

Aus dem Department für Diagnostische Labormedizin der  
Universität Tübingen  
Institut für Pathologie und Neuroanatomie  
Abteilung Allgemeine und Molekulare Pathologie und  
Pathologische Anatomie

**Vergleich virologischer, molekularbiologischer und  
immunhistologischer Verfahren zum Nachweis der murinen  
akuten und chronischen Coxsackievirus B3 (CVB3) Infektion**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von  
Barthen, Julian Dominik

2021

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. K. Klingel

2. Berichterstatter: Professor Dr. B. Hirt

Tag der Disputation: 07.06.2021



## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen.....	5
1. Einleitung .....	7
1.1 Coxsackieviren .....	7
1.1.1 Taxonomische Einordnung.....	9
1.1.2 Struktur der Coxsackieviren .....	10
1.1.3 Replikationsmechanismus des Coxsackievirus B3 (CVB3) .....	12
1.1.4 Virusreplikation in der akuten und chronischen Phase der Infektion .....	15
1.2 Natürlicher Verlauf einer CVB Infektion im Tierversuch.....	15
1.2.1 Mausmodell der CVB3 Infektion .....	16
1.2.2 Zell- und Organtropismus im Mausmodell der CVB3 Infektion .....	18
1.2.3 Humanpathogene Relevanz des Mausmodells der CVB3 Infektion .....	20
1.2.4 Diagnose der viralen Myokarditis.....	20
1.3 Zielsetzung und Fragestellungen.....	23
2. Material und Methoden.....	24
2.1 Material.....	24
2.1.1 Chemikalien und Lösungen .....	24
2.1.2 Antikörper .....	27
2.1.3 Primer.....	27
2.1.4 Viren, Versuchstiere und Zellreihen.....	27
2.1.5 Verbrauchsmaterialien, Geräte und Software.....	27
2.2 Methoden.....	29
2.2.1 Herstellung eines Virusstocks .....	29
2.2.2 Haltung der Versuchstiere und Entnahme von Organproben .....	29
2.2.2.1 Allgemeines zum Tierversuch .....	29
2.2.2.2 Haltung der Versuchstiere.....	29
2.2.2.3 Infektion der Versuchstiere.....	30

2.2.2.4 Entnahme der Organe und Herstellung der Proben .....	30
2.2.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung .....	30
2.2.3.1 Färbeprotokoll .....	30
2.2.3.2 Auswertung .....	31
2.2.3.3 Immunhistochemischer Nachweis von CD3 <sup>+</sup> T-Lymphozyten und Mac3 <sup>+</sup> Makrophagen .....	31
2.2.4 Plaquetests zum Nachweis infektiöser Viren .....	31
2.2.4.1 Allgemeines zum Plaquetest .....	31
2.2.4.2 Zellkultur .....	32
2.2.4.3 Kultivierung von Verozellen in Mikrotiterplatten .....	32
2.2.4.4 Infektion mit CVB3 .....	32
2.2.4.5 Auswertung der Plaquetests .....	33
2.2.5 Quantitative RT-PCR .....	34
2.2.5.1 Isolierung der RNA aus Organproben .....	34
2.2.5.2 Reverse Transkription und real-time Polymerasekettenreaktion .....	34
2.2.6 Nachweis von CVB3 RNA durch <i>in situ</i> Hybridisierung .....	37
2.2.6.1 Allgemeines zur <i>in situ</i> Hybridisierung .....	37
2.2.6.2 Herstellung der Hybridisierungssonden .....	37
2.2.6.3 Sephadex ® G50 basierte Säulenzentrifugation .....	38
2.2.6.4 Alkalische Hydrolyse der RNA Sonden .....	38
2.2.6.5 Hybridisierung I .....	39
2.2.6.6 Permeabilisierung des Gewebes .....	39
2.2.6.7 Hybridisierung II .....	40
2.2.6.8 Posthybridisierung .....	41
2.2.6.9 Autoradiographie .....	41
2.2.6.10 Entwicklung der Autoradiographien .....	41
2.2.6.11 Hämatoxylin-Eosin Färbung .....	42

2.2.7 Western Blots .....	42
2.2.7.1 Allgemeines zum Western Blot .....	42
2.2.7.2 Gewinnung von Proteinextrakten aus den Gewebeproben .....	42
2.2.7.3 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford .....	43
2.2.7.4 Gelelektrophoretische Auftrennung des Proteingemisches .....	43
2.2.7.5 Übertragung der Proteine auf die PVDF-Membran .....	44
2.2.7.6 Nachweis von CVB3 VP1 mittels des Antikörpers Cox mAB 31A2 ..	45
2.2.7.7 Entwicklung und Auswertung der Western Blots .....	45
2.2.7.8 Antikörperinkubation mit anti- $\alpha$ -Aktin-Antikörper .....	46
2.2.8 Immunfluoreszenz .....	47
2.2.8.1 Allgemeines zur Immunfluoreszenz .....	47
2.2.8.2 Puffer und Lösungen zur Immunfluoreszenz .....	47
2.2.8.3 Immunfluoreszenzfärbung zum Nachweis von CVB3 VP1 .....	47
2.2.8.4 DAPI-Färbung .....	48
2.2.8.5 Auswertung der Immunfluoreszenzfärbung .....	48
2.2.9 Immunhistochemischer Nachweis von CD3 <sup>+</sup> T-Lymphozyten, Mac3 <sup>+</sup> Makrophagen und CVB3 VP1 .....	49
3. Ergebnisteil .....	50
3.1 Histologische und immunhistologische Untersuchungen der Herzen im Verlauf der CVB3 Infektion .....	50
3.2 Histologische Untersuchungen muriner Milzen und Pankreata im Verlauf der CVB3 Infektion .....	56
3.3 Nachweis von Nachkommenviren durch Plaquetests .....	59
3.4 Nachweis viraler RNA .....	61
3.4.1 Quantitative RT-PCR .....	61
3.4.2 RNA/RNA <i>in situ</i> Hybridisierung (ISH) .....	63
3.5 Nachweis von viralem Kapsidprotein CVB3 VP1 .....	68
3.5.1 Western Blot Hybridisierung .....	68

3.5.2 Immunfluoreszenzfärbung .....	70
3.5.3 Immunhistologie .....	75
4. Diskussion .....	78
Zusammenfassung.....	89
Literaturverzeichnis .....	90
Erklärung zum Eigenanteil .....	98
Danksagung .....	99
Lebenslauf.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>

## Abkürzungen

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µM	Mikromol
ATP	Adenosintriphosphat
CAR	Coxsackie- und Adenovirus-Rezeptor
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	Copy DNA
CTP	Cytosintriphosphat
CVA	Coxsackieviren der Gruppe A
CVB	Coxsackieviren der Gruppe B
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
ddH <sub>2</sub> O	Bidestilliertes Wasser
DEPC	Diethyldicarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Deoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
FAM	6-Carboxyfluoreszein
FCS	Fetales Kälberserum
g	Gramm
GTP	Guanintriphosphat
h	Stunden
H.E.	Hämatoxylin-Eosin
HRP	Meerrettichperoxidase
ISH	<i>in situ</i> Hybridisierung
M	Mol
mg	Milligramm
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimol



mRNA	Messenger RNA
NK	Natürliche Killerzelle
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PBS-T	Phosphatgepufferte Salzlösung mit Tween (Polysorbatemulgator)
PCR	Polymerasekettenreaktion
PenStrep	Penicillin-Streptomycin
PFU	Plaque-forming unit
pi	post inoculationem
PVDF	Polyvinylidene Fluorid
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Rotationen pro Minute
SDS	Natriumdilaurylsulfat
sec	Sekunden
T	Tage
TAMRA	Tetramethyl-6-Carboxyrhodamin
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor Alpha
UTP	Uridintriphosphat
VP	Virusprotein
VPg	gengekoppeltes Virusprotein
ZNS	Zentrales Nervensystem

## **1. Einleitung**

### **1.1 Coxsackieviren**

Coxsackieviren sind kleine Viren mit einem Plusstrang-RNA Genom aus der Familie der Picornaviridae, welche als humanpathogene Erreger für verschiedene Erkrankungen ursächlich sind. Als Mitglied der Gattung der Enteroviren stellen sie den häufigsten Erreger der viralen Myokarditis (Herzmuskelentzündung) dar und sind daher Gegenstand vieler aktueller Forschungsprojekte, die sich mit den pathogenetisch relevanten Zusammenhängen dieser Erkrankung beschäftigen.

Coxsackieviren wurden erstmalig im Jahre 1948 von Dalldorf (Dalldorf et al., 1949) aus den Stuhlproben von zwei Kindern der Stadt Coxsackie im US-Bundesstaat New York isoliert. Sie werden allgemein in zwei verschiedene Gruppen eingeteilt, basierend auf den historischen Beobachtungen der verursachten Paralysen an Versuchsmäusen. Jene Viren, die zu einer schlaffen Lähmung führen, zählen zur Gruppe A (CVA), diejenigen, die eine spastische Paralyse verursachen, zählen zur Gruppe B (CVB) (Acheson, 2011; Dalldorf, 1950).

Coxsackieviren der Gruppe A wurden mittlerweile mit verschiedenen Erkrankungen assoziiert. Dazu zählt mitunter die Hand-Fuß-Mund-Krankheit, ein überwiegend pädiatrisches Krankheitsbild, das sich durch einen fieberhaften Verlauf mit Halsschmerzen und charakteristischer Bläschenbildung an Haut und Schleimhäuten auszeichnet (Park et al., 2012). Ferner können diese Erreger auch eine Herpangina auslösen, die ebenfalls mit Halsschmerzen und Bläschenbildung an der Mundschleimhaut einhergeht (Yamashita et al., 2005). Auch das ophthalmologische Krankheitsbild der akuten hämorrhagischen Konjunktivitis wird durch ein Mitglied der CVA, nämlich CVA24, verursacht (Tavares et al., 2006). CVB werden bei verschiedenen Krankheiten eine kausale Rolle zugeschrieben. Prominente Beispiele sind die Bornholm Krankheit (Weller et al., 1950), aber auch Herpangina (Park et al., 2012) und Hand-Fuß-Mund-Krankheit (Lindenbaum et al., 1975). Manche Stämme verursachen auch eine akute Entzündung der Bauchspeicheldrüse (Imrie et al., 1977). Ihr pathogenetischer Beitrag zur Entwicklung von Typ-1 Diabetes mellitus ist Gegenstand aktueller Forschung (Yoon, 1990).

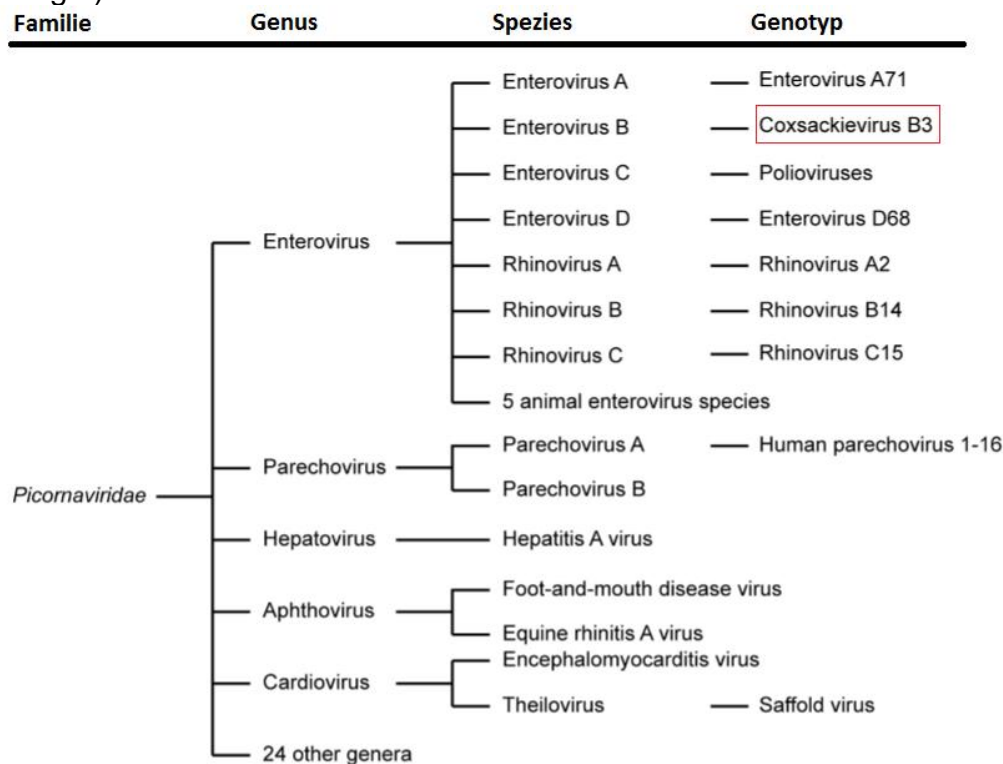
Darüber hinaus wurden sie als häufigster Erreger einer Myokarditis identifiziert (Kandolf et al., 1989). Die Auswirkungen von Coxsackieviren auf das Herz sind von höchster klinischer Relevanz, da sie in bis zu 50% aller viralen Myokarditiden (Maze et al., 1990) und 12% aller plötzlichen Herztode (Gaaloul et al., 2012) nachgewiesen werden können. Bei Säuglingen geht die Infektion mit CVB mit einer Letalität von 50% einher (Woodruff, 1980). Außerdem kann eine Coxsackievirusinfektion im chronischen Verlauf letztlich zu einer dilatativen Kardiomyopathie (DCM) führen, einem ernstzunehmenden Krankheitsbild des Herzens, häufig einhergehend mit einer Herzinsuffizienz, bei dem nach 10 Jahren nur ungefähr 10-20% aller Patienten überleben (Herold, 2011). Coxsackieviren sind weltweit verbreitet und verursachen in regelmäßigen Abständen kleinere Epidemien, so zuletzt beobachtet in Thailand in 2014 (Chansaenroj et al., 2015), China (Tan et al., 2015) und Frankreich (El Houmami et al., 2015) in 2013.

Die Klassifikation viraler Erreger basierte zunächst auf klinischen und Zellkultur-assoziierten Beobachtungen, physikalischen oder chemischen Eigenschaften (Mattern, 1962) der jeweiligen Virionen oder auf Untersuchungen der jeweiligen Immunantwort des Wirtes im Sinne einer Produktion neutralisierender Antikörper (Halonen et al., 1959). Diese Untersuchungsmethoden waren durch eine begrenzte Spezifität und unzureichende Sensitivität limitiert. Mit der Entwicklung molekularbiologischer Nachweismethoden, die spezifische Genabschnitte als Zielstrukturen ausmachten, wurde die Klassifikation und Detektion viraler Erreger grundlegend revolutioniert. So gelang es einer Arbeitsgruppe um Young 1973 erstmals, mittels RNA Hybridisierung die bestehende biologische Klassifikation von Coxsackieviren molekulargenetisch zu bestätigen (Young, 1973). Tracy entwickelte 1984 ein RNA/cDNA Hybridisierungsverfahren zum Vergleich der genetischen Homologie der jeweiligen CVB Virusstämme (Tracy, 1985). Der Arbeitsgruppe um Kandolf gelang dann bereits 1987 erstmalig die Anwendung der *in situ* Hybridisierung zum Nachweis von viraler RNA im murinen Herzen mittels einer cDNA-Sonde und etablierte somit das Mausmodell der CVB3 Infektion für viele zukünftige Studien zur viralen Herzerkrankung (Kandolf, 1987).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass molekularpathologische Detektionsmethoden zum Virusnachweis, insbesondere im Vergleich zur einer klinisch-deskriptiven Herangehensweise, mittlerweile den höchsten diagnostischen Stellenwert besitzen.

