factor: role in growth inhibition.  
Cell growth Differ 1991; 2: 401-407.

BABOONIAN C., DAVIES MJ., BOOTH JC., MCKENNA WJ.

Coxsackie B viruses and human heart disease.  
Curr Top Microbiol Immunol 1997; 223: 31-52.

BADORFF C., LEE GH., LAMPHEAR BJ., MARTONE ME., CAMPBELL KP., RHOADS RE., KNOWLTON KU.

Enteroviral protease 2A cleaves dystrophin: evidence of cytoskeletal disruption in an acquired cardiomyopathy.  
Nat Med. 1999; 5: 320-326.

BADORFF C., BERKLEY N., MEHROTRA S.

Enteroviral protease 2A directly cleaves dystrophin in vivo in the hinge 3 region and can be inhibited by a dystrophin-based substrate analogue.  
J Biol Chem. 2000; 275: 11191-11197.

BARBARO G., DI LORENZO G., GRISORIO B., BABARINI G.

Incidence of dilated cardiomyopathy and detection of HIV in myocardial cells of HIV positive patients.  
N Engl J Med 1998; 339: 1093-1099.

BECKER AE.

Myocarditis

In Silver MD (ed) Cardiovascular pathology, Vol 1 Churchill Livingstone, Edinburgh 1991: 719-741.

BERGELSON JM., KRITHIVAS A., CELI L.

The murine CAR homolog is a receptor for coxsackie B viruses and adenoviruses.  
J Virol 1998; 72: 415-419.

BÖTTGER BW., FLEISCHER F.

Medikamentöse Therapie der koronaren Herzkrankheit.  
Anästhesist 1994; 43: 699-717.

CHAPMAN N., RAGLAND A., LESER JS.

A group B coxsackievirus/ poliovirus 5' non-translated region chimera can act as an attenuated vaccine strain in mice.

J Virol 2000; 74: 4047-4056.

COLLINS KA., KORCARZ CE., LANG RM.

Use of echocardiography for the phenotypic assessment of genetically altered mice.

Physiol Genom 2003; 13: 227-239.

COOPER L.T. JR., BERRY GJ., SHABETAI R.

Idiopathic giant-cell myocarditis-natural history and treatment.

N Engl J Med 1997; 336: 1860-1866.

DARGIE H.J., MCMURRAY JJ., MCDONAGH TA.

Heart failure-- implications of the true size of the problem.

J Intern Med 1996; 239: 309-315.

DECKER HJ.

In situ Hybridisierung.

GIT Verlag GmbH, Darmstadt, Sonderdruck Management Krankenhaus 5/2001

DIAZ R.A., OBASOHAN A., OAKLEY C.M.

Prediction of outcome in dilated cardiomyopathy.

Br Heart J 1987; 58: 393-399.

DING AH., NATHAN CF., STUEHR DJ.

Release of reactive nitrogen intermediates and comparison of activating cytokines and evidence for independent production.

J Immunol. 1988; 141: 2407-2412.

DISNEY ME., HOWARD EM., WOOD BSB.

Myokarditis in children.

Br Med J 1953; 1: 1351-1354.

DOGGRELL SA., BROWN L.

Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure.

Cardiovasc Res 1998; 39: 89-105.

DRORY Y., TURETZ Y., HISS Y., LEV B., FISHMAN E., PINES A., KRAMER M.

Sudden unexpected death in persons  $\leq$  40 years of age.

Am J Cardiol 1991; 68: 1388-1392.

FEENSTRA J., GROBBEE D.E., REMME W.J., STRICKER B.H.

Drug-induced heart failure.

J Am Coll Cardiol 1999; 33: 1152-1162.

FOULIS AK., FARQUHARSON MA., CAMERON SO., MCGILL M., SCHÖNKE H., KANDOLF R.

## LITERATURVERZEICHNIS

---

A search for the presence of the enteroviral capsid protein VP1 in pancreases of patients with Type 1 (insulindependent) diabetes and pancreases and hearts of infants who died of coxsackieviral myocarditis.

Diabetologia 1990; 33: 290-298.

GODENY EK., GAUNTT CJ.

Murine natural killer cells limit coxsackvirus B3 replication .

J Immunol 1987; 139: 913-918.

GRAVANIS MB., STERNBY NH.

Incidence of myocarditis. A 10 year autopsy study from Malmö Sweden.

Arch Pathol Lab Med 1991; 115: 390-392.

HARDY R.

Resolution and characterisation of pro-B cell stages in normal mouse bone marrow.

J Exp Med 1991; 173: 1213-1225.

HASENFUSS G.

Animal models of human cardiovascular disease, heart failure and hypertrophy.