### 1.1.1 Taxonomische Einordnung

Coxsackieviren gehören zum Genus der Enteroviren aus der Familie der Picornaviridae, wobei hier insgesamt 35 Genera und 13 Enteroviruspezies beschrieben sind. Die taxonomische Einordnung der Viren und Definition einzelner Spezies erfolgt durch das *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV, 2016) unter Einbeziehung verschiedenster Eigenschaften der Erreger. Diese beinhalten unter anderem das jeweilige Wirtsspektrum, Zell- und Organtropismus, Virulenz, Vektorspezifität, Antigenität und nicht zuletzt auch den genetischen Verwandtschaftsgrad. Nach einer molekularen Klassifikation werden die humanen Enteroviren (HEV) in die Gruppen A-D eingeteilt. Coxsackie B Viren gehören zur Gruppe HEV-B, welche sich aus 6 Serotypen zusammensetzen (CVB1-6) (siehe Abbildung 1).



**Abbildung 1**– Dargestellt sind ausgewählte Mitglieder der Familie der Picornaviridae. Coxsackievirus B3 ist rot markiert. [Modifiziert und übersetzt nach van der Linden (van der Linden et al., 2015)]

Aus einer derartigen taxonomischen Einordnung lassen sich auch Rückschlüsse auf die Übertragbarkeit von Ergebnissen molekularer Nachweismethoden ableiten.

Viruspezies, die taxonomisch eng verwandt sind, weisen eine entsprechende Homologie in ihren jeweiligen Struktur- oder Funktionsbestandteilen auf. Diese Ähnlichkeit, beispielsweise bezüglich von Oberflächenproteinen, muss bei der Detektion dieser Strukturen berücksichtigt werden. Bestimmte Nachweismethoden, welche eine hochkonservierte Struktur detektieren, können daher zum Nachweis verschiedener Spezies verwendet werden.

### **1.1.2 Struktur der Coxsackieviren**

Bei Coxsackieviren handelt es sich um sehr kleine Viren ohne Lipidhülle, deren Genom aus einzelsträngiger RNA mit Plusstrang-Polarität besteht. Das Kapsid ist ikosahedrisch aufgebaut und besteht aus den Proteinen VP1, VP2, VP3 und VP4. Dabei lagern sich VP1 bis VP3 zu einem Trimer zusammen, wobei ein Kapsid wiederum aus 60 Trimeren besteht. Das Kapsidprotein VP4 bildet einen Bestandteil der inneren Oberfläche des Kapsids (Hogle et al., 1985). Um die fünffache Symmetrieachse des Kapsids findet sich eine räumliche Vertiefung, der sogenannte „Canyon“ (Muckelbauer et al., 1995).

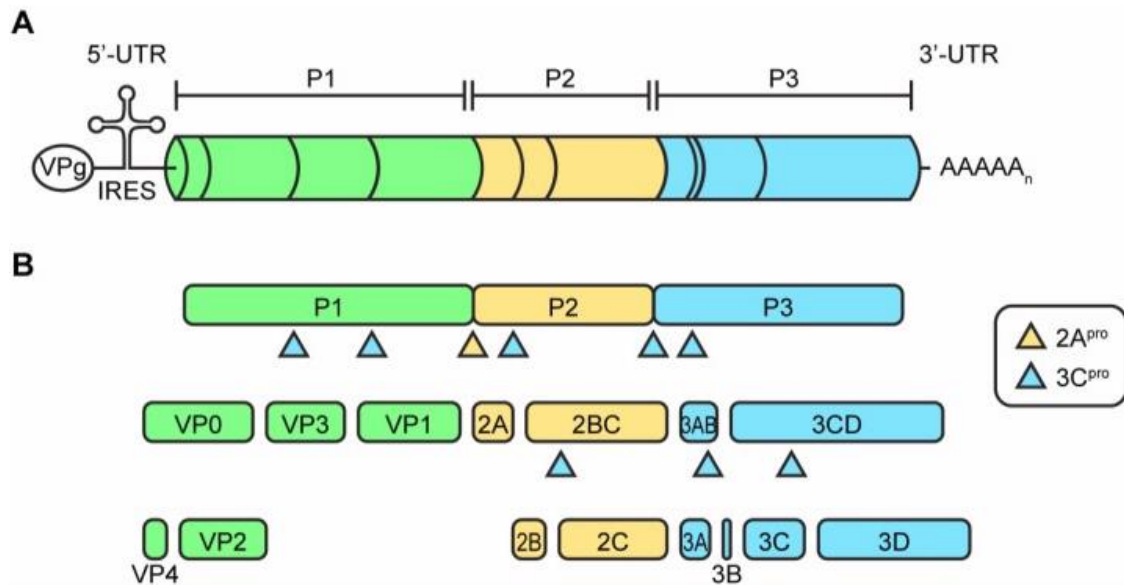
Das RNA Genom (siehe Abbildung 2) besitzt eine Größe von ca. 7400 Basenpaaren und wird bei der Proteinbiosynthese direkt abgelesen (Klump et al., 1990; Lindberg et al., 1987). Das 3'-Ende ist polyadenyliert und das 5'-Ende ist kovalent an ein weiteres virales Protein, VPg (Abkürzung aus dem Englischen für „virion protein genome linked“) gekoppelt (Chatterjee et al., 1985; Gruez et al., 2008). Das RNA Genom lässt sich in drei verschiedene Abschnitte einteilen: P1, P2 und P3. Die P1 Region kodiert für die oben genannten Kapsidproteine VP1-VP4. Die Regionen P2 und P3 hingegen kodieren für nichtstrukturelle Proteine (Rueckert et al., 1984).

Zu diesen nichtstrukturellen Proteinen gehören:

- a) Protease 2A – dieses Enzym führt zu massiven intrazellulären Veränderungen in der jeweiligen Wirtszelle. So konnte nachgewiesen werden, dass die reguläre Proteinbiosynthese des Wirtes durch die Destruktion des Transkriptionsfaktors eIF4G, aber auch durch die Störung des Translationsfaktors PABP aufgehoben wird. In diesem Zusammenhang wird auch von einem „host cell shut off“ gesprochen, also der „Ausschaltung der Wirtszellfunktionen“ (Zhao et al., 2003), (Kerekatte et al., 1999).

Ferner ist die Protease 2A auch von klinischer Relevanz, da dieses Enzym eine proteolytische Funktion gegenüber Dystrophin hat, einem wichtigen Funktionsträger der muskulären Kontraktion (Badorff et al., 1999). Aus diesen Ergebnissen lassen sich phänotypische Ähnlichkeiten zwischen einer erworbenen Enterovirus-assoziierten Kardiomyopathie und einer hereditären Kardiomyopathie (welche mit einer Dystrophinmutation einhergehen kann) erklären.

- b) Protein 2B – ein Protein, das unter anderem den intrazellulären Kalziumhaushalt beeinflusst und dadurch mit dem Transport zelleigener Proteine interferiert (de Jong et al., 2008).
- c) Protein 2C – ein hochkonserviertes funktionelles Peptid, das vermutlich auch Helikasefunktion besitzt, also zur energieabhängigen Entwindung von Nukleinsäuresträngen dient (Samuilova et al., 2006).
- d) Protein 3A – dieses Protein mindert die Expression von TNF- $\alpha$  und interferiert dadurch mit dem Immunsystem, stört darüber hinaus allerdings auch noch durch andere Mechanismen den zellulären Stoffwechsel (Doedens et al., 1997; Neznanov et al., 2001).
- e) Protease 3C – auch dieses Enzym greift in den Stoffwechsel der jeweiligen Wirtszelle ein. Durch Spaltung von DNA Reparaturenzymen induziert es eine Caspase-vermittelte Apoptose (Chau et al., 2007; Li et al., 2002).
- f) Protein 3B, auch VPg (siehe oben) – dieses Protein ist kovalent an das 5'-Ende der viralen RNA gebunden und dient als Primer zur RNA-Polymerisation.
- g) Polymerase 3D – diese RNA-abhängige RNA-Polymerase dient der Replikation des viralen Genoms unter Zuhilfenahme von VPg.



**Abbildung 2A** – Schematische Darstellung des CVB-RNA-Genoms mit VPg-Protein, IRES am 5'-Ende, Regionen P1-P3 und polyadenyliertem 3'-Ende. (van der Linden, 2015)

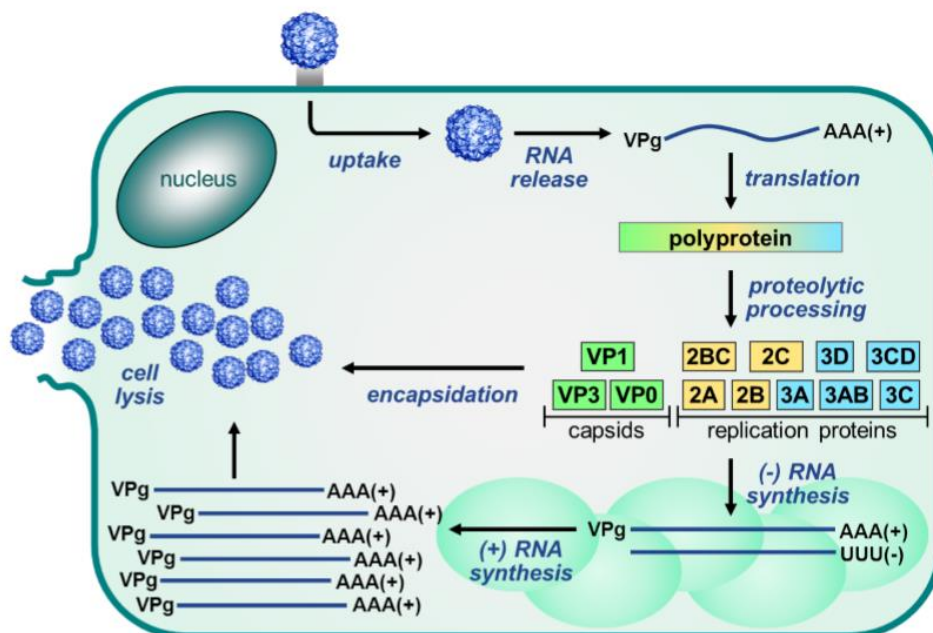
**Abbildung 2B** – Schematische Darstellung der Virusproteine (Rechtecke) und posttranslationale Proteolyse durch Proteinasen (Dreiecke). (van der Linden, 2015)

### 1.1.3 Replikationsmechanismus des Coxsackievirus B3

Coxsackievirus B3 (CVB3) kann durch rezeptorvermittelte Endozytose in die Zellen aufgenommen werden (siehe Abbildung 3) (Inal et al., 2013). Dies kann durch den Coxsackievirus- und Adenovirus-Rezeptor (CAR) erfolgen, einem Oberflächenprotein, das auf diversen menschlichen Zellen exprimiert wird (Bergelson et al., 1997). Physiologischerweise interagiert dieses Protein mit anderen Komponenten der Extrazellulärmatrix (Patzke et al., 2010). Ferner spielt auch der sogenannte Decay-accelerating factor (DAF) bei der Virusbindung eine Rolle (Chung et al., 2005). Die Bindung des Virus an die Zelloberfläche wird Absorption genannt.

Nach Andocken des Virus an den Rezeptor kommt es zu einer Clathrin-vermittelten Membraneinstülpung mit anschließender Ausbildung und Aufnahme eines Vesikels in die Zelle (Chung et al., 2005). Clathrin ist ein Polypeptid, welches eine zentrale Rolle im Rahmen der Endozytose und der weiteren Verarbeitung der Vesikel innerhalb der Zelle spielt (Ungewickell et al., 1981). Die Gesamtheit dieser Schritte wird als Penetration bezeichnet.

Das entstandene Vesikel wird als Endosom bezeichnet, wobei in der zeitlichen Abfolge zwischen frühen und späten Endosomen unterschieden wird. Während sich frühe Endosomen in Nähe zur Zellmembran befinden und einen pH-Wert von ungefähr 6,3 besitzen, werden die Vesikel in Nähe zum Golgi-Apparat als späte Endosomen bezeichnet und weisen einen deutlich saureren pH von 5,5 auf (Sieczkarski et al., 2002). Diese Abnahme des pH-Wertes führt zu einer Änderung der räumlichen Ausrichtung des Viruskapsids mit einer Freilegung der hydrophoben Anteile, was wiederum eine Schleusung der viralen RNA durch die lipidhaltige Membran des Vesikels ins Zytoplasma ermöglicht. Die Freilegung der viralen RNA wird als „Uncoating“ bezeichnet.



**Abbildung 3** – Stark vereinfachte Darstellung der enteroviralen Replikation. Der Replikationszyklus beginnt durch die Aufnahme des Virions über den CAR, hier grau dargestellt. Nach Freisetzung des viralen Genoms („RNA Release“) entsteht zunächst ein Polyprotein (siehe auch Abbildung 1.1.2.1), das wiederum durch virale Proteasen in weitere Bestandteile verarbeitet wird. Diese ermöglichen wiederum die Vervielfältigung des Virusgenoms und die Produktion von Virionen, welche im Rahmen der folgenden Zelllyse freigesetzt werden. Abbildung von van der Linden (2015).

Das Virusgenom liegt gekoppelt an das VPg-Protein im Zytoplasma der Zelle vor. CVB3 RNA mit einem intakten 5'-Ende kann alleinständig zur Infektion von Zellen führen, was belegt, dass keine der viralen Strukturproteine zur Replikation erforderlich sind (Kandolf et al., 1985). Eukaryotische mRNA wird normalerweise durch die Anlagerung verschiedener Transkriptionsfaktoren an die 5'-Cap-Struktur initiiert. Coxsackieviren besitzen allerdings keine 5'-Cap-Struktur, sondern das RNA Ende weist eine spezifische räumliche Anordnung auf, die als „Internal Ribosome Entry Site“



(IRES) bezeichnet wird. Verschiedene zelluläre Faktoren binden an diese Stelle und initiieren die Transkription (Martinez-Salas et al., 2008; Ray et al., 2002). Die Virusreplikation führt unter anderem durch eine Proteolyse des Transkriptionsfaktors eIF4G-1 dazu, dass die Biosynthese zelleigener Proteine nahezu vollständig sistiert (Kerekatte et al., 1999; Zhao et al., 2003). Die vorhandenen zellulären Ribosomen binden somit fast ausschließlich an die IRES der viralen RNA.

Die ribosomale Transkription des viralen Genoms hat die Synthese eines einzigen langen Polypeptids von ungefähr 2200 Aminosäuren zur Folge (Lindberg et al., 1987). Dieses Polypeptid wird wiederum durch virale Proteinasen, die selbst Teil der Polypeptidkette sind, zunächst in drei große Vorläuferproteine (P1-P3) gespalten, die dann selbst weiter in die einzelnen viralen Proteine gespalten werden (Chatterjee et al., 1981). Wie bereits beschrieben, bestehen Coxsackieviren aus dem Kapsid mit den Proteinen VP1-4, dessen Bestandteile aus dem Vorläuferprotein P1 produziert werden und der viralen RNA. Letztere wird ausschließlich im Zytoplasma der Wirtszelle repliziert (Bienz et al., 1972). Dazu induziert das Virus die Bildung zytoplasmatischer Vesikel, an deren Membranen die RNA Polymerisation stattfindet. Die genauen Mechanismen dieser Vesikelbildung sind noch unklar – in jüngerer Zeit wurde postuliert, dass es sich dabei um eine Modifizierung zellulärer Autophagosomen handelt (Kemball et al., 2010). Wahrscheinlich entsteht VPg aus dem viralen Vorläuferprotein 3AB (Pathak et al., 2008). Unter Vermittlung der viralen RNA-abhängigen RNA Polymerase erfolgt die Anheftung von Uridylat an VPg – das entstandene Produkt wird dann durch noch unzureichend geklärte Mechanismen ans 3'-Ende transloziert und dient dort als Primer zur Replikation (Harris et al., 1994).