Cardiovasc Res 1998; 39: 60-76.

HASSINK R., DE LA RIVIERE A., MUMMERY C., DOEVENDANS P.

Transplantation of cells for cardiac repair.

J Am Coll Cardio 2003; 41: 711-717.

HENKE A., JARASCH N., WUTZLER P.

Vaccination procedures against Coxsackievirus-induced heart disease.

Expert Rev Vaccines.2002; 2: 805-815.

HOFLING K., TRACY S., CHAPMAN N., LESER SL.

Expression of the antigenic adenovirus type 2 hexon protein L1 loop region in a group B coxsackievirus.

J Virol 2000; 74: 4570-4578.

HOIT B.

Two faces of Stickstoff Monoxide

Circulation 2001; 89: 289.

HOIT BD., BALL N., WALSH RA.

Invasive hemodynamics and force-frequency relationships in openversus and closed-chest mice.

Am J Physiol Heart Circ Physiol 1997; 273: H2528-H2533.

IKEHARA S.

Treatment of autoimmune diseases by hematopoietic stem cell transplantation.

Exp Hematol 2001; 29: 661-669.

IMASAWA T.

Roles of bone marrow cells in glomerular diseases.

Clin Exp Nephrol 2003; 7: 179-185.

## LITERATURVERZEICHNIS

---

JANEWAY C.

The T cell receptor as a multicomponent signaling machine: CD4/CD8 coreceptors and CD45 in T cell activation.

Annu Rev Immunol 1992; 10: 645-674.

JOHN H., BIRNSTIEL M., JONES K.

RNA: DNA hybrids at the cytogenetical level.

Nature 1969; 223: 582-587.

KAMIJO R., HARADA H., MATSUJAMA T.

Requirement for transcription factor IRF-1 in NO synthase induction in macrophages.

Science 1994; 263: 1612-1615.

KANDOLF R., HOFSCHEIDER PH.

Molecular cloning of the genome of a cardiotropic coxsackie B3 virus: fulllength reverse-transcribed recombinant cDNA generates infectious virus in mammalian cells.

Proc Natl Acad Sci USA 1985; 82: 4818-4822.

KANDOLF R., CANU A., HOFSCHEIDER PH.

Coxsackie B3 virus can replicate in cultured human foetal heart cells and is inhibited by interferon.

J Mol Cardiol 1985; 17: 167-181.

KANDOLF R., AMEIS D., HOFSCHEIDER PH.

In situ detection of enteroviral genomes in myocardial cells by nucleic acid hybridisation: an approach to the diagnosis of viral heart disease.

Proc Natl Acad Sci 1987; 84: 6272-6276.

KANDOLF R., KLINGEL K., ZELL R., SELINKA HC., SCHNEIDER-BRACHERT W., BÜLTMANN B.

Molecular pathogenesis of enterovirus-induced myocarditis: virus persistence and chronic inflammation.

Intervirology 1993; 35: 140-151.

KASS DA., MAUGHAN WL., GUO ZM., KONO A., SUNAGAWA K. AND SAGAWA K.

Comparative influence of load versus inotropic status on indexes of ventricular contractility: experimental and theoretical analysis based on pressure-volume relationships.

Circulation 1987; 76: 1422-1436.

KILBURNE ED., WILSON CB., PERRIER D.

The induction of gross myocardial lesions by a coxsackieviral (pleurodynia) virus and cortisone.

J Clin Invest 1956; 35: 361-367.

KIM KS., HUFNAGEL G., CHAPMAN NM., TRACY S.

The group B coxsackieviruses and myocarditis.

Rev Med Virol 2001; 11: 355-68.

KIRCHHOFF S., SCHAPER F., HAUSER H.

Interferon regulatory factor I (IRF-1) mediates cell growth inhibition by transactivation of downstream target genes.

## LITERATURVERZEICHNIS

---

Nucleic Acids Res 1993; 21: 2881-2889.

KIRK U., KNOWLTON KU., JEON E.-S., BERKLEY N., WESSELY R.

A mutation in the puff region of VP2 attenuates the myocarditic phenotype of an infectious cDNA of the Woodruff variant of Coxsackievirus B3.

J Virologie 1996;11:7811-7818.

KISHIMOTO C., ABELMANN WH.

In vivo significance of T-cells in the development of Coxsackievirus B3 myocarditis in mice. Immature but antigen-specific T cells aggravate cardiac injury.

Circ Res 1990; 67: 589-598.

KLINGEL K.

Ongoing enterovirus-induced myocarditis associated with persistent heart muscle infection: quantitative analysis of virus replication recombinant cDNA generates infectious virus in mammalian cells.