Im Rahmen der Replikation wird zunächst komplementäre Negativstrang-RNA produziert, von welcher dann wieder in weiteren Replikationsschritten Positivstrang-RNA synthetisiert wird. Die genaue Synthese der Virionen ist noch nicht ausreichend geklärt. Die Virusproteine VP0, VP1 und VP3 vereinen sich und bilden sogenannte Protomere. Fünf Protomere lagern sich wiederum zu einem Pentamer zusammen. 60 Pentamere bilden dann das sogenannte Prokapsid, wobei noch unklar ist, ob die virale Plusstrang-RNA erst danach in das Prokapsid transloziert wird oder ob sie bereits im Rahmen der Konstruktion eingebaut wird (Acheson, 2011; Putnak et al., 1981). Enthält das Prokapsid die virale RNA, so wird es als Provirion bezeichnet.

In einem noch ungeklärten Schritt wird das VP0-Protein in VP2 und VP4 gespalten, wodurch das endgültige Virion entsteht, das dann im Rahmen eines in der Regel

lytischen Zellunterganges als infektiöses Partikel (Virion) freigesetzt wird (Basavappa et al., 1994).

#### **1.1.4 Virusreplikation in der akuten und chronischen Phase der Infektion**

Das Replikationsverhalten von CVB3 unterscheidet sich je nach Phase der Infektion. Bei der akuten Infektion liegt eine asymmetrische Replikation des viralen Genoms vor (Hohenadl et al., 1991). Der Begriff der asymmetrischen Replikation bezieht sich auf ein ungleiches Verhältnis von vorliegender Plusstrang-RNA und Minusstrang-RNA, wobei während der akuten Infektion deutlich höhere Mengen an viraler Plusstrang-RNA detektiert werden können. Diese werden wiederum direkt zur Biosynthese neuer viraler Proteine verwendet.

Dahingegen ist die chronische Phase der Infektion charakterisiert durch ein ausgewogenes Verhältnis an Plus- und Minusstrang-RNA, die als stabile Doppelstränge vorliegen und eine deutlich längere Halbwertszeit aufweisen (Reetoo et al., 2000; Tam et al., 1999). Ferner zeigt sich die RNA Replikation und Genexpression während der chronischen Phase der Erkrankung restringiert. Dadurch wird die Eliminierung des Virus aus dem Gewebe behindert, weshalb die Kombination dieser Mechanismen als Teil der immunoevasiven Strategie des Erregers angesehen wird (Kandolf et al., 1999). Neuere Forschungsergebnisse konnten dabei weitere Komponenten belegen, wie etwa die Herabregulation von MHC-I Molekülen (Cornell et al., 2007).

#### **1.2 Natürlicher Verlauf einer CVB Infektion im Tierversuch**

Tierversuche haben einen unerlässlichen Beitrag zum Verständnis der molekularpathologischen Prozesse im Rahmen der CVB Infektion geleistet. Bereits die ersten Einteilungen der Coxsackieviren in die Gruppen A und B erfolgten im Rahmen klinischer Beobachtungen bei infizierten Mäusen (siehe Kapitel 1.1).

Neben Mäusen kamen bislang auch andere Versuchstiere zum Einsatz, etwa Schweine und Primaten (Cammock et al., 2013; Lerner, 1969). Vorteile des Einsatzes von Mäusen als Versuchstiere, etwa im Vergleich zu Primaten, sind die breite Verfügbarkeit diverser geno- und phänotypisch unterschiedlicher Gruppen, die vergleichsweise geringen wirtschaftlichen Kosten und der geringere pflegerische Aufwand. Auch ethische Abwägungen begünstigen den Einsatz von Mäusen gegenüber Tieren mit komplexeren kortikalen Funktionen.

Anders als in der alleinigen Verwendung von Zellkulturen bietet der Einsatz von Versuchstieren die Möglichkeit, die Infektion auch unter Berücksichtigung wirtsseitiger, systemischer Reaktionen zu begutachten. Komplexere Mechanismen z.B. bezüglich der Immunantwort bei der CVB3 Infektion können beleuchtet werden und somit eine deutlich genauere Evaluation pathogenetischer Mechanismen bei der Infektion ermöglichen.

### **1.2.1 Mausmodell der CVB3 Infektion**

Ein großer Teil der bisherigen *in vivo* Studien über Erkrankungen mit Coxsackieviren stützen sich auf Mausmodelle, da die morphologischen Gewebeveränderungen und qualitativen Virusnachweise sowie die Immunantwort mit den entsprechenden Befunden am Menschen weitestgehend übereinstimmen (Fairweather et al., 2007). Das Mausmodell der CVB Infektion zeichnet sich zudem in Bereichen, die für die Replikation des Virus und für die korrespondierende Immunantwort von Bedeutung sind, durch eine hohe genetische Homologie gegenüber dem Menschen aus. So wurde beispielsweise für CAR (Coxsackie- und Adenovirus-Rezeptor) eine 83%ige Homologie in der Aminosäuresequenz zwischen Mäusen und Menschen festgestellt (Tomko et al., 1997).

Häufig werden für die Infektionsversuche Inzuchtmäuse verwendet, welche definitionsgemäß aus mindestens 20 konsekutiven Generationen einer Geschwisterpaarung generiert wurden. Diese weisen einen hohen Grad an genetischer Ähnlichkeit auf.

Mäuse vom A.BY/SnJ Stamm haben sich bereits in mehreren Studien als etablierte Versuchsobjekte für die CVB3 Infektion erwiesen (Hammer et al., 2010; Klingel et al., 1992; Nakamura et al., 1996). Dabei konnte gezeigt werden, dass die Tiere sowohl eine ausgeprägte akute als auch eine chronische Form der Myokarditis aufweisen (Wolfgram et al., 1986). Die Auswahl des jeweiligen Mausstammes des Versuchstieres orientiert sich an der jeweiligen Fragestellung der Studie. Unterschiedliche Stämme zeigen nach CVB3 Inokulation unterschiedliche Reaktionen und lassen sich einteilen in „suszeptible“ Stämme mit persistierender Virusinfektion und chronischer Myokarditis (A/J, ABY/SnJ, ASW/SnJ, ACA/SnJ, SWR/J) und „resistente“ Stämme, die nach einer akuten Krankheitsphase das Virus eliminieren und keine chronische Myokarditis bekommen (Sv/129 und C57BL/6) (Kandolf et al., 1993; Klingel et al., 1992). Auch genetisch unterschiedliche Virusstämme können den Krankheitsverlauf einer Infektion beeinflussen, da sie sich hinsichtlich ihrer Virulenz unterscheiden (Gauntt et al., 1984).

Neben diesen virus- und wirtsspezifischen Unterschieden existieren noch weitere Faktoren, welche den Verlauf einer CVB Infektion maßgeblich beeinflussen. So wurden geschlechtsspezifische Unterschiede festgestellt, wobei das weibliche Geschlecht als protektiv angesehen wird (Li et al., 2009). Ferner dürfen auch Umweltfaktoren oder auch das Ausmaß körperlicher Belastung nicht außer Acht gelassen werden. So wurde nachgewiesen, dass exzessive körperliche Betätigung der Versuchstiere zu einem deutlich schlechteren Verlauf mit teilweise tödlichem Ausgang führt (Gauntt et al., 1989). Auch das Alter des Versuchstieres bei Inokulation spielt eine wichtige Rolle – Infektionen von Tieren unter 2 Wochen gehen allgemein mit einem raschen lethalen Ausgang einher (Gauntt et al., 1989).

Die Infektion mit CVB3 erfolgt im Mausmodell in der Regel über eine intraperitoneale Injektion. Dieser Infektionsweg entspricht zwar nicht der natürlichen Transmission (fäkal-oral oder über das Respirationssystem), ermöglicht jedoch die Applikation genau definierter Erregermengen unter Umgehung der mechanisch-physiologischen Barrieren, welche wiederum interindividuell starken Unterschieden unterliegen.

### 1.2.2 Zell- und Organtropismus im Mausmodell der CVB3 Infektion

Der Zell- und damit der Organtropismus von CVB3 wird maßgeblich durch Virusdeterminanten wie der Kapsidzusammensetzung (und damit Affinität gegenüber entsprechenden zellulären Oberflächenrezeptoren), aber auch der Variante der 5'-Nichtkodierenden Region beeinflusst (Harvala et al., 2005). Auch Wirtsdeterminanten spielen eine wichtige Rolle wie bereits oben erwähnt

Bereits 1992 wurde der natürliche Verlauf der CVB3 Infektion in suszeptiblen Mäusen beschrieben. Nach intraperitonealer Inokulation des Virus kommt es innerhalb weniger Stunden zur lytischen Infektion des Pankreas. Im exokrinen Teil des Pankreas repliziert CVB3 hocheffektiv, wobei sämtliche infizierte Zellen lysiert werden. Die neu entstandenen Virionen werden über das Blut im Organismus verteilt, so dass es in der Folge zur Infektion sekundärer Organe kommt. Hierzu gehören die Milz, Lymphknoten und auch das Myokard, wo es zu einer hochtitrigen Virusreplikation kommen kann. In deutlich geringerem Maße zeigt sich im Rahmen der akuten Infektion auch eine virale Replikation in ZNS, Thymus, Lunge und Leber (Klingel et al., 1996). Zwei Wochen nach der Infektion ist in der Regel kein infektiöses Virus in den murinen Organen mehr nachweisbar. Jedoch kommt es in einigen Organen (auch dem Myokard) zu einer restringierten Virusreplikation, auf die später nochmals genauer eingegangen wird.

Hinsichtlich der Infektion des Pankreas muss ein markanter Unterschied zwischen dem Zelltropismus von CVB bei murinen und humanen Wirten erwähnt werden. So beschränkt sich die Infektion von Coxsackieviren im Mausmodell ausschließlich auf azinäre Zellen – das endokrine Pankreas, aber auch das duktales System scheint gänzlich ausgespart zu sein (Vella et al., 1992). Im Gegensatz dazu wurde beim Menschen eine präferenzielle Infektion insbesondere des endokrinen Pankreas festgestellt (Ylipaasto et al., 2004). Eine Virusreplikation im peripheren Blut ist prinzipiell zwar möglich (d.h. in zirkulierenden B- oder T-Lymphozyten), lässt sich aber nur schwer nachweisen. Zudem ist es unklar, welcher Anteil der im peripheren Blut detektierten viralen RNA Genome auf die Replikation in sekundär lymphatischen Organen zurückgeht (Vuorinen et al., 1994). Allgemein ist die Phase der Virämie im Rahmen einer murinen CVB Infektion sehr kurz. Die Virusreplikation in der Milz und in den Lymphknoten erfolgt überwiegend in jenen Lymphozyten, die sich an der Peripherie von Lymphfollikeln befinden. Hier wurden prä-B- und B-Lymphozyten als Zielzellen identifiziert und in geringerem Maße auch CD4-positive T-Lymphozyten, Makrophagen und follikuläre dendritische Zellen (Anderson et al., 1996; Klingel et al.,

1996). CD8-positive T-Lymphozyten hingegen scheinen explizit nicht durch CVB3 infiziert zu werden (Klingel et al., 1996). Im zentralen Nervensystem gilt der Bulbus olfactorius als Prädilektionsstelle der Infektion (Klingel et al., 1996). Während im Thymus, in der Lunge, in der Leber und im zentralen Nervensystem das Virus auch bei suszeptiblen Stämmen weitestgehend rasch eliminiert wird, ist eine persistierende Infektion im Myokard und Lymphgewebe (inklusive weißer Pulpa der Milz) bekannt (Klingel et al., 1995).

Bezüglich der CVB3 Infektion im Myokard lassen sich bei suszeptiblen Versuchstieren, welche eine chronische Myokarditis entwickeln, drei unterschiedliche Phasen der Erkrankung differenzieren: Im Rahmen der frühen Phase (Tag 1 pi bis 4 pi) kommt es zunächst durch hämatogene Aussaat der Erreger zu einer Infektion der Myozyten, welche mit einer virusinduzierten Zytolyse einhergeht: Ab Tag 4 pi finden sich kleine Herde mit infizierten Myozyten und einzelnen Entzündungszellen. Während der akuten Phase der Myokarditis (5 bis 12 Tage pi) ist die myokardiale Infektion hauptsächlich auf eine direkte Zell-zu-Zell Ausbreitung zurückzuführen. Es finden sich viele Herde infizierter Myozyten, welche lokal mit einer zunehmenden Infiltration des Myokards durch Immunzellen assoziiert sind. Diese besteht vorwiegend aus NK-Zellen und Makrophagen und in geringerem Maße auch aus CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten sowie einigen wenigen B-Zellen. Im Myokard wird das Maximum der inflammatorischen Infiltration ungefähr zwei Wochen nach Infektion erreicht. Resistente Mausstämme eliminieren innerhalb dieses Zeitraums das Virus aus dem Myokard, so dass danach auch keine Inflammation mehr nachweisbar ist (Klingel et al., 1992). Unter der chronischen Myokarditis (ab 12 Tagen pi) versteht man die Persistenz viraler RNA im Myokard, die mit einer chronischen Entzündungsreaktion einhergeht. Wie bereits in Kapitel 1.1.4 beschrieben, kommt es zu Veränderungen des viralen Replikationszyklus und damit zu einer entsprechenden Immunevasion. Als Folge der persistierenden Virusinfektion und chronischen Myokarditis sind ausgeprägte Umbauvorgänge im Parenchym des Herzens möglich. Dies geht morphologisch mit einer Fibrosierung des Myokards einher und ist funktionell mit einer Einschränkung der Kontraktilität der Ventrikel gekennzeichnet, die zur dilatativen Kardiomyopathie (DCM) führen kann (Lang et al., 2008).

### **1.2.3 Humanpathogene Relevanz des Mausmodells der CVB3 Infektion**

Eine Infektion mit Coxsackieviren verläuft beim Menschen in mehr als 90% aller Fälle als subklinische, unspezifische febrile Erkrankung oder vollkommen asymptomatisch (Spigland et al., 1966). Allerdings kommen Enteroviren weltweit vor und können durchaus zu chronischen Erkrankungen oder gar letalen Verläufen führen (siehe Kapitel 1.1) (Sawyer, 2002).

Eine wirtschaftliche Studie, welche die direkten und indirekten Kosten einer enteroviralen (non-Polio) Infektion zusammenfasst, deutete bei einer Studienpopulation von 372 pädiatrischen Patienten auf durchschnittliche Kosten von ungefähr 250\$ pro Patient (Pichichero et al., 1998). Dies berücksichtigt noch nicht den weitaus größeren Teil an subklinischen Verläufen, die allerdings dennoch mit Arbeitsausfall und damit indirekten volkswirtschaftlichen Kosten einhergehen. Außerdem werden auch die Kosten von etwaigen Folgeerkrankungen (insulinabhängiger Diabetes mellitus, dilatative Kardiomyopathie) nicht erfasst, welche eine signifikante finanzielle Belastung mit sich bringen. In diesem Zusammenhang ist es wichtig zu erwähnen, dass kardiovaskuläre Erkrankungen in Deutschland seit Jahrzehnten die Haupttodesursache darstellen.

Tierexperimentelle Studien liefern wichtige Beiträge zum Verständnis der enteroviralen Infektion. Eine systemische Infektion lässt sich nur durch Untersuchung des Wechselspiels zwischen Immunsystem des Wirtes und den Virulenzfaktoren des jeweiligen Erregers in ihrer Gesamtheit beschreiben. Zellkulturen oder andere vergleichbare Versuchsreihen können die Komplexität des Wirtsorganismus nicht simulieren und eignen sich daher nicht dafür, die verschiedenen Pathogenesemechanismen in einer angemessenen Art und Weise darzustellen.

Zusammenfassend sind enterovirale Infektionen, insbesondere durch Coxsackieviren, sowohl klinisch als auch volkswirtschaftlich von hoher Relevanz. Die Entwicklung geeigneter Diagnoseverfahren sowie Therapie- und Präventionsstrategien kann nur durch intensive Forschung, unter anderem am Mausmodell der CVB3 Myokarditis, erreicht werden.