Proc Natl Acad Sci USA 1992; 82: 4818-4822.

KLUMP WM., BERGMANN I., MÜLLER BC., AMEIS D., KANDOLF R.

Complete nucleotide sequence of infectious coxsackievirus B3 cDNA: two initial 5' uridine residues are regained during plus-strang RNA synthesis.

J Virol 1990; 64: 1573-1583.

KNOWLTON KU., JEON ES., BERKLEY N., WESSELY R., HUBER S.

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: 7811-7818.

KNOWLTON KU., BADORFF C.

The immune system in viral myocarditis: maintaining the balance.

Circ Res 1999; 85: 559-561.

KOHLER G., MILSTEIN C.

Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. 1975.

Biotechnology 1992; 24: 524-6.

KUBY J.

Immunology 2<sup>nd</sup> ed.

Freeman and Company 1994

KUSHIDA T., INABA M., IKEBUKURO K.

A new method for bone marrow cell harvesting.

stem cells 2000; 18:453-456.

LEATHERBURY L., YU Q., LO CW.

Noninvasive phenotypic analysis of cardiovascular structure and function in fetal mice using ultrasound.

Birth Defects Res Part C Embryo Today 2003; 69: 83-91.

LEITCH AR., SCHWARZACHER T., JACKSON D., LEITCH IJ.

In situ-Hybridisierung.

Spektrum Heidelberg, Berlin, Oxford 1994

LIU P., PENNINGER J., AITKEN K., SOLE M., MAK T.  
The role of transgenic knockout models in defining the pathogenesis of viral heart disease.  
Eur Heart J 1995; 16: 25-27.

LOWENSTEIN CJ., HILL SL., LAFOND-WALKER A., WU J., ALLEN J., LANDAVERE M., ROSE NR., HERSKOWITZ A.  
Stickstoff Monoxide inhibits viral replication in murine myocarditis.  
J Clin Invest 1996; 97: 1837-1843.

LOWENSTEIN C.J.  
NO news is good news.  
PNAS 1999; 96: 10953-10954.

MAISCH B., SCHÖNIAN U., HERZUM M., HUFNAGEL G., KLEIN HH., BETHGE C.  
Immunosuppressive treatment in autoreactive myocarditis-results from a controlled trial.  
J Am Coll Cardiol 1993; 21: 703.

MALL G.  
Morphologie der Myokarditis  
Internist 1995; 36: 426-429.

MARMONT AM.  
Immune ablation followed by allogeneic or autologous bone marrow transplantation: a new treatment for severe autoimmune diseases?  
Stem Cells 1994; 12: 125-135.

MARTINO TA., LIU P., SOLE MJ.  
Viral infection and the pathogenesis of dilated cardiomyopathy.  
Circ Res 1994; 74: 182-188.

MATSUMORI A.  
Lessons from animal experiments in myocarditis.  
Herz 1992; 17: 107-111.

MATSUYAMA T.,<sup>1</sup> KIMURA T., KITAGAWA M., PFEFFER K., KAWAKAMI T., WATANABE N., KÜNDIG TM.  
Targeted disruption of IRF-1 and IRF-2 results in abnormal type I IFN gene induction and aberrant lymphocyte development.  
Cell 1993; 75: 83-97.

MELNICK J., SHAW E., CURNEN E.,  
A virus from patients diagnosed as non-paralytic poliomyelitis or aseptic meningitis.  
Proc Soc Exp Biol Med 1949; 71: 344-349.

MELNICK JL  
Viral infections of humans.  
Evans AF (ed), Plenum, New York, 1989: 191-263

MIKAMI S., KAWASHIMA S., KANAZAWA K.

Expression of nitric oxide synthase in a murine model of viral myocarditis by coxsackievirus B3.

Biochem Biophys Res Commun 2001; 220: 983-989.

MIYAMOTO M., FUJITA T., KIMURA Y., HARADA H., SUDO Y., MIYATA T. AND TANIGUCHI T.

Regulated expression of a gene encoding a nuclear factor, IRF-1, that specifically binds to IFN-beta gene regulatory elements.

Cell 1998; 54: 903-913.

NEMOTO S., DEFREITAS G., MANN D., CARABELLO B.

Effects on changes in left ventricular contractility on indexes of contractility in mice.

Am J Physiol Heart Circ Physiol 2002; 283: 2504-2510.

NGUYEN H., HISCOTT J., PITHA PM.

The growing family of IRF transcription factors.

Cyt Growth Fact Rev 1997; 8: 293-312.

OSAWA M.

Hematopoietic Stem Cells 5<sup>th</sup> ed. Weir's Handbook of Experimental Immunology

Blackwell Science Vol II, 1996: 66.1-66.5.

PACKER M., GHEORGHIAD E., YOUNG JB., COSTANTINI PJ., ADAMS KF., CODY RJ., SMITH LK., VAN VOORHEES L., GOURLEY LA., JOLLY MK.

Withdrawal of digoxin from patients with chronic heart failure treated with angiotensin-converting-enzyme.

N Engl J Med, 1993; 329: 1-7.

PADALCO E., NUYENS D., DE PALMA A., VERBEKEN E., AERTS JL., DE CLERCQ E., CARMELIET P., NEYTS J.

The interferon inducer amplitgen markedly protects mice against coxsackie B3 virus-induced myocarditis.

Antimicrob Agents Chemother. 2004; 48: 267-74.

PARDUE ML., GALL JG.

Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations.

Proc Nat Acad Sci USA 1969; 64: 600-604.

PENNINGER JM., SIRARD C., MITTRUCKER HW., CHIDGEY A., KOZIERADZKI I., NGHIEM M., HAKEM A., KIMURA T., TIMMS E., BOYD R., TANIGUCHI T., MATSUYAMA T., MAK TW.

The interferon regulatory transcription factor IRF-1 controls positive and negative selection of CD8<sup>+</sup> thymocytes.

Immunity 1997; 7: 243-54.

REIS LF., HARADA H., WOLCHOK JD., TANIGUCHI T., VILCEK J.

Critical role of a common transcription factor, IRF-1, in the regulation of IFN- $\beta$  and IFN-inducible genes.

Embo J 1992; 11: 185-193.

ROTH D., SWANEY J., DALTON N., GILPIN E., ROSS J.

## LITERATURVERZEICHNIS

---

Impact of anesthesia on cardiac function during echocardiography in mice.  
Am J Physiol Heart Circ Physiol 2002; 282: 2134-2140.

RUECKERT RR.,  
Picornaviridae and their replication.  
Fields BN, Knipe DM Virology, 1990: 507-548.

RUECKERT RR.  
The enteroviruses.  
Fundam Virol 1996; 477-522.

SAM F., SAWYER DB., XIE Z., CHANG D., NGOY S., BRENNER D., SIWIK D., SINGH K., APSTEIN C., COLUCCI W.  
Mice lacking inducible nitric oxide synthase have improved left ventricular contractile function and reduced apoptotic cell death late after myocardial infarction.  
Circ Res 2001; 89: 351.

SAURA M., ZARAGOZA C., MCMILLAN A.,  
An antiviral mechanism of nitric oxide: inhibition of a viral protease  
Immunity 1999; 10: 21-28.

SAVOIA MC., OXMAN MN.,  
Myokarditis, pericarditis and mediastinitis.  
In: Mandell GL., Douglas Jr RG., Bennett JE., Principles and Practice of Infectious Diseases.(ed) 1990; 721-732.

SCHOFIELD CJ., DIAS JC.  
The southern cone initiative against chagas disease.  
Adv Parasitol 1999; 42: 1-27.

SCHULTHEISS HP., KÜHL U., JANDA I., SCHANWELL M., STRAUER BE.  
Immunsuppressive Therapie der Myokarditis?  
Herz 1992; 17: 112-121.

SCHWIMMBECK P.L., ROHN G., WRUSCH A., SCHULZE K., DOERNER A., KUEHL U., TSCHOEPE C., PAUSCHINGER M., SCHULTHEISS H.-P.  
Enteroviral und immunvermittelte Myokarditis bei SCID-Mäusen.  
Herz 2000; 25: 240-244.

SELINKA HC., WOLDE A., SAUTER M., KANDOLF R., KLINGEL K.  
Virus-receptor interactions of coxsackie B viruses and their putative influence on cardiotropism.  
Med Microbiol Immunol (Berl). 2003.

SINGAL P.K., ILISKOVIC N.  
Doxorubicin-induced cardiomyopathy.  
N Engl J Med 1998; 339: 900-905.

SOARES MB., LIMA RS., ROCHA LL., TAKYIA CM., PONTES-DE-CARVALHO L., DE CARVALHO AC., RIBEIRO-DOS-SANTOS R.

## LITERATURVERZEICHNIS

---

Transplanted bone marrow cells repair heart tissue and reduce myocarditis in chronic chagasic mice.

Am J Pathol 2004; 164: 441-447.

STARK G.R., KERR I.M., WILLIAMS B.R.G., SILVERMAN R.H., SCHREIBER R.D.

How cells respond to interferons.

Annu Rev Biochem 1998; 67: 227-264.

SWIGER RR., TUCKER JD.

Fluorescence in situ hybridization: A brief review.