### **1.2.4 Diagnose der viralen Myokarditis**

Der histopathologische Nachweis einer viralen (Peri-) Myokarditis basiert seit 1968 auf den sogenannten „Dallas Kriterien“ an primär H.E.-gefärbten Schnitten. Dabei wird für

die Diagnose das Vorhandensein eines entzündlichen zellulären Infiltrates bei gleichzeitigem Vorhandensein von Nekrosearealen (oder anderen nicht-ischämietypischen myokardialen Schäden) vorausgesetzt. Als sogenannte „borderline myocarditis“ bezeichneten die Autoren jene morphologischen Befunde, die sich durch ein geringer ausgeprägtes Infiltrat bei fehlenden Nekrosen auszeichnen (Aretz et al., 1987). Die Sensitivität der ausschließlichen Anwendung der Dallas Kriterien für die Myokarditisdiagnostik ist nicht zuletzt durch Stichprobenfehler im Rahmen der Probengewinnung eingeschränkt. So konnte gezeigt werden, dass bei einzelner Probenentnahme nur 25% aller Fälle als Myokarditis diagnostiziert werden konnten. Selbst bei Entnahme von 8 unterschiedlichen Biopsaten wurde die (Peri)Myokarditis nur in ungefähr 65% der Fälle identifiziert (Chow et al., 1989). Abgesehen von Stichprobenfehlern ist die alleinige Anwendung der Dallas Kriterien in ihrer Aussagekraft bei der Myokarditisdiagnostik limitiert. Studien belegen eine geringe Objektivität, d.h. dass die Interpretation der histologischen Befunde starken interindividuellen Schwankungen zwischen den jeweiligen Untersuchern unterliegt (Shanes et al., 1987). Bestrebungen, die Dallas Kriterien durch engmaschigere Definitionen weiter zu objektivieren, führten 1997 zur Veröffentlichung der sogenannten „Marburg Kriterien“, welche die immunhistochemische Identifizierung und Quantifizierung des entzündlichen Infiltrates für die genauere histopathologische Diagnostik voraussetzen und somit neueren Entwicklungen in der Entwicklung molekularpathologischer Nachweismethoden nachkamen (Klingel et al., 2017; Maron et al., 2006).

Ergänzt wird diese Diagnostik durch molekularpathologische Untersuchungsverfahren zum Nachweis bzw. Ausschluss infektiöser kardiotoxischer Erreger. Unter molekularpathologischen Nachweismethoden versteht man hierbei Untersuchungen, die spezifische Genabschnitte kardiotoxischer Erreger auf molekularer Ebene detektieren. Die Myokarditisdiagnostik umfasst den Nachweis von RNA oder DNA kardiotoxischer Viren und Bakterien, Pilzen oder Parasiten mittels (RT)-PCR oder *in situ* Hybridisierung (Caforio et al., 2013). Durch diese modernen molekularpathologischen Untersuchungen erhöht sich die Spezifität und Sensitivität der Diagnostik – Interpretationsspielräume werden durch die Darstellung spezifischer Zielstrukturen minimiert und somit die interindividuelle Variation zwischen verschiedenen Untersuchern reduziert. Ferner können Erreger direkt nachgewiesen werden, auch in Abwesenheit eines entsprechenden entzündlichen Infiltrates (Martin et al., 1994).



In den aktuellen pädiatrischen Leitlinien zur Myokarditis wird bei Entnahme einer endomyokardialen Biopsie als Goldstandard der Diagnostik die Durchführung einer molekularpathologischen Erregerdiagnostik, etwa durch den Einsatz von *in situ* Hybridisierungsverfahren empfohlen. Der kostengünstigere Einsatz der RT-PCR als Nachweismethode sollte immer unter strenger Berücksichtigung histologischer/immunhistologischer Befunde erfolgen, da sonst eine Unterscheidung zwischen einer floriden Entzündung und einer „harmlosen“ Viruspersistenz ohne Inflammation nicht möglich ist (Kandolf, 2011; Wojnicz et al., 2001). Die molekularpathologischen Untersuchungsverfahren an Endomyokardbiopsien in der Diagnostik der Myokarditis sind notwendig, um eine spezifische ätiologische Zuordnung zu treffen (Klingel et al., 2017). Indirekte Nachweismethoden, etwa durch Bestimmung serologischer Parameter, leiden hinsichtlich Sensitivität und Spezifität unter der eigenen Dynamik des Immunsystems des Wirtes (Mahfoud et al., 2011). Molekularpathologische Verfahren wie RT-PCR und *in situ* Hybridisierung stellen wichtige Nachweismethoden in der experimentell-virologischen Forschung der enteroviralen Infektion dar. Zudem existieren weitere Methoden, die es ermöglichen virale Infektionen im Herzmuskel oder anderen Organen nachzuweisen. Hierzu gehören Plaquetests zum Nachweis infektiöser Erreger aber auch Antigen-basierte Verfahren wie Western Blot, ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), Immunhistochemie, Immunfluoreszenz oder auch immunelektronenmikroskopische Verfahren.

Oft ist es schwierig, den Stellenwert dieser unterschiedlichen Nachweisverfahren im Rahmen einer CVB3 Infektion hinsichtlich ihrer Sensitivität, Spezifität und Sinnhaftigkeit für jeweilige Fragestellungen zu beurteilen. Insbesondere tierexperimentelle Studien unterscheiden sich hinsichtlich der eingesetzten Methoden erheblich, was wiederum die Vergleichbarkeit der jeweiligen Ergebnisse deutlich erschwert.

### 1.3 Zielsetzung und Fragestellungen

Das Mausmodell der CVB3 Infektion ist Grundlage diverser Forschungsprojekte auf dem Gebiet der viralen Herzerkrankung, aber auch der Pankreatitis und des Diabetes mellitus Typ 1 (Imrie et al., 1977; Klingel et al., 1992; Roivainen et al., 2010; Tracy, 2000; Yoon, 1990). Hierbei werden verschiedene Methoden zum Virusnachweis angewandt, was auf Grund unterschiedlicher Sensitivität und Spezifität der Untersuchungsmethoden die Vergleichbarkeit der einzelnen Studien erheblich einschränkt. Ferner ist die wissenschaftliche Aussagekraft der Erhebungen eingeschränkt, wenn die eingesetzten Methoden nicht optimal zum jeweiligen Zeitpunkt der Infektion und der zu beurteilenden Organe passen.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist daher verschiedene experimentelle Untersuchungsmethoden zum Nachweis von CVB3 im Verlauf der Infektion vergleichend darzustellen, um somit einen Beitrag zur Effektivität der unterschiedlichen Methoden zu liefern.

Unter Verwendung des Mausmodells der akuten und chronischen CVB3 Infektion wurden verschiedene virologische, molekularbiologische und immunhistochemische Nachweismethoden unter Beachtung folgender Fragestellungen verglichen:

- 1.) Welches ist der maximale Zeitpunkt nach intraperitonealer Inokulation von CVB3 zu dem noch infektiöse Virionen, virale RNA und virale Proteine in den wichtigsten Organen (Herz, Pankreas und Milz) nachweisbar sind? Das Mausmodell der CVB3 Myokarditis ist ein seit langem etabliertes System, das sich durch eine geringe Varianz der Infektionsmuster zu einem bestimmten Zeitpunkt der Infektion auszeichnet (Klingel et al, 1992). Die statistische Auswertung innerhalb der Gruppen bzw. zwischen den Zeitpunkten nach Infektion war für die Beantwortung der Fragestellung nicht relevant.
- 2.) Wie unterscheiden sich Spezifität und Sensitivität der unterschiedlichen Untersuchungsmethoden?
- 3.) Inwiefern sind diese Erkenntnisse für zukünftige laborexperimentelle Forschungsarbeiten und die klinische Diagnostik von Relevanz?

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Material**

#### **2.1.1 Chemikalien und Lösungen**

35-Schwefel	Sigma Aldrich (München)
4,6-Diamidino-2-phenylindol	Sigma Aldrich (München)
Acrylamid	Roth (Karlsruhe)
Ammoniumacetat	Merck (Darmstadt)
Ammoniumpersulfat	Sigma Aldrich (München)
Blocking Solution	Zytomed (Berlin)
Bovines Serumalbumin	Sigma Aldrich (München)
Bromphenolblau	Sigma Aldrich (München)
Calciumchlorid	Merck (Darmstadt)
Chloroform	Merck (Darmstadt)
Chlorwasserstoffsäure	Merck (Darmstadt)
DAPI	Sigma Aldrich (München)
DEPC	AppliChem (Darmstadt)
DEPC-behandeltes Wasser	Roth (Karlsruhe)
Dextransulfat	Q-Biogene (Amsterdam, Niederlande)
Dithiotreitol	Fermentas (Sankt Leon-Rot)
DMEM	Life Technologies (Darmstadt)
DNase I	Ambion (Carlsbad, USA)
DTT	Sigma Aldrich (München)
EDTA	AppliChem (Darmstadt)
EDTA-freier Lysepufer	Sigma Aldrich (München)
EDTA-freier Proteinaseinhibitor (cOmplete Mini, EDTA-Free)	Roche (Basel, CH)
Entellan (Merck)	Merck (Darmstadt)
Eosin-G Lösung	Certistain (Darmstadt)
Eosin-Y Lösung	Certistain (Darmstadt)
Ethanol	Merck (Darmstadt)

Ficoll	Sigma Life Sciences (München)
Film- & Fixieremulsion	Kodak (Stuttgart)
Fixogum	Marabu (Ludwigsburg)
Formamid	Sigma Aldrich (München)
Fötiales Kälberserum	Life Technologies (Darmstadt)
Glycerol	Merck (Darmstadt)
Glycin	Roth (Karlsruhe)
Hämatoxinlösung	Merck (Darmstadt)
Histogreen	Linaris (Mannheim)
Hydrolysesonde	MWG Biotech (Ebersberg)
Isopropanol	Merck (Darmstadt)
Kaliumchlorid (KCl)	Merck (Darmstadt)
Kaliumhydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck (Darmstadt)
Kristallviolett	Merck (Darmstadt)
Lithiumchlorid	Merck (Darmstadt)
Luminol	ImmunoCruz (Dallas, USA)
EDTA-freier Lysepuffer	Cell Signaling (Boston, USA)
Magnesiumchlorid	Merck (Darmstadt)
Methanol	Merck (Darmstadt)
Milchpulver	Roth (Karlsruhe)
Natriumacetat	Roth (Karlsruhe)
Natriumbicarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	Biochrom (Berlin)
Natriumcarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	Biochrom (Berlin)
Natriumchlorid (NaCl)	Merck (Darmstadt)
Natriumcitrat	Merck (Darmstadt)
Natriumdilaurylsulfat (SDS)	Merck (Darmstadt)
Natriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Merck (Darmstadt)
One-Step RT-PCR Kit (QIAGEN)	Qiagen (Venlo, Niederlande)
Paraffin	Merck (Darmstadt)
Paraformaldehyd	Merck (Darmstadt)

PBS	Sigma Aldrich (München)
Penicillin-Streptomycin	Gibco (Carlsbad, USA)
Pertex ®	Cytocore (Chicago)
Polyacrylamid	Bio-Rad (Hercules, USA)
Polyvinylidene-fluoridmembran	PerkinElmer (Waltham, USA)
Polyvinylpyrrolidon	Sigma Aldrich (München)
Protein Assay Lösung	Bio-Rad (Hercules, USA)
Protein Ladder	Fermentas (Sankt Leon-Rot)
Proteinase K	Merck (Darmstadt)
RNAguard	GE Healthcare (Fairfield, USA)
RNAsefreies Wasser	Qiagen (Venlo, Niederlande)
Rodent Block M	Biocare Medical (Pacheco, USA)
SeaPlaque Agarose	Sigma Aldrich (München)
Sonifizierte Lachssperma DNA	Sigma Aldrich (München)
SP6-RNA Polymerase	Roche (Basel, CH)
Spermidin	Sigma Aldrich (München)
TEMED	Roth (Karlsruhe)
Trichloracetat	Roth (Karlsruhe)
Tris	Roth (Karlsruhe)
Tris Base	Sigma Life Sciences (München)
TRIzol ®	Invitrogen (Carlsbad, USA)
t-RNA (Kaninchenleber)	Sigma Aldrich (München)
Trypsin-EDTA	ThermoFischer (Massachusetts, USA)
Tween-20	Sigma Life Sciences (München)
Xylol	VWR International (Darmstadt)
ZytoChem Plus HRP Polymer-Kit	Zytomed (Berlin)
β-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich (München)

### 2.1.2 Antikörper

Antikörper: Alexa 594 goat anti-mouse F(ab) <sub>2</sub> Fragment	Life technologies, Paisley, UK
Anti-alpha-Actin	Santa Cruz (Dallas, USA)
Cox mAB 31A2	Mediagnost (Reutlingen)
Esel anti-Ziege HRP-konjugiert	Santa Cruz (Dallas, USA)
Kaninchen anti-Maus CD3	Santa Cruz (Dallas, USA)
Ratte anti-Maus Mac3	Santa Cruz (Dallas, USA)
Ziege anti-Kaninchen AlexaFluor 647	Life Technologies (Darmstadt)
Ziege anti-Ratte AlexaFluor 647	Life Technologies (Darmstadt)

### 2.1.3 Primer

Primer PanEnteroFor1	MWG Biotech (Ebersberg)
Primer PanEnteroProbe1	MWG Biotech (Ebersberg)
Primer PanEnteroRev1	MWG Biotech (Ebersberg)

### 2.1.4 Viren, Versuchstiere und Zellreihen

A.BY/SnJ Mäuse (H-2 <sup>b</sup> )	Jackson Laboratories (USA)
cDNA generiertes CVB3	Kandolf, MPI für Biochemie (Martinsried)
Verozellen	Cell Line Services (Eppelheim)

### 2.1.5 Verbrauchsmaterialien, Geräte und Software

15ml BlueCap Röhrchen	BD Falcon (Heidelberg)
50ml BlueCap Röhrchen	BD Falcon (Heidelberg)
7300 Real Time PCR System	Applied Biosystems (Darmstadt)
96-well Platten PCR	PeqLab (Erlangen)
Axioskop 40 Mikroskop	ZEISS (Oberkochen)
Brutschränke	Heraeus (Hanau)
C-Chip Einmalzähler	Digitalbio (Montreal)
Eppendorfgefäße	Eppendorf (Hamburg)
Fluoreszenzmikroskop Imager M2	Becton Dickinson (Heidelberg)

ImageJ	National Institutes of Health (Maryland, USA)
Mikroskop Phase Contrast 2	Nikon (Düsseldorf)
Mikrotom Mikrom H35S	Scientific Fisher (Schwerte)
NanoDrop ND-1000	Thermo Scientific (Massachusetts, USA)
Packard Tri-Carb	Packard (Connecticut, USA)
Pipetten	Gilson (Middleton)
Sephadex G-50	Sigma Aldrich (München)
Sorvall® RT6000D Rotor	Thermo Scientific (Massachusetts, USA)
Sterile Werkbank	Heraeus (Hanau)
TriCarb 1600 TR	PerkinElmer (Waltham, USA)
VWR Pellet Mixer	VWR International (Darmstadt)
Zellkulturflaschen	Sigma Aldrich (München)
Zellkulturplatten 6-Well	Greiner bio-one (Frickenhausen)
Zentrifugen	Heraeus (Hanau)

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Herstellung eines Virusstocks**

Zur Bereitstellung einer ausreichenden Menge an Virionen zur weiteren Verwendung wurden Zellkulturflaschen (Kultivierungsfläche variabel 75cm<sup>2</sup>–125cm<sup>2</sup>) mit Verozellen zu einer Konfluenz von mindestens 90% bei standardisierten Bedingungen (37°C, 5% Kohlenstoffdioxidanteil, 95% Luftfeuchtigkeit) inkubiert. Nach dem Waschen mit 5ml PBS und der Überschichtung mit 10ml 1% Penicillin/Streptomycin (PenStrep) versehenem DMEM wurde erneut 12 Stunden bei standardisierten Bedingungen inkubiert. Anschließend erfolgte die Infektion mit 1 moi (= multiplicity of infection; also dem Verhältnis der Anzahl von Virionen zu Zellen) einer Variante des CVB3 Nancy-Stammes (Kandolf et al., 1985). Die Zellen wurden erneut 12 Stunden unter standardisierten Bedingungen inkubiert. Zum Aufschluss des Zellsubstrates wurde eine kryomechanische Lyse durch dreifach wiederholtes Einfrieren bei -20°C und intermittierendem Auftauen durchgeführt. Es folgte eine Zentrifugation bei 2500 U/min in einem Sorvall® RT6000D Rotor. Der virushaltige Überstand konnte somit von den Zelltrümmern im Pellet abgehoben werden. Anschließend wurde dieser mittels Plaquetest (siehe unten) auf die enthaltene Konzentration an Virionen überprüft.