Environmental and Molecular Mutagenesis 1996; 27: 245-254.

TANAKA N., ISHIHARA M., KITAGAWA M., HARADA H., KIMURA T., MATSUYAMA T., LAMPHIER M.S., AIZAWA S., MAK T.W., TANIGUCHI T.

Cellular commitment to oncogene-induced transformation or apoptosis is dependent on the transcription factor IRF-1.

Cell 1994; 77: 829-839.

TANAKA N., DALTON N., MAO L., ROCKMAN HA., PETERSON KL., GOTTSCHALL KR., HUNTER JJ., CHIEN KR., ROSS J. JR.

Transthoracic echocardiography in models of cardiac disease in mouse.

Circulation 1996a; 94: 1109-1117.

TANAKA N., ISHIHARA M., NOZAWA H., MATSUYAMA T., MAK T.W., AIZAWA S., TOKINO T., OREN M., TANIGUCHI T.

Cooperation of the tumor suppressors IRF-1 and p53 in response to DNA damage.

Nature 1996b; 382: 816-818.

TANAKA N., TANIGUCHI T.

The interferon regulatory factors and oncogenesis.

Semin Cancer Biol 2000; 10: 73-81.

TELGEMANN R., BATHGATE RA., JAEGER S., TILLMANN G., IVELL R.

Transcriptional regulation of the bovine oxytocin receptor gene.

Biol Reprod 2003; 68: 1015-1026.

THOMAS ED, STORB R.

Technique for human marrow grafting.

Blood 1970; 36: 507-515.

THOMAS ED.

Does bone marrow transplantation confer a normal life span?

N Engl J Med 1999; 341: 50-51.

TILL J.

A stochastic model of stem cell proliferation, based on the growth of spleen colony-forming cells.

PNAS 1963; 51: 29-36.

TUCKER PC., GRFFIN D.E., CHOI S., BUI N., WESSELINGH S.,

Inhibition of nitric oxide synthesis increases mortality in Sindbis virus encephalitis.

## LITERATURVERZEICHNIS

---

J Virol 1996; 70: 3972-3977.

VAN KAER L., ASHTON-RICKARDT PG., PLOEGH HL., TONEGAWA S.  
TAP1 mutant mice are deficient in antigen presentation, surface class I molecules, and CD4<sup>+</sup> T cells.  
Cell 1992; 71: 1205-1214.

VAUGHAN P.S., VAN WINJEN A.J., STEIN J.L., STEIN G.S.  
Interferon regulatory factors: growth control and histone gene regulation - it is not just interferon anymore  
J Mol Med 1997; 75: 348-359.

WAAGSTEIN F., BRISTOW MR., SWEDBERG K., CAMERINI F., FOWLER MB., SILVER MA., GILBERT EM., JOHNSON MR., GOSS FG., HJALMARSON A.  
Beneficial effects of metoprolol in idiopathic dilated cardiomyopathy. Metoprolol in dilated cardiomyopathy.  
Lancet 1993; 342: 1441-1446.

WESSELY R., KLINGEL K., SANTANA LF., DAÖTON N., MINORU H., LEDERER WJ., KNOWLTON KU.,  
Transgenic expression of replication-restricted enteroviral genomes in heart muscle induces defective excitation-contraction coupling and dilated cardiomyopathy.  
J Clin Invest 1998; 102: 1444-1453.

WESSELY R., KLINGEL K., KNOWLTON K., KANDOLF R.  
Cardioselective Infection with Coxsackievirus B3 requires intact type I interferon signaling.  
Circulation 2001; 103: 756-761.

WESSELY R., HENGST L., JASCHKE B., WEGENER F., RICHTER T., LUPETTI R., PASCHALIDIS M., SCHÖMIG A., BRANDL R., NEUMANN FJ.  
A central role of interferon regulatory factor-1 for the limitation of neointimal hyperplasia.  
Human Mol Genetics 2003; 12: 177-187.

WHITE LC., WRIGHT KL., FELIX NJ., RUFFNER H., REIS LF., PINE R., TING P-Y.  
Regulation of LMP2 and TAP1 genes by IRF-1 explains the paucity of CD8<sup>+</sup> T cells in IRF-1<sup>-/-</sup> mice.  
Immunity 1996; 6: 1-20.

WHY H.J., MEANY B.T., RICHARDSON PJ.  
Clinical and prognostic significance of detection of enteroviral RNA in the myocardium of patients with myocarditis or dilated cardiomyopathy.  
Circulation 1994; 89: 2582-2589.

WILLIAMS RV., LORENZ JN., WITT SA., HELLARD DT., KHOURY PR., KIMBALL TR.  
End-systolic stress-velocity and pressure-dimension relationships by transthoracic echocardiography in mice.  
Am J Physiol Heart Circ Physiol 1998; 274: H1828-H1835.

WOODRUFF JF.  
Viral myocarditis: a review.

## LITERATURVERZEICHNIS

---

Am J Pathol 1980; 101: 427-79.

WU L.

CD4 expressed on earliest T-lineage precursor cells in the adult murine thymus.  
Nature, 1991; 349: 71-74

YAMADA G., MINETARO O., AKAGI K., MIYAOTO H., NAKANO N., ITOH S.,  
MIYAZAKI J.-I., NISHIKAWA S.-I., YAMAMURA K.-I., TANIGUCHI T.  
Specific depletion of the B-cell population induced by aberrant expression of human  
interferon regulatory factor I gene transgenic mice.  
Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88: 532-536.

ZARAGOZA C., OCAMPO C., SAURA M., LEPPA M., WEI X.-Q., QUICK R.,  
MONCADA S., LIEW F.Y., LOWENSTEIN C.  
The role of inducible Stickstoff Monoxide synthase in the host response to Cocksackievirus  
myocarditis.  
Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95: 2469-2474.

ZARAGOZA C., OCAMPO M., SAURA M.,  
Inducible nitric oxide synthase protection against coxsackievirus pancreatitis.  
J Immunol 1999; 163: 5497-5504.

**8 TABELLENVERZEICHNIS**

<b>Tabelle 1: Darstellung des experimentellen Ablaufs der Untersuchungen. ....</b>	<b>21</b>
<b>Tabelle 2: Einteilung der Versuchsgruppe EXPERIMENT 1 (n=22) .....</b>	<b>25</b>
<b>Tabelle 3: Einteilung der Versuchsgruppen von EXPERIMENT 2 (n=26) .....</b>	<b>27</b>
<b>Tabelle 4 : Ermittelte Daten der PFA-Analyse bei WT und IRF-1/- am dritten Tag nach der Infektion in den Organen Herz, Lunge, Leber, Milz und Niere. ....</b>	<b>44</b>
<b>Tabelle 5 : Ermittelte Daten der PFA-Analyse bei WT-Tieren am dritten und siebten Tag nach der Infektion in den Organen Herz, Lunge, Leber, Milz und Niere. ....</b>	<b>45</b>
<b>Tabelle 6 : Ermittelte Daten der PFA Analyse an den transplantierten Gruppen in den Organen Herz, Lunge, Leber, Milz und Niere am dritten Tag nach der Infektion.....</b>	<b>46</b>
<b>Tabelle 7 : Ermittelte Daten der PFA Analyse in der transplantierten Gruppe IRF<sup>WT</sup> in den Organen Herz, Lunge, Leber, Milz und Niere am dritten und siebten Tag nach der Infektion.....</b>	<b>47</b>
<b>Tabelle 8 : Ermittelte Daten der PFA Analyse in der transplantierten Gruppe WT<sup>IRF</sup> in den Organen Herz, Lunge, Leber, Milz und Niere am dritten und siebten Tag nach der Infektion.....</b>	<b>48</b>
<b>Tabelle 9 : Vergleich der transplantierten Gruppen IRF<sup>WT</sup> und WT<sup>IRF</sup> in den Organen Herz, Lunge, Leber, Milz und Niere am siebten Tag nach der Infektion. ....</b>	<b>49</b>
<b>Tabelle 10 : Ermittelte Daten der ISH an den Testgruppen IRF-1/- und WT am Tag 3 an den Organen Herz, Lunge, Leber, Milz, Pankreas und Niere. ....</b>	<b>50</b>
<b>Tabelle 11 : Ermittelte Daten der ISH an den Testgruppen WT am Tag 3 und WT am Tag 7 an den Organen Herz, Lunge, Leber, Milz, Pankreas und Niere. ....</b>	<b>51</b>
<b>Tabelle 12 : Ermittelte Daten der ISH an den transplantierten Testgruppen IRF<sup>WT</sup> und WT<sup>IRF</sup> am Tag 3 in den Organen Herz, Lunge, Leber, Milz, Pankreas und Niere. ....</b>	<b>52</b>
<b>Tabelle 13 : Vergleich der ISH-Daten der Testgruppe WT<sup>IRF</sup> am Tag 3 und Tag 7 in den Organen Herz, Lunge, Leber, Milz, Pankreas und Niere.....</b>	<b>53</b>
<b>Tabelle 14 : Vergleich der ISH-Daten der Testgruppe IRF<sup>WT</sup> am Tag 3 und Tag 7 in den Organen Herz, Lunge, Leber, Milz, Pankreas und Niere.....</b>	<b>54</b>
<b>Tabelle 15 : Ermittelte Daten der ISH an den transplantierten Testgruppen am Tag 7 in den Organen Herz, Lunge, Leber, Milz, Pankreas und Niere. ....</b>	<b>55</b>
<b>Tabelle 16 : Ermittelte Daten der FACS-Parameter an den Testgruppen IRF-1/- und WT ohne Infektion. ....</b>	<b>57</b>
<b>Tabelle 17 : Ermittelte Daten der FACS-Parameter an den Testgruppen WT und IRF-1/- am dritten Tag nach der Infektion.....</b>	<b>58</b>
<b>Tabelle 18 : Ermittelte Daten der FACS-Parameter an den Testgruppen WT am Tag 3 und WT am Tag 7 nach der Infektion.....</b>	<b>59</b>
<b>Tabelle 19 : Ermittelte Daten der FACS-Parameter an den transplantierten Testgruppen IRF<sup>WT</sup> und WT<sup>IRF</sup> am Tag 3 nach der Infektion.....</b>	<b>60</b>
<b>Tabelle 20 : Ermittelte Daten der FACS-Parameter an der transplantierten Testgruppe IRF<sup>WT</sup> am Tag 3 und Tag 7 nach der Infektion. ....</b>	<b>61</b>
<b>Tabelle 21 : Ermittelte Daten der FACS-Parameter an der transplantierten Testgruppe WT<sup>IRF</sup> am Tag 3 und Tag 7 nach der Infektion. ....</b>	<b>62</b>
<b>Tabelle 22 : Vergleich der FACS-Parameter an den transplantierten Testgruppen IRF<sup>WT</sup> und WT<sup>IRF</sup> am Tag 7 nach der Infektion. ....</b>	<b>63</b>