### **2.2.2 Haltung der Versuchstiere und Entnahme von Organproben**

#### **2.2.2.1 Allgemeines zum Tierversuch**

Zur Untersuchung der systemischen CVB3 Infektion war die Bereitstellung verschiedener Proben (aus Herz, Milz, Pankreas und Blut), die zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion entnommen wurden, erforderlich. Es wurden dabei ABY/SnJ Mäuse verwendet, welche gegenüber CVB3 suszeptibel sind. Die Untersuchungen erfolgten im Rahmen des vom Regierungspräsidium Tübingen am 21.04.2010 genehmigten Tierversuchantrags PA2/10.

#### **2.2.2.2 Haltung der Versuchstiere**

Die Versuchstiere wurden in Gruppen von vier bis acht Mäusen in 207 x 140 x 365 mm großen Käfigen auf Weichholzgranulat gehalten. Der Tierraum war auf 24°C beheizt und mit einer geregelten Zu- und Abfuhr an Luft ausgestattet. Die Ernährung bestand aus pelletiertem Futter (Mäuse/Rattenstandarddiät) und Wasser ad libitum.



Die Käfige wurden zweimal wöchentlich gewechselt und 20 Minuten bei 121°C autoklaviert.

### **2.2.2.3 Infektion der Versuchstiere**

Infektion, Tötung und Organentnahme der Versuchstiere erfolgte unter sterilen Bedingungen. Die Versuchstiere wurden mit  $1 \times 10^5$  PFU CVB3 (in 200  $\mu$ l PBS) intraperitoneal infiziert und im Anschluss die Organe jeweils 2, 4, 6, 8, 12, 21 und 28 Tage nach Infektion entnommen. Die Anzahl der jeweils untersuchten Tiere/Organproben (n) ist in den Legenden der Abbildungen vermerkt.

### **2.2.2.4 Entnahme der Organe und Herstellung der Proben**

Herz, Milz und Pankreas wurden entnommen, in PBS gewaschen und gewogen. Anschließend wurde ein Teil der Organe in DMEM aufgenommen und auf eine Endkonzentration von 200mg/ml verdünnt (für Plaquetests und Western Blots). Diese wurden dann zunächst mechanisch homogenisiert, 2fach bei -20°C gefroren und aufgetaut und im Anschluss erneut homogenisiert. Zur RNA-Isolierung (für RT-PCR Untersuchungen) wurde ein weiterer Teil der Proben in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Ein Teil der Organe wurde für H.E. Färbung, immunhistochemische Verfahren und *in situ* Hybridisierung in 4%igem Paraformaldehyd (mit 1x PBS gepuffert) für 24 Stunden bei 4°C fixiert und anschließend 24 Stunden bei 4°C in PBS gelagert und anschließend in Paraffin eingebettet. Zudem wurden auch 400-600  $\mu$ l Blut entnommen und bei 4°C für eine Stunde gelagert. Anschließend eine Zentrifugation bei 10.000 rpm für 15 Minuten durchgeführt. Der Serumüberstand wurde für RT-PCR und Plaquetests verwendet (ca. 200-300  $\mu$ l, je nach Hämatokrit). Die Anzahl der untersuchten Proben (n) ist in den Legenden der jeweiligen Abbildungen vermerkt.

## **2.2.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung**

### **2.2.3.1 Färbeprotokoll**

Aus den Paraffin-eingebetteten Gewebeproben wurden mittels eines Mikrotoms 5  $\mu$ m dicke Schnitte hergestellt. Die Schnitte wurden 24 Stunden bei 37°C getrocknet und bei 20°C aufbewahrt. Vor der Färbung wurden die Schnitte folgendermaßen entparaffiniert und rehydriert:

---

### **Protokoll zur H.E.-Färbung**

2 x 10min	10% Xylol
2 x 3min	99% Ethanol
2 x 3min	96% Ethanol
2 x 3min	70% Ethanol
5min	bidestilliertes Wasser
5min	Hämatoxilinlösung
5min	Leitungswasser (fließend)
3sec	Eosin Y Lösung
1min	70% Ethanol
1min	90% Ethanol
2 x 3min	Xylol

Nach der Färbung wurden die Schnitte mit Pertex eingedeckt.

#### **2.2.3.2 Auswertung**

Die Auswertung und Fotografie der H.E.-gefärbten Gewebeschnitte erfolgte bei 25-200facher Vergrößerung mit Hilfe eines Axioskop 40 Mikroskops von Zeiss.

#### **2.2.3.3 Immunhistochemischer Nachweis von CD3<sup>+</sup> T-Lymphozyten und Mac3<sup>+</sup> Makrophagen**

Der immunhistochemische Nachweis von CD3<sup>+</sup> T-Lymphozyten und Mac3<sup>+</sup> Makrophagen in Paraffinschnitten muriner Herzen erfolgte entsprechend dem Nachweis von CVB3 VP1 und ist in Kapitel 3.2.9 beschrieben.

#### **2.2.4 Plaquetests zum Nachweis infektiöser Viren**

##### **2.2.4.1 Allgemeines zum Plaquetest**

Der Plaquetest wurde 1963 erstmals beschrieben und im Jahre 1965 zum Nachweis infektiöser Viren angewandt (Cunningham, 1965; Jerne et al., 1963). Grundlegendes Prinzip ist die Infektion einer Zellschicht mit infektiösem Material in unterschiedlichen Verdünnungen und der anschließende Vergleich der Anzahl an lysierten Zellherden. Durch eine Agaroseschicht wird dabei eine diffusionsbasierte Verschleppung an

infektiösem Material verhindert, so dass eine Ausbreitung des Erregers ausschließlich von der infizierten Zelle zu unmittelbar umliegenden Zellen möglich ist.

#### **2.2.4.2 Zellkultur**

Verozellen wurden in DMEM mit einem 10%igem Anteil an FCS und 1% Penicillin-Streptomycin (PenStrep) in Zellkulturflaschen (Kultivierungsfläche variabel 75cm<sup>2</sup> – 125cm<sup>2</sup>) kultiviert und bedarfsweise bei mindestens 75% Konfluenz passagiert. Es wurde unter standardisierten Bedingungen (37°C, Luftfeuchtigkeit 90%, CO<sub>2</sub>-Anteil 5%) inkubiert.

Zur Passagierung der Zellen wurden diese mit PBS gewaschen und mit Trypsin-EDTA-Lösung unter standardisierten Bedingungen für 90 Sekunden inkubiert. Bei Ablösung der Zellen von der Kultivierungsfläche wurden diese in o.g. DMEM-Gemisch aufgenommen und Trypsin durch das im FCS enthaltene  $\alpha_1$ -Antitrypsin inaktiviert.

#### **2.2.4.3 Kultivierung von Verozellen in Mikrotiterplatten**

Für Plaquetests wurden Mikrotiterplatten mit 6 Nöpfchen verwendet, wobei in jedes Nöpfchen 2,5x10<sup>5</sup> Zellen ausgesät wurden. Die Kulturflaschen wurden mit 2ml Trypsin-EDTA für 90 Sekunden inkubiert. Der entstandenen Lösung wurden 28ml DMEM mit FCS und PenStrep hinzugefügt. 10  $\mu$ l der vorhandenen Zellen wurden in einer Neubauer Zählkammer unter Nutzung aller vier Felder ausgezählt. Zur Errechnung der Ausgangskonzentration wurde mit 10<sup>4</sup> multipliziert. Nach anschließender Verdünnung auf die gewünschte Konzentration wurden 2-3x10<sup>5</sup> Zellen in jedes Nöpfchen hinzugefügt und auf ein Gesamtvolumen von 3ml mit Medium aufgefüllt. Die Platten wurden 20 Minuten bei Raumtemperatur angewärmt. Anschließend folgte die Inkubation bei standardisierten Bedingungen im Brutschrank über die Dauer von 24 Stunden.

#### **2.2.4.4 Infektion mit CVB3**

Die in 2.2.1.4 vorbereiteten Zellpellets (aus den jeweiligen Mausorganen) wurden gewogen und durch Zugabe von DMEM ohne Zusätze jeweils die gleiche Massekonzentration für jede Probe eingestellt. Zu den Zeitpunkt der Tage 2, 4, 6, 8, 12 standen 7 Proben zur Verfügung, zu den Zeitpunkten 21 und 28 Tage pi jeweils 5 Proben.

Von der Ausgangssuspension wurden sukzessive Verdünnungen im Verhältnis 1:10 bis zu einem maximalen Verdünnungsverhältnis von  $10^{-12}$  mit DMEM ohne Zusätze hergestellt. Als Negativkontrolle wurde reines Medium ohne Probenmaterial verwendet. Nach Abnahme des Überstandes der am Vortag ausgesäten Mikrotiter-Platten wurde mit 1x PBS gewaschen. 500µl verdünnte Proben wurden pro Näpfchen zugefügt. Ein Näpfchen pro Platte diente als Negativkontrolle. Weitere 500µl DMEM-Medium wurden dazugegeben, wodurch die Suspension nun ein weiteres Mal im Verhältnis 1:1 verdünnt wurde. Im Anschluss wurden die Platten 60 Minuten im Brutschrank bei standardisierten Bedingungen inkubiert. Als Agarosebeschichtung wurde 2%ige „SeaPlaque“-Agarose verwendet. Zwei Gramm Agarose wurde in 100ml ddH<sub>2</sub>O durch Erhitzen auf 100°C 20-30 Minuten gelöst und im Wasserbad bei 40°C gehalten. Durch Zugabe von 100ml 2x DMEM mit FCS mit 30 mM MgCl<sub>2</sub> wurde die Überschichtungslösung hergestellt. Mit 2ml dieser Lösung wurden die Zellen überschichtet. Die agarosebeschichteten Platten wurden nun 48 Stunden bei 37°C inkubiert. Alle Versuche wurden im Doppelansatz durchgeführt.

#### 2.2.4.5 Auswertung der Plaquetests

Nach 48 Stunden wurden die Zellen durch Zugabe von 2ml Trichloracetat (aq) pro Näpfchen fixiert. Die Agaroseschicht wurde durch einen schonenden Wasserstrahl entfernt und die Zellen mit Kristallviolett (s.u.) gefärbt. Durch die Lyse infizierter Zellen formten sich dabei makroskopisch sichtbare lytische Herde in der Zellschicht, die nicht mit Kristallviolett anfärbbar waren. Die Anzahl der Herde konnte somit als Maß für die Infektiösität herangezogen („plaque forming units per milliliter“, PFU/ml) werden - die Anzahl wurde mit Faktor 2 unter Berücksichtigung der 1:1 DMEM-Verdünnung verrechnet.

---

#### Kristallviolettlösung

Kristallviolett	5g in 100 ml Formalin & 200 ml Ethanol gelöst
ddH <sub>2</sub> O	700 ml
2M Tris-Base	35 ml

Die Lösung wurde dann mit ddH<sub>2</sub>O auf ein Gesamtvolumen von 2 Litern aufgefüllt.

## **2.2.5 Quantitative RT-PCR**

### **2.2.5.1 Isolierung der RNA aus Organproben**

Die Isolation der RNA aus Organproben erfolgte mittels TRIzol® Isolationsreagenz (Invitrogen). Zu den Zeitpunkt der Tage 2, 4, 6, 8, 12 standen 7 Proben zur Verfügung, zu den Zeitpunkten 21 und 28 Tage pi jeweils 5 Proben.

Die Proben wurden bei Raumtemperatur mit 200µl des Reagenz versetzt und anschließend mechanisch mittels Pellet Mixer homogenisiert und bei 4°C für 10 Minuten bei 12000g zentrifugiert um freie Gewebe-/Zelltrümmer zu pelletieren. Das Pellet wurde verworfen. Zur Abtrennung der RNA von Nukleoproteinen wurde 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. 0,2ml Chloroform wurden pro Milliliter des verwendeten Isolationsreagenz hinzugefügt, ungefähr 15 Sekunden lang gemischt und anschließend drei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden wieder bei 12.000g und 4°C für die Dauer von 15 Minuten zentrifugiert. Es resultierten drei verschiedene Phasen, wobei die oberste (durchsichtige) Phase weiterverwendet wurde. Die Phase wurde mit Isopropanol (100%) 500µl/ml zur Präzipitation der RNA versetzt. Nach zehnmütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde bei 4°C für 10 Minuten bei 12000g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde mit 750µl 75% Ethanol versetzt und anschließend 2x5 Minuten lang bei 4°C (12000rpm) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet ungefähr fünf bis zehn Minuten an der Luft getrocknet. Anschließend wurde die RNA in DEPC-H<sub>2</sub>O resuspendiert. Spektrometrisch (NanoDrop 1000) wurde die Konzentration [ng/µl] an RNA und der Reinheitsgrad (über Ratio 260/280) bestimmt. Die Ratio 260/280 bezieht sich auf das Verhältnis der Absorption bei Wellenlängen von 260nm (Nukleinsäuren) und 280nm (Proteine). Proben mit einem Ratio 260/280 von >1,98 (entsprechend mind. 90% Reinheitsgrad) wurden verwendet. Jede Probe wurde im Doppelansatz untersucht.

### **2.2.5.2 Reverse Transkription und real-time Polymerasekettenreaktion**

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde im Jahre 1983 entwickelt und stellt eine labortechnische Methode zur Vervielfältigung von spezifischen DNA Abschnitten dar. Der Begriff "Kettenreaktion" bezieht sich dabei auf den Sachverhalt, dass das Verfahren in aufeinanderfolgenden Zyklen abläuft, bei welchen die neu entstandenen Kopien jeweils als Matrize im nächsten Zyklus dienen. Dadurch wird eine

exponentielle Vervielfältigung ermöglicht. Die Technik ahmt dabei die physiologische DNA Replikation unter Zuhilfenahme von DNA Polymerasen und freien Nukleotiden nach. Zur Initiierung der Replikation sind Primer erforderlich, die sich an hitzedenaturierte DNA Einzelstränge anlagern (*Annealing*). Von dort synthetisieren thermostabile Taq-DNA Polymerasen einen komplementären DNA Strang (*Elongation*). Der entstehende Doppelstrang wird erneut hitzedenaturiert, um somit einen neuen Replikationsvorgang zu ermöglichen. Dieser Zyklus wird mehrere Male, in diesem Fall 40fach, wiederholt. Eine Weiterentwicklung der PCR ist die sogenannte real-time PCR. Während eine Quantifikation der entstandenen Produkte bei der "klassischen" PCR nur mittels anschließender Untersuchungen (meist gelelektrophoretische Auftrennung mit Anfärben) möglich ist, verwendet man bei der real-time PCR fluoreszierende DNA-Hydrolysesonden. Diese enthalten am 5'-Ende einen sogenannten "Reporter", am 3'-Ende einen sogenannten "Quencher". Beim Reporter handelt es sich um ein fluoreszierendes Molekül (i.d.F. 6-Carboxyfluoreszein, „FAM“), das elektromagnetische Strahlung absorbiert und mit einer spezifischen Wellenlänge emittiert (hier 520nm). Der Quencher, in diesem Fall 6-Carboxymethylrhodamin (TAMRA), hemmt diese Funktion, wenn er sich in unmittelbarer Nähe befindet. Da die verwendete Taq-Polymerase eine 5'-3'-Exonukleasefunktion besitzt, degradiert sie im Rahmen der Elongation die Sonde und trennt damit den Quencher vom Reporter. Dadurch wird die Inhibition der Fluoreszenzfunktion des Quenchers aufgehoben, was als Signal detektiert werden kann. Zur reversen Transkription der isolierten RNA und anschließenden real-time PCR wurde das QIAGEN One-Step RT-PCR Kit verwendet. Es beinhaltet die Omniscript/Seniscrypt Reverse Transkriptase, HotStarTaq DNA Polymerase und einen RT-PCR Buffer, der sowohl die reverse Transkription als auch die RT-PCR in einem Schritt (daher "one step") ermöglicht. Ebenfalls im Kit enthalten ist die Q-Solution, eine Lösung, die durch Aufhebung von Sekundärstrukturen der Nukleinsäuren eine effizientere RT-PCR ermöglichen soll. Während der Durchführung der Methode wurde stets auf ein Kontaminations- und RNase-freies Arbeiten geachtet, etwa durch den Einsatz von RNase-freiem Wasser und dem Tragen von Handschuhen. Die einzelnen Lösungen und Proben wurden zwischen den Arbeitsschritten auf Eis gehalten. Verwendet wurden Enterovirus-spezifische Primer (Sequenzen siehe Tabelle) und eine Hydrolysesonde der Firma MWG Biotech.