**9                    ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

**Abbildung 1: Ursachen des plötzlichen Herztodes bei 123 Patienten ≤40 Jahre mit plötzlichem Herztod nach DRORY et al. 1991. .... 8**

**Abbildung 2: Intraperitoneale Injektion an einer Wildtyp-Maus. .... 28**

**Abbildung 3: Blutentnahme aus dem Herzen einer Wildtyp-Maus. .... 29**

**Abbildung 4: Punktwolkendarstellung durch das FACS Gerät der Firma Beckman Coulter eines Wildtyp Tieres am dritten Tag nach der Infektion. .... 32**

**Abbildung 5: Merkmale des FSC und SSC nach der FACS Academy aus dem Becton Dickinson Trainings-Handbuch. .... 33**

**Abbildung 6: Durchführung der Knochenmarktransplantation, das Tier befindet sich im Mouse Restrainer und wird mit einer Wärmelampe bestrahlt. .... 35**

**Abbildung 7: Plaque-forming-Assay eines WT Tieres am dritten Tag nach Infektion in der Leber und Milz in den Verdünnungsstufen 10E-3 bis 10E-7 und Kontrollen (K). .... 38**

**Abbildung 8: Ansicht auf die Apparatur zur echokardiographischen Untersuchung: Die Maus liegt auf der Vorlaufstrecke; von unten wird der Schallkopf durch die Öffnung in der Plexiglassapparatur (1) hindurch parasternal an die Maus gehalten. .... 41**

**Abbildung 9: Überlebenskurve der transplantierten und nicht transplantierten Gruppen aus Experiment 1 und 2 nach der Infektion mit CVB3. .... 43**

**Abbildung 10 : Histologischer Schnitt vom Herz eines WT<sup>IRF</sup> Tieres am dritten Tag nach der Infektion mit CVB3. .... 56**

**Abbildung 11 : Das Pankreas eines WT<sup>IRF</sup> Tieres am dritten Tag nach der Infektion mit CVB3. .... 56**

**Abbildung 12 : Ermittelte Daten der Serum-GPT-Aktivität an den nicht transplantierten und transplantierten Testgruppen am Tag 0/3/7. .... 64**

**Abbildung 13 : Ermittelte Daten der Serum-Lipase-Aktivität an den nicht transplantierten und transplantierten Testgruppen am Tag 0/3/7. .... 65**

**Abbildung 14 : Messung der linksventrikulären Kontraktilität (FS) an den transplantierten Gruppen am Tag 0/3/7 nach der Infektion. .... 66**