Alle Angaben sind in 5' → 3' Richtung:

<b>PanEntero</b>	
PanEnteroFor1	TCC TCC GGC CCC TGA
PanEnteroRev1	RAT TGT CAC CAT AAG CAG CCA
PanEnteroProbe1	<i>FAM</i> - CGG AAC CGA CTA CTT TGG GTG WCC GT - <i>TAMRA</i>

Der "Master Mix" wurde nach folgendem Protokoll hergestellt:

<b>Master Mix</b>	<b>Vol [<math>\mu</math>l]</b>	<b>Konzentration</b>
RNAsefreies Wasser	Variabel	
5x RT-PCR Buffer	10 $\mu$ l	
dNTP Mix	2 $\mu$ l	
Q-Solution	10 $\mu$ l	
Primer A	Variabel	0,6 $\mu$ M Endkonzentration
Primer B	Variabel	0,6 $\mu$ M Endkonzentration
RT-PCR Enzymmix	2 $\mu$ l	
RNAse Inhibitor	Variabel	5-10 Einheiten/Reaktion

Die Volumina wurden so gewählt, dass die jeweiligen Endkonzentrationen der Primer bei 0,6  $\mu$ M lagen und insgesamt ein Gesamtvolumen von 50 $\mu$ l erreicht wurde. Die extrahierten RNA-Proben wurden vorgelegt und der Master Mix hinzugefügt. Der PCR-Cycler wurde auf 50°C aufgewärmt, um die reverse Transkription für die Dauer von 30 Minuten durchzuführen. Im Anschluss folgte die real-time PCR. Dabei musste die HotStarTaq-Polymerase durch eine initiale Inkubation bei 95°C für eine Dauer von 15 Minuten aktiviert werden. Die folgenden RT-PCR Zyklen umfassten dabei:

<b>PCR Zyklen</b>		
Denaturierung	95°C	0,5 bis 1 Minuten
Annealing	50 - 68 °C	0,5 bis 1 Minuten
Elongation	72°C	1 Minute

Die detektierten Signale wurden mit einer gleichzeitig erstellten Eichkurve abgeglichen und konnten somit zur absoluten Quantifizierung der Menge an DNA beziehungsweise RNA in der Ausgangslösung verwendet werden.

## **2.2.6 Nachweis von CVB3 RNA durch *in situ* Hybridisierung**

### **2.2.6.1 Allgemeines zur *in situ* Hybridisierung**

Die *in situ* Hybridisierung (ISH) ist eine Methode, die zur Lokalisation von RNA beziehungsweise DNA im histologischen Schnitt verwendet wird. Dabei werden radioaktiv oder nicht-radioaktiv markierte RNA oder DNA Sonden mit Paraffin-eingebetteten Gewebeschnitten inkubiert, die sich aufgrund ihrer komplementären Sequenz spezifisch an die gesuchte Gensequenz, in diesem Fall virale Plusstrang RNA, anlagern. Im Falle einer radioaktiven ISH erhält man nach Autoradiographie Signale in Form von schwarzen Silberkörnern, welche die viralen Sequenzen ortsspezifisch im histologischen Schnitt reflektieren.

### **2.2.6.2 Herstellung der Hybridisierungssonden**

Die Herstellung der zum CVB3 Genom komplementären Sonde erfolgte durch *in vitro* Transkription des Plasmides pCVB3-R1 (enthält 98% des CVB3 Genoms) mittels der SP6-RNA Polymerase. Das Plasmid pCVB3-R1 wurde von Frau Prof. Dr. Klingel bereitgestellt (Hohenadl et al., 1991). Die Linearisierung des Plasmids erfolgte durch die Restriktionsendonuklease SmaI. Zur Herstellung einer Hybridisierungssonde zur Negativkontrolle wurde das Plasmid pSPT 18-Neo durch die Restriktionsendonuklease SmaI linearisiert und durch SP6-RNA Polymerase transkribiert. Die Transkripte wurden mit radioaktiven <sup>35</sup>S-UTP Nukleotiden markiert. In einer Vakuumzentrifuge wurden jeweils 250 µCi <sup>35</sup>S-UTP mit einer Aktivität von ca. 1300 Ci/mmol eingedampft. Das Pellet wurde in 10µl Transkriptionslösung aufgenommen und mit linearisierter Plasmid DNA und 20 Einheiten SP6-RNA Polymerase gemischt. Die Inkubation des Ansatzes erfolgte bei 37°C für 70 Minuten. Dem Transkriptionsansatz (siehe nächste Seite) wurde 50µl DEPC-H<sub>2</sub>O beigefügt und Deoxyribonukleinsäure mit 20 Einheiten DNase I bei 37°C für 20 Minuten verdaut.



<b>Transkriptionsansatz (Endkonzentrationen)</b>	
Tris-HCl (pH 8,0)	40 mM
DTT	10 mM
MgCl <sub>2</sub>	6 mM
Spermidin	2 mM
BSA (RNAse-und DNAse-frei)	100 mg/ml
ATP	500 µM
CTP	500 µM
GTP	500 µM
<sup>35</sup> S-UTP	25µM
RNAguard	1 Einheit

### 2.2.6.3 Sephadex ® G50 basierte Säulenzentrifugation

Zur Entfernung überschüssiger Nukleotide wurde eine Gelpermeationschromatographie unter Verwendung von Sephadex ®G50-Säulenzentrifugen eingesetzt. Die Säulen wurden beidseits zum Abfluss des Lagerungspuffers geöffnet. Die Säulen wurden 2 Minuten bei 2400rpm zentrifugiert. Die Nukleinsäuren wurden auf die Säulen aufgetragen und 4 Minuten bei 2400rpm zentrifugiert. Zur Entfernung von Verunreinigungen mit Proteinen erfolgte eine Phenolextraktion der Eluate.

### 2.2.6.4 Alkalische Hydrolyse der RNA Sonden

Für die *in situ* Hybridisierung wurden Sonden mit 100-400 Nukleotiden Länge eingesetzt. Hierzu wurden die Ansätze mit 40 mM NaHCO<sub>3</sub> und 60 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (pH 10,2) alkalisch versetzt. Durch Zugabe von 10% 3M C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub> (pH 4,9) wurde die Lösung neutralisiert. Mit Ethanol wurde drei Mal gefällt. Das entstandene Pellet wurde 2x mit 70%igem Ethanol gewaschen und anschließend jeweils unter Vakuum zentrifugiert. Zum Oxidationsschutz wurde die RNA anschließend in DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst, das mit 10mM DTT versetzt wurde. Die Aktivität der Sonde wurde mit einem Szintillationszähler (Packard Tri-Carb 1600 TR) bestimmt. Zur Längenbestimmung folgte eine Agarose-Gelelektrophorese mit anschließender Autoradiographie.

### 2.2.6.5 Hybridisierung I

Um die Degradation der Sonden durch ubiquitäre RNAsen zu verhindern, wurde striktes RNasefreies Arbeiten vorausgesetzt. Alle Lösungen waren mit autoklaviertem bidestilliertem H<sub>2</sub>O und RNase-freien Chemikalien hergestellt, die verwendeten Gefäße zuvor bei 180°C für eine Dauer von 8h erhitzt und bei allen Arbeitsschritten wurden puderfreie Einweghandschuhe verwendet.

#### Puffer und Lösungen:

---

<b>20x SSC</b>	
NaCl	3 M
tri-Natriumcitrat	0,35 M

---

---

<b>Puffer für den Proteinase K Verdau</b>	
Tris-HCl, pH 7,4	20 mM
CaCl <sub>2</sub>	2 mM

---

---

<b>Puffer für den RNase A Verdau</b>	
NaCl	0,5 M
Tris-HCl, pH 8,0	10 mM

---

### 2.2.6.6 Permeabilisierung des Gewebes

Die ISH wurde an 5µm dicken Paraffinschnitten durchgeführt. Die Entfernung des Paraffins wurde unmittelbar vor der *in situ* Hybridisierung durch die oben beschriebene Methode mit Xylol und anschließender Ethanolreihe bewerkstelligt. Die Zellen wurden einer enzymatischen und chemischen Denaturierung unterzogen. Diese Permeabilisierung des Gewebes wurde durch folgendes Protokoll ermöglicht:

---

<b>Protokoll zur Gewebepерmeabilisierung</b>	
20 sec	bidestilliertes, autoklaviertes Wasser
20 min	0,2 N Salzsäure
20 sec	bidestilliertes autoklaviertes Wasser
30 min	2 x SSC (0,3 M NaCl; 0,035 M tri- Natriumcitrat), 70°C
20 sec	bidestilliertes, autoklaviertes Wasser

---

15 min	Puffer für den Proteinase K Verdau mit 1µg Proteinase K/ml bei 37°C
2 x 20 sec	bidestilliertes autoklaviertes Wasser
2 x 3 min	70% Ethanol
5 min	100% Ethanol

Anschließend wurden die Zellen bei 37°C ca. 30 Minuten getrocknet.

### 2.2.6.7 Hybridisierung II

Die permeabilisierten Schnitte wurden nach dem Trocknen mit 14µl der hergestellten Sondenlösung bedeckt und im Anschluss mit einem silikonisierten Deckgläschen abgedeckt. Bei 42°C erfolgte 18 Stunden lang eine Inkubation im Dunkeln.

#### Hybridisierungslösung

***in vitro* transkribierte, hydrolysierte CVB3-<sup>35</sup>S-RNA Sonde**

oder

***in vitro* transkribierte <sup>35</sup>S –Kontroll RNA**

3 x 10<sup>5</sup> cpm/Schnitt

Deionisiertes Formamid	50%
Tris-HCl (pH 7,4)	10 mM
EDTA (pH 7,2)	1 mM
Sonifizierte Lachssperma DNA	200 µg / ml
t-RNA (Kaninchenleber)	100µg / ml

Die Bestandteile wurden gemischt, bei 5 Minuten auf 100°C erhitzt und sofort für 10 Minuten auf Eis gestellt. Folgende Bestandteile wurden hinzugefügt und erneut gemischt:

NaCl	600 mM
Dextransulfat	10%
Bovines Serumalbumin, RNase- und DNasefrei	0,05%
Ficoll	0,02%
Polyvinylpyrrolidon	0,02%
Dithiotreitol	0,02%
Natriumdodecylsulfat	0,1%

### 2.2.6.8 Posthybridisierung

Im Anschluss an die 18-stündige Inkubation wurde die überschüssige Sondenlösung nach folgendem Waschprotokoll entfernt:

---

<b>Protokoll zur Posthybridisierung</b>	
2 x 10 min	SSC
30 min 2 x	SSC/50% Formamid bei 42°C
30 min	RNAse Verdau Puffer mit 20 µg/ml RNAse A bei 37°C
30 min	RNAse Verdau Puffer ohne RNAse A bei 37°C
30 min	2 x SSC/50% Formamid bei 50°C
60 min	2 x SSC bei 55°C
3 min	70% Ethanol/300mM Ammoniumacetat
3 min	90% Ethanol/300mM Ammoniumacetat

---

Danach wurden die Gewebeproben erneut bei 37°C getrocknet.

### 2.2.6.9 Autoradiographie

Die Detektion der radioaktiv markierten RNA/RNA Hybride erforderte das Arbeiten mit einer lichtsensitiven Filmemulsion und wurde deswegen in einer Dunkelkammer durchgeführt. Die Filmemulsion wurde vorab in einem Wasserbad auf 43°C erwärmt und die Objektträger dann durch Eintauchen befilmt.

### 2.2.6.10 Entwicklung der Autoradiographien

Die Entwicklung der Autoradiographie fand in der Dunkelkammer statt. Die Objektträger wurden dabei wie folgt behandelt:

---

<b>Protokoll zur Autoradiographie</b>	
4 min	Entwicklerlösung (Kodak® D19, 8g/100ml) bei 18°C
20 sec	destilliertes Wasser
5 min	Fixierlösung (Kodak® Fixer, 18g/100ml)

---

### **2.2.6.11 Hämatoxin-Eosin Färbung**

Um eine lichtmikroskopische Beurteilung der Präparate zu ermöglichen, wurden die Schnitte anschließend mit einer H.E.-Färbung nach bereits beschriebenem Protokoll gegengefärbt.

## **2.2.7 Western Blots**

### **2.2.7.1 Allgemeines zum Western Blot**

Die SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese von Proteinen ist ein verbreitetes Verfahren, um diese nach ihrer molekularen Größe aufzutrennen. Durch den Zusatz des Detergenz Natriumdilaurylsulfats (SDS) und  $\beta$ -Mercaptoethanols werden die Proteine dabei so weit in ihrer Tertiärstruktur gestört, dass sie als längere Polypeptidketten vorliegen. Die Anlagerung des SDS bewirkt zudem auch eine Aufhebung der Eigenladung der jeweiligen Proteine und verleiht diesen eine negative Ladung, was wiederum die Auftrennung der Eiweiße anhand ihrer Größe ermöglicht.

Im Anschluss werden die aufgetrennten Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran übertragen und sind somit einer Antikörperfärbung zugänglich, die dem spezifischen Nachweis entsprechender Zielstrukturen dient.

Die Durchführung dieser Methode erfordert steriles Arbeiten mit Einweghandschuhen, um eine Kontamination des Ausgangsmaterials mit körpereigenen Proteinen zu verhindern.

### **2.2.7.2 Gewinnung von Proteinextrakten aus den Gewebeproben**

Die entnommenen Organe der Mäuse wurden in Medium mechanisch homogenisiert und bei 12.000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen.

Zu den Zeitpunkt der Tage 2, 4, 6, 8, 12 standen 7 Proben zur Verfügung, zu den Zeitpunkten 21 und 28 Tage pi jeweils 5 Proben.

Dem Pellet wurde 100 $\mu$ l Lysepuffer hinzugegeben, der zuvor mit einer Tablette EDTA-freien Proteinaseinhibitor versetzt wurde. Das Lysegemisch wurde mechanisch homogenisiert, 20 Minuten auf Eis im Lysepuffer inkubiert und dann erneut bei 4°C 10 Minuten lang bei 12000 rpm zentrifugiert.