**Abbildung 15 : Messung der Kontraktilität des linken Ventrikels. .... 67**

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

### 10 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

%	Prozent
°C	Grad Celcius
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
B220	Marker für B-Zellen
ca.	circa
CD 11b	Marker für myeloide Zellen: Monozyten, Makrophagen und Natürliche Killer Zellen
CD 4	Marker für T-Helfer-Zellen
CD 8	Marker für cytotoxische T-Zellen
CK	Creatinkinase
CVB3	Coxsackievirus der Gruppe B3
d	Tag
d.h.	das heißt
d0	spontan
d3	Tag 3 post infectionem
d7	Tag 7 post infectionem
DNA	Desoxyribonukleinsäure
et al	et altera
evtl.	eventuell
FACS	Fluorescence activated cell sorter
FS	Fractional Shortening = Maß für die Kontraktilität des linken Ventrikel
g	Gramm
GPT	Alaninaminotransferase
h	Stunden
HeLa	Human adenocarcinoma cervix cells
i.d.R.	in der Regel
i.p.	intra peritoneal
i.v.	intra venös

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

IFN	Interferon
IL	Interleukin
IRF	Interferon Regulator Faktor
IRF-1-/-	Interferon-Regulator-Faktor-1 knockout
ISH	In-situ-Hybridisierung
KG	Körpergewicht
KM	Knochenmark
KMT	Knochenmarktransplantation
KMZ	Knochenmarkzellen
Lip	Lipase
m	männlich
mg	Milligramm
MHC	Major histocompatibility complex
ml	Milliliter
MW	Mittelwert
n	Anzahl
n.inf.	nicht infiziert
n.s.	nicht signifikant
NO	Stickstoffmonoxid
NOS1	neuronale Stickstoff Monoxid Synthase
NOS2, iNOS	induzierbare NO-Synthase
NOS3	endotheliale Stickstoff Monoxid Synthase
o.g.	oben genannt
p.m.	post mortem
PE	Fluorochrom Phycoerythrin
PFA	Plaque-forming-Assay
pfu	Plaque-forming-units
post inf.	post infectionem
RNA	Ribonukleinsäure
s.	signifikant
SCID	severe combined immunodeficiency
STABW	Standardabweichung
TAP 1	Transporter für das Antigen Processing

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

Thy 1.2	Pan T-Zellmarker
u.a.	unter anderem
U/l	Units per liter
w	weiblich
WT	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nerven System

### 11 DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. med. vet. J. Hirschberger danke ich für die Übernahme der Arbeit und deren Einreichung an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität, München.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. R. Wessely für die interessante Themenstellung und die hervorragende Projektbetreuung.

Herrn Prof. Dr. med. vet. Dr. med. habil. W. Erhardt danke ich für die jederzeit gewährte Unterstützung bei der Durchführung des Projektes und die sorgfältige Durchsicht des Manuskriptes.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Deyster und Herrn Dr. med. C. Miething für die angenehme Zusammenarbeit.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. W. Theiss und Herrn Dr. med. M. Paschalidis für die stets freundliche und zuverlässige Kooperation.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. med. vet. F. Wegener für die fachliche Einarbeitung und freundschaftliche Betreuung.

Genauso bedanke ich mich bei Frau Dipl.-Biol. Birgit Jaschke und Herrn Christian Bradaric für die präzise Einarbeitung und die tatkräftige Unterstützung.

Ein herzliches Dankeschön an meine geschätzte Kollegin und Freundin Frau Dr. med. vet. U. Deuse für die psychologische Betreuung dieses Projektes.

Mein innigster Dank gilt meinen Eltern und vor allem meinem Bruder Herrn Dr. (Ph.D. in Environmental Engineering) B. Michaelis, der mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat.

## **DANKSAGUNG**

---

Außerdem gilt mein Dank den Tierpflegerinnen und Tierpflegern des Instituts für die verantwortungsvolle Betreuung der Tiere.

## LEBENS LAUF

---

### 12 LEBENS LAUF

- 03.01.1976 geboren in Stuttgart-Bad Cannstatt als drittes Kind von  
Herrn Dr. med. Arnold Michaelis und Frau Ines Michaelis, geb.  
Lindemann
- 1983 bis 1987 Besuch der Atrium-Grundschule in Urbach
- 1987 bis 1995 Besuch des Max-Planck-Gymnasium in Schorndorf
- 1995 Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife
- Sept. 1995 Studium der Veterinärmedizin an der Veterinärmedizinischen Fakultät  
der Universität Leipzig
- Dez. 2000 Approbation als Tierärztin
- 01.01.2001 Tierärztin in der Pferdepraxis Gesa Maier in Göppingen
- 30.06.2002 Kündigung o.g. Stellung
- 01.07.2002 Promotion am Institut für Experimentelle Onkologie und  
Therapieforschung der Technischen Universität München
- 15.04.2003 Wissenschaftliche Angestellte der I. Medizinischen Klinik der  
Technischen Universität München