### 2.2.7.3 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

1µl des entstandenen Überstandes wurde mit 1ml BIO-Rad Protein Assay Lösung (verdünnt mit ddH<sub>2</sub>O im Verhältnis 1:5) einer Messküvette zugefügt und mehrfach durchmischt. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 595nm Wellenlänge im Photometer gemessen. Durch Abgleich mit einer Eichkurve wurde die Proteinkonzentration bestimmt.

### 2.2.7.4 Gelelektrophoretische Auftrennung des Proteingemisches

Die Proteingemische wurden mit Lämmli-Puffer versetzt und bei 95°C denaturiert. Das eingesetzte Probenvolumen wurde in Kenntnis der Proteinkonzentration so gewählt, dass jeweils 20µg Protein aufgetragen wurden. Zur Positiv- und Negativkontrolle dienten CBV3-infizierte und nicht-infizierte Vero-Zelllysate.

---

<b>4x Lämmli-Puffer</b>	
Tris (0,5 M; pH 6,8)	5ml
Glycerol	4ml
10% SDS Lösung	8ml
0,1% Bromphenolblaulösung	2ml
β-Mercaptoethanol	1ml

---

Die Herstellung des SDS-versetzten Polyacrylamidgels erfolgte gemäß folgender Protokolle. Das Trenngel wurde in die Laufkammer gefüllt, die Polymerisation abgewartet und dann das Sammelgel hinzugegeben. Die Gemische beginnen ihre Polymerisation bei Hinzugabe von TEMED und Ammoniumpersulfatlösung.

---

<b>Trenngel</b>	
ddH <sub>2</sub> O	6,6 ml
30% Acrylamid Lösung	8 ml
Tris (1,5 Molar; pH 8,8)	5 ml
10% SDS Lösung	200 µl
10%ige Ammoniumpersulfatlösung	200 µl
TEMED	20µl

---

---

**Sammelgel**

ddH <sub>2</sub> O	5,5 ml
30% Acrylamid Lösung	1,3 ml
Tris (1,0 M; pH 6,8)	1 ml
10% SDS Lösung	80 µl
10%ige Ammoniumpersulfatlösung	80 µl
TEMED	800 µl

---

---

**10x Laufpuffer**

Tris	30g
Glycin	144g
20% SDS	50ml
ddH <sub>2</sub> O	add 1l

---

Die auspolymerisierten Gele wurden in die Laufkammer eingespannt und diese bis zur Markierung mit einfachem Laufpuffer gefüllt. Die jeweiligen Proben wurden mit einem vorgefärbten Größenstandard (PageRuler Prestained Protein Ladder, Fermentas (10 - 250 kDa)) versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Es wurde 100V Spannung angelegt, bis die Laufront des Größenstandards in das Gel eintrat. Dann wurde eine Spannung von 150V angelegt bis die Laufront den unteren Rand des Gels erreicht hatte.

**2.2.7.5 Übertragung der Proteine auf die PVDF-Membran**

Die Übertragung des aufgetrennten Proteingemisches auf eine PVDF-Membran ermöglicht später die Anwendung spezifischer Nachweisverfahren. Die Bewegung der Moleküle wird dabei durch ein elektrisches Feld bewerkstelligt, das zwischen den zwei geladenen Graphitplatten der Blottingapparatur aufgebaut wird.

---

**10x Transferpuffer**

Tris base	24g
Glycin	113g
ddH <sub>2</sub> O	add 1l

---

6x8cm große PVDF-Membranstücke wurden 20 Sekunden in 100%igem Methanol und anschließend 20 Sekunden in 20%-Methanol-haltigen Transferpuffer inkubiert. Pro Membran wurden jeweils 6 Filterpapiere (ebenfalls 6x8cm groß) in 20%-Methanol-haltigen einfachem Transferpuffer inkubiert. Filterpapiere, Gel und Membran wurden in folgender Reihenfolge (von Anode zu Kathode) zwischen die Graphitplatten gelegt:

- 3x Filterpapier
- PVDF-Membran
- Polyacrylamidgel
- 3x Filterpapier

Anschließend wurde eine Spannung von  $0,9\text{mA/m}^2$  für eine Dauer von 90 Minuten angelegt.

#### **2.2.7.6 Nachweis von CVB3 VP1 mittels des Antikörpers Cox mAB 31A2**

Der spezifische Nachweis des viralen Kapsidproteins VP1 von CVB3 wurde mittels des Antikörpers Cox mAB 31A2 (Mediagnost, Reutlingen) durchgeführt:

Die Membran wurde zunächst in 5%iger entfetteter Milch für eine Dauer von 2 Stunden bei  $20^\circ\text{C}$  inkubiert. Für 18 Stunden wurde die Membran mit dem Primärantikörper Cox mAB 31A2 in einem Verhältnis von 1:2000 in 3%iger entfetteter Milch verdünnt sowie bei  $4^\circ\text{C}$  inkubiert. Nach drei konsekutiven Waschschritten (10 Minuten mit PBS + 0,05% Tween-20) wurde der Sekundärantikörper (HRP-konjugierter Anti-Maus-Antikörper, verdünnt 1:5000 in 3%iger entfetteter Milch) für eine Dauer von 18 Stunden bei  $4^\circ\text{C}$  oder alternativ bei einer Dauer von 1-3 Stunden bei  $20^\circ\text{C}$  inkubiert.

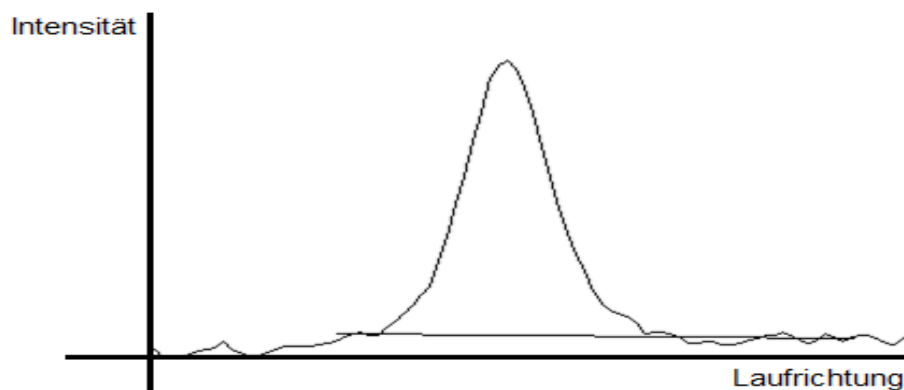
#### **2.2.7.7 Entwicklung und Auswertung der Western Blots**

Die Membran wurde 3x10 Minuten mit PBS-T gewaschen, 5 Minuten mit Luminol inkubiert und dann in der Dunkelkammer eine Filmbelichtung mit verschiedenen



Belichtungszeiten von einer halben bis zu 2 Minuten durchgeführt. Die quantitative Auswertung der entstandenen Bilder erfolgte durch das Programm „ImageJ“ (Wayne Rasband, National Institutes of Health). Zur Bildanalyse wurden die eingescannten Filme in eine 8-bit graustufige Bilddatei umgewandelt und anschließend analysiert. Das Programm wandelt dabei die Banden in Abhängigkeit der Fläche und Farbintensität in absolute Zahlenwerte um, welche der Belichtungsintensität und damit der Menge an gebundenen Sekundärantikörpern entsprechen.

Zur Bestimmung der Fläche unterhalb der Kurve muss das „Hintergrundrauschen“ berücksichtigt werden (siehe Hilfsgerade).



**Abbildung 4** – Dargestellt ist das Ergebnis der Umrechnung der Bilddatei durch ImageJ in einem Diagramm. Die X-Achse stellt die Laufrichtung der Proteinbande und die Y-Achse die Signalintensität dar. Die Fläche unter der Kurve ergibt den Zahlenwert des Signales.

### 2.2.7.8 Antikörperinkubation mit anti- $\alpha$ -Aktin-Antikörper

Zur Präzisierung der Menge der aufgetragenen Proteinmenge wurde eine Ladekontrolle mit einem anti-alpha-Aktin-Antikörper durchgeführt. Dazu wurde die Membran zunächst mittels einer 20-minütigen Inkubation in Stripping-Buffer von bereits gebundenen Antikörpern befreit. Es folgte eine Inkubation mit dem anti-alpha-Aktin-Antikörper analog zur Inkubation mit Cox mAB 31A2 (siehe oben), wobei die benutzten Primär- und Sekundärantikörper wie folgt in 3%iger entfetteter Milch verdünnt waren:

<b>Stripping Buffer</b>	
SDS 10%	20ml
Tris (0,5 M; pH 6,8)	12,5ml
ddH <sub>2</sub> O	67,5ml
$\beta$ -Mercaptoethanol	0,8ml

<b>Verwendete Antikörper</b>		<b>Verdünnung</b>
Primärantikörper	anti alpha-Aktin	1:2000
Sekundärantikörper	Esel-anti-Ziege HRP	1:5000

## 2.2.8 Immunfluoreszenz

### 2.2.8.1 Allgemeines zur Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenz ist eine Methode zum Nachweis spezifischer Proteine. Man nutzt Primärantikörper, welche an ein spezifisches Motiv der gesuchten Zielstruktur binden und Sekundärantikörper, welche ihrerseits an den Primärantikörpern binden. Letztere sind in diesem Falle mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Alexa 594), der Licht mit einer Wellenlänge von 617nm emittiert, gekoppelt.

### 2.2.8.2 Puffer und Lösungen zur Immunfluoreszenz

Phosphate Buffered Saline (PBS)

NaCl	150 mMol
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	80 mMol
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	20 mMol
KCl	30 mMol

Zur Herstellung einer Antikörperlösung wurde PBS mit 1% bovinem Serumalbumin (BSA) versetzt. Zum Nachweis des CVB3 Hüllproteins wurde Cox mAB 31A2-Antikörper (Firma Mediagnost, Reutlingen) aus der Maus und als Sekundärantikörper das Alexa 594 goat anti-mouse F(ab)<sub>2</sub> Fragment verwendet.

<b>Verwendete Antikörper</b>	<b>Verdünnung</b>
Maus anti-CVB3 VP1 (Cox mAB 31A2)	1:400
Alexa 594 Ziege anti-Maus F(ab) <sub>2</sub> Fragment	1:800

### 2.2.8.3 Immunfluoreszenzfärbung zum Nachweis von CVB3 VP1

Immunfluoreszenzfärbungen zum Nachweis von CVB3 VP1 wurden an 5µm dicken Formalin-fixierten, paraffineingebetteten Schnitten der entnommenen Mausorgane durchgeführt. Die Entfernung des Paraffins wurde unmittelbar vor Immunfluoreszenzfärbung durch die oben beschriebene Methode mit Xylol und anschließender

Ethanolreihe bewerkstelligt. Alle Schnitte wurden danach 3x mit PBS gewaschen. Mit einem hydrophoben Stift wurde auf dem Objektträger ein Kreis mit dem ungefähren Abstand von 0,5cm vom Gewebeschnitt gezogen. Folgende Inkubationsschritte wurden in einer feuchten Kammer durchgeführt. Es wurde mit 100µl 5% BSA in PBS blockiert. Die Inkubation der Antikörper erfolgte dann nach folgendem Protokoll:

<b>Immunfluoreszenzfärbung</b>	
60min	100µl Cox mAB 31A2 Antikörper
3 x 5min	Waschen mit PBS
60min	100µl Ziege-anti-Maus Antikörper
3 x 5min	Waschen mit PBS
30sec	DAPI Inkubation (siehe unten)
3 x 5min	Waschen mit PBS und Eindecken

#### **2.2.8.4 DAPI-Färbung**

Die Färbung mit 4,6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) ermöglicht eine unspezifische Anfärbung der Zellkerne in einem Gewebeschnitt. DAPI ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der sich auf Grund seiner molekularen Struktur bevorzugt an AT-reiche Sequenzen der kleinen Furche der DNA anlagert. Das Emissionsmaximum der Fluoreszenz bei DNA-Anlagerung liegt bei einer Wellenlänge von 461nm, bei einer RNA-Anlagerung bei 500nm. Diese Methode ermöglicht (unter Zuhilfenahme optischer Farbfilter) eine selektive Anfärbung DNA-reicher Zellkerne. Die Gewebeschnitte wurden mit PBS 3 x 5 Minuten gewaschen und in einer 1:10.000 Verdünnung mit 90µM DAPI-Stammlösung 30 Sekunden lang inkubiert. Die Schnitte wurden erneut gewaschen, mit mounting medium benetzt und mit Deckgläschen abgedeckt.

#### **2.2.8.5 Auswertung der Immunfluoreszenzfärbung**

Die Immunfluoreszenzfärbung der Gewebeproben ermöglicht die optische Auswertung der histologischen Schnitte. Dabei erscheinen die Signale der VP1-Detektion als rote Färbungen, wohingegen die Zellkerne als blaue Färbung imponieren.

### 2.2.9 Immunhistochemischer Nachweis von CD3<sup>+</sup>T-Lymphozyten, Mac3<sup>+</sup> Makrophagen und CVB3 VP1

Zum immunhistochemischen Nachweis von CD3<sup>+</sup> T-Lymphozyten und Mac3<sup>+</sup> Makrophagen wurden zunächst 5µm dicke Paraffinschnitte der Organe angefertigt. Die Schnitte wurden nach folgendem Protokoll bearbeitet:

<b>Arbeitsschritte</b>	
3 x 5min	Xylol
2 x 3min	100% Ethanol
3min	70% Ethanol
3min	40% Ethanol
3min	ddH <sub>2</sub> O
20min	3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> und 0,1% Natriumazid in destilliertem Wasser (zur Blockierung der endogenen Peroxidase)
4min bei 100°C	Citratpuffer (82ml 0,1M Natriumcitrat + 18ml 0,1M Zitronensäure ad 1 Liter ddH <sub>2</sub> O)
5min	Fließendes Leitungswasser
10min	Blocking Solution (Zytomed)
3min	PBS

Es folgte die Inkubation mit Antikörpern für die Dauer von einer Stunde in folgender Verdünnung:

<b>Antikörper</b>	<b>Verdünnung</b>
Kaninchen anti CD3 (Thermo Scientific, rabbit monoclonal, clone SP7)	1:500
Ratte anti Mac3 Antikörper (BD Pharmingen, clone M3/84)	1:300
Cox mAB 31A2 (Mediagnost, Reutlingen)	1:400

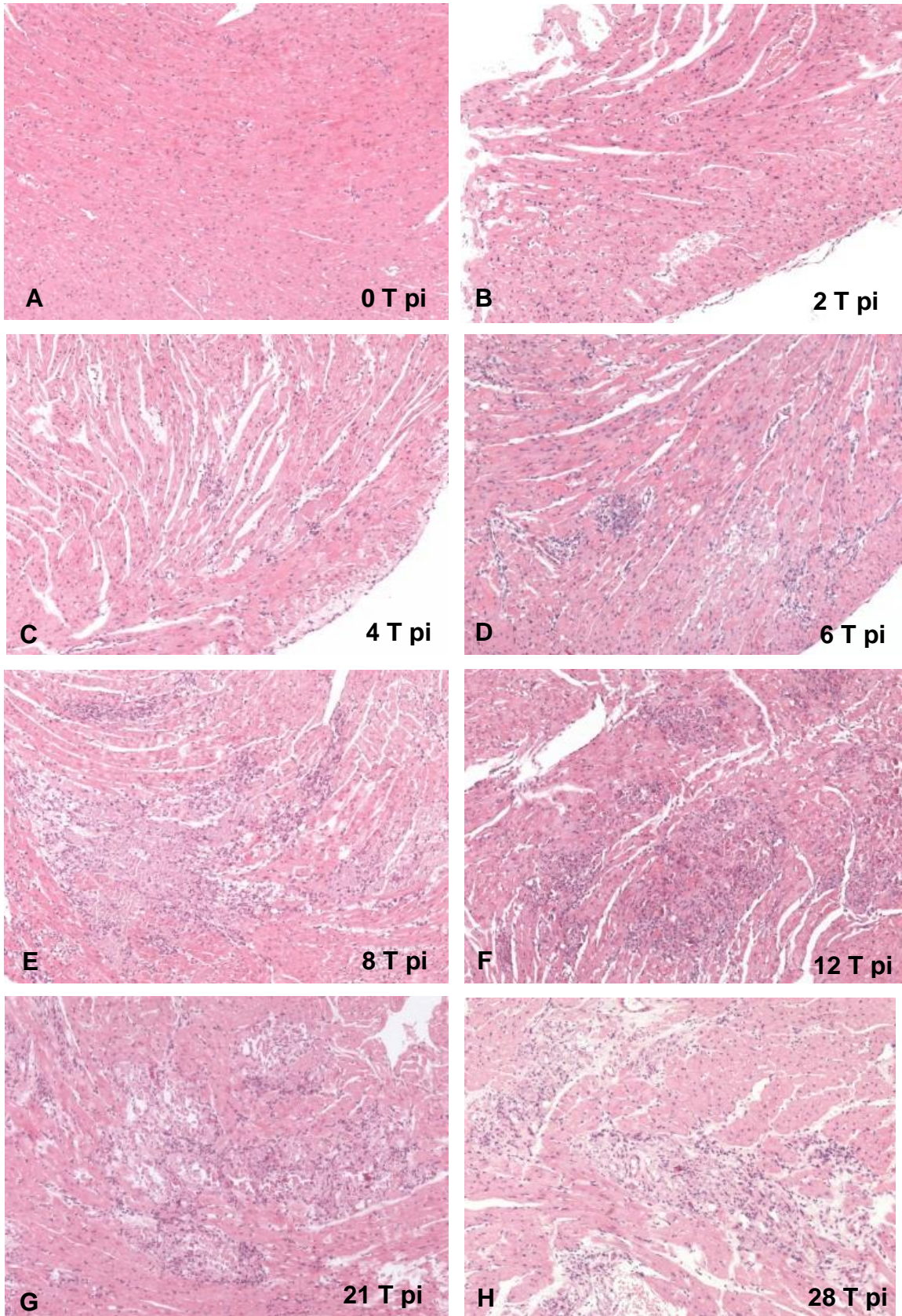
Nach drei weiteren konsekutiven Waschschritten (5 Minuten, PBS) erfolgte die Inkubation mit Sekundärantikörpern und HRP-Reagenzien. Abhängig von dem eingesetzten Primärantikörper wurde 45 Minuten mit Rabbit-on-Rodent (Kaninchen auf Nagetier) HRP-Polymer beziehungsweise 20 Minuten mit Rat probe (Biocare Medical) und anschließend 20 Minuten mit Rat-on-Mouse (Ratte auf Maus) HRP Polymer inkubiert. Danach wurde 3x5 Minuten mit PBS gewaschen. Es folgte eine Färbung mit HistoGreen (Linaris) und Mayers Hämalaun. Anschließend wurden die Präparate mit Pertex eingedeckt. Nach dem Blockierungsschritt wurde zum Nachweis von CVB3 VP1 mit Blocking Solution (Zytomed) eine spezifische Blockierung endogener Mausimmunglobuline mit Rodent Block M (Biocare Medical) für 30 Minuten durchgeführt. Nach Inkubation mit dem anti-CVB3 VP1 Antikörper erfolgte eine Inkubation mit dem ZytoChem Plus HRP Polymer System (Zytomed) und nachfolgender HistoGreen-Färbung und weiterer Prozessierung wie bereits für den Nachweis für CD3 und Mac3 beschrieben.

### **3. Ergebnisteil**

#### **3.1 Histologische und immunhistologische Untersuchungen der Herzen im Verlauf der CVB3 Infektion**

Gewebeschnitte muriner Herzen wurden mit H.E. gefärbt und histologisch auf Zeichen von Zell-/Gewebeuntergang sowie von Entzündungszellen untersucht. An Tag 0 pi (Abbildung 5A) zeigte sich ein morphologisch unauffälliges Bild mit konfluierenden Myozyten ohne Hinweis auf ein entzündliches Infiltrat. Zwei Tage pi (Abbildung 5B) fanden sich im Vergleich zu Tag 0 pi keine Veränderungen der Gewebestruktur und der zellulären Zusammensetzung. An Tag 4 pi wurden (Abbildung 5C) vereinzelte Myozytennekrosen sowie kleine gruppierte Infiltrate aus mononukleären Zellen beobachtet. An Tag 6 pi (Abbildung 5D) zeigte sich eine deutliche Zunahme der Infiltrate. Die Myozyten waren teilweise ödematös verändert und wiesen Diskontinuitäten in der Zellmembran auf, vereinbar mit einer intrazellulären Proteindegradation im Rahmen einer Koagulationsnekrose. An Tag 8 pi (Abbildung 5E) waren die nekrotischen Zellareale ausgedehnter als zu früheren Erhebungszeitpunkten. Zudem wurde eine weitere Zunahme des zellulären Infiltrates festgestellt. An Tag 12 pi (Abbildung 5F) zeigte sich die größte Ausdehnung des

mononukleären Zellinfiltrates. Im weiteren Verlauf der Infektion (Tag 21 (Abbildung 5G) und Tag 28 (Abbildung 5H) pi) war ein Rückgang des Infiltrates zu erkennen. Die Gewebearchitektur war durch große konfluierende nekrotische Areale deutlich gestört.



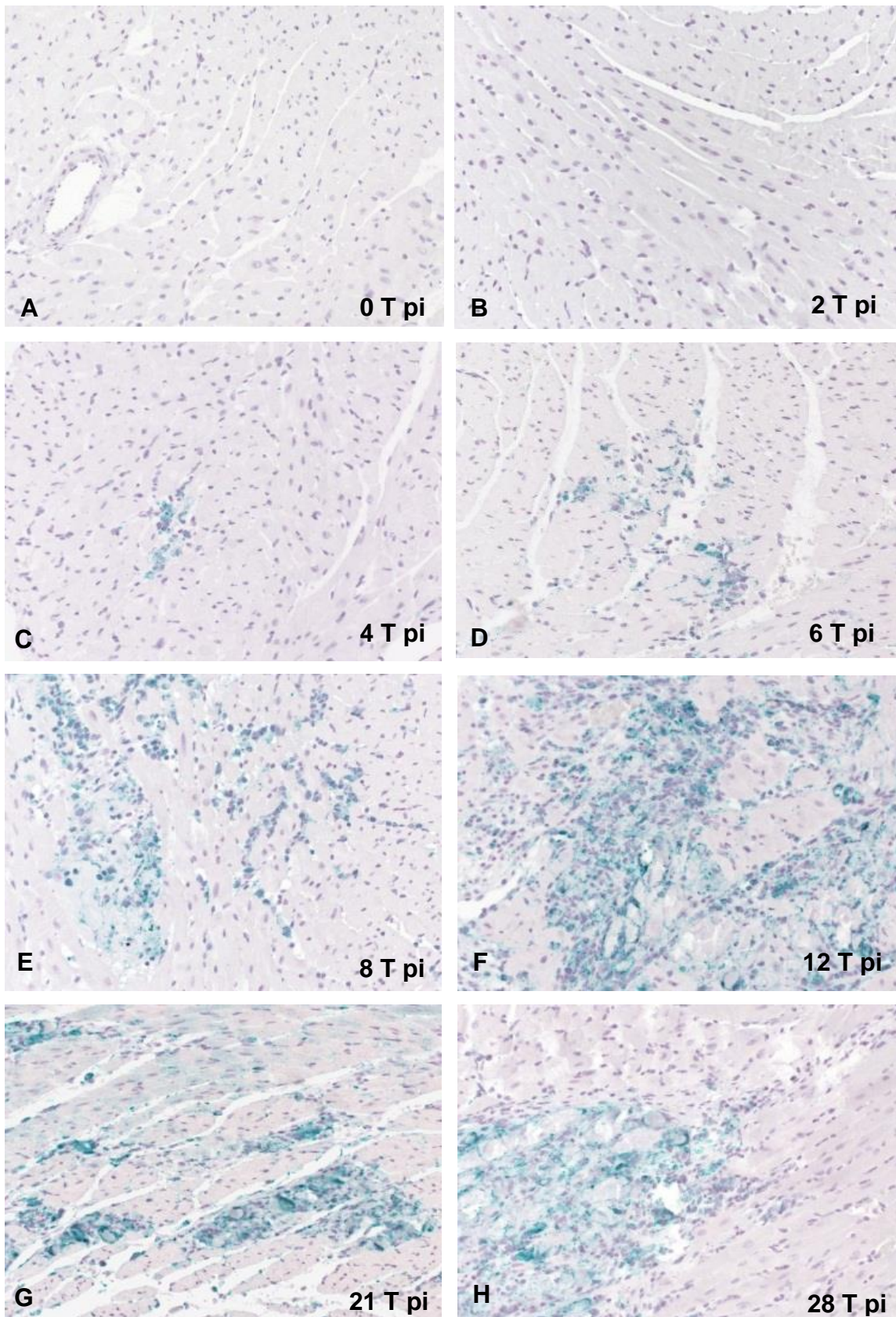
**Abbildung 5** - H.E.-gefärbte Gewebeschnitte muriner Herzen im Laufe der CVB3 Infektion an Tag 0 pi (A), Tag 2 pi (B), Tag 4 pi (C), Tag 6 pi (D), Tag 8 pi (E), Tag 12 pi (F), Tag 21 pi (G) und Tag 28 pi (H). (Vergrößerung x100), n=7 pro Zeitpunkt.

Zur zellulären Charakterisierung der beschriebenen mononukleären Zellinfiltrate wurden immunhistologische Untersuchungen mit Antikörpern gegen Mac3 und CD3 durchgeführt. Mac3 ist ein muriner Immunrezeptor, der von mononukleären Phagozyten und insbesondere bei der Differenzierung von Monozyten zu Gewebsmakrophagen vermehrt exprimiert wird. CD3 ist ein Rezeptor auf T-Lymphozyten.

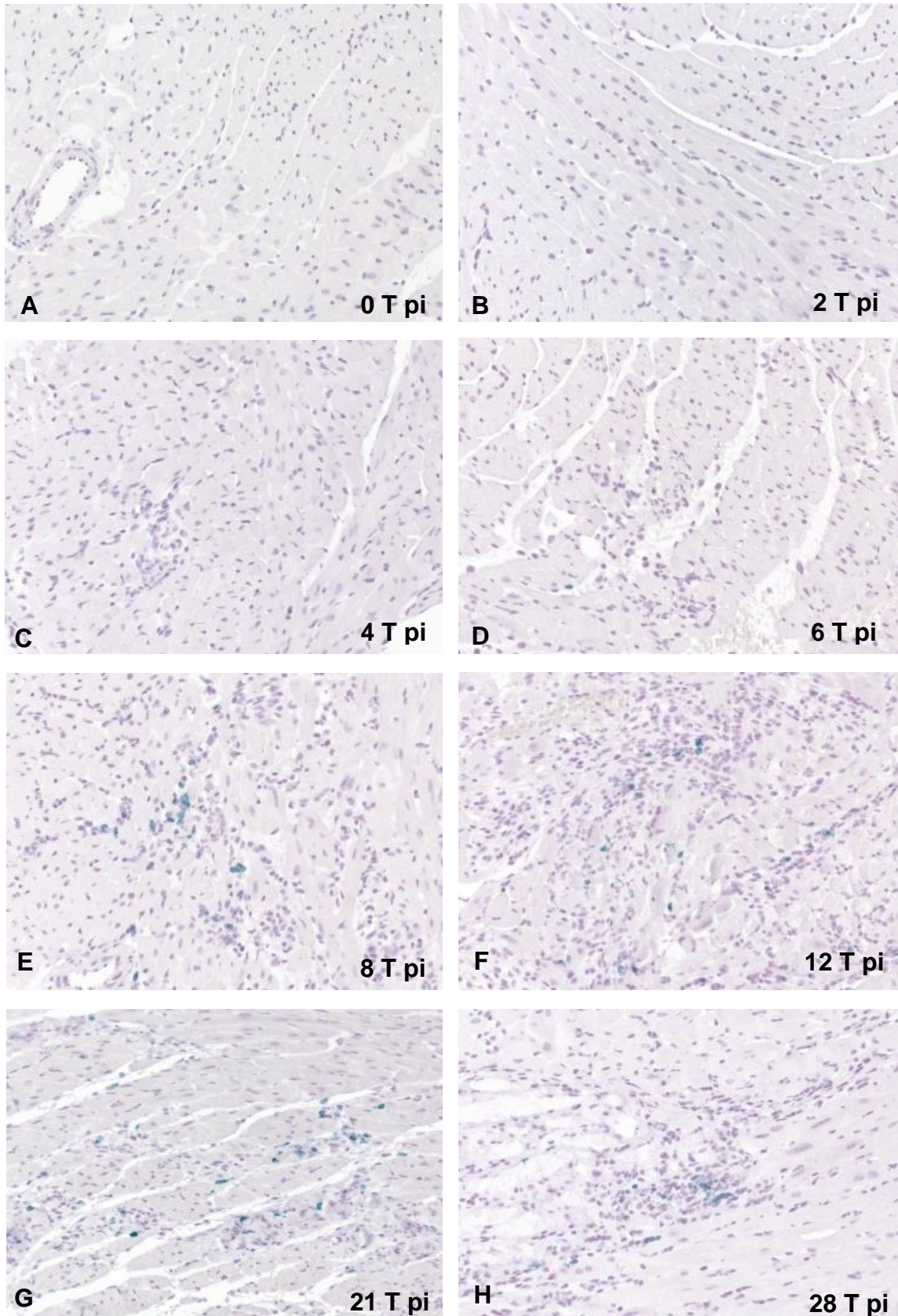
Abbildung 6 zeigt die Infiltration des Myokards durch Mac3-positive Makrophagen im Verlauf der Infektion. Wie in Abbildung 6A ersichtlich, finden sich an Tag 0 pi keine Mac3-positiven Zellen im Myokard. Auch an Tag 2 pi (Abbildung 6B) und Tag 4 (Abbildung 6C) pi lassen sich Makrophagen nicht vermehrt nachweisen. An Tag 6 pi (Abbildung 6D) fanden sich wenige, diffus verteilte Makrophagen. Während der akuten Myokarditis an Tag 8 pi (Abbildung 6E) war eine deutliche Zunahme der Makrophagen zu beobachten, welche an Tag 12 pi (Abbildung 6F) ihr Maximum erreichte und danach (Tag 21 pi (Abbildung 6G) und 28 pi (Abbildung 6H)) wieder kontinuierlich abnahm.

An Tag 0 pi (Abbildung 7A) wurden keine CD3-positiven Zellen im murinen Herzen nachgewiesen. Auch 2 Tage nach Virusinokulation (Abbildung 7B) konnte keine signifikante Anzahl an CD3-positiven Zellen detektiert werden. An Tag 4 pi (Abbildung 7C) wurden vereinzelte Foci CD3-positiver Lymphozyten sichtbar, deren Menge und Ausbreitung an Tag 6 pi (Abbildung 67) zunahm. Bereits an Tag 8 pi (Abbildung 7E) waren große Areale des Myokards durch CD3-positive Zellen infiltriert. An Tag 12 pi (Abbildung 7F) erreichte die Ausdehnung der Infiltration ihr Maximum. An den Tagen 21 pi (Abbildung 7G) und 28 pi (Abbildung 7H) wurde ein deutlicher Rückgang der lymphozytären Infiltration beobachtet.





**Abbildung 6** – Lokalisation von Mac3-positiven Makrophagen (blau) mittels Immunhistochemie in murinen Herzen an Tag 0 pi (A), Tag 2 pi (B), Tag 4 pi (C), Tag 6 pi (D), Tag 8 pi (E), Tag 12 pi (F), Tag 21 pi (G) und Tag 28 pi (H). (Vergrößerung x200), n=7 pro Zeitpunkt.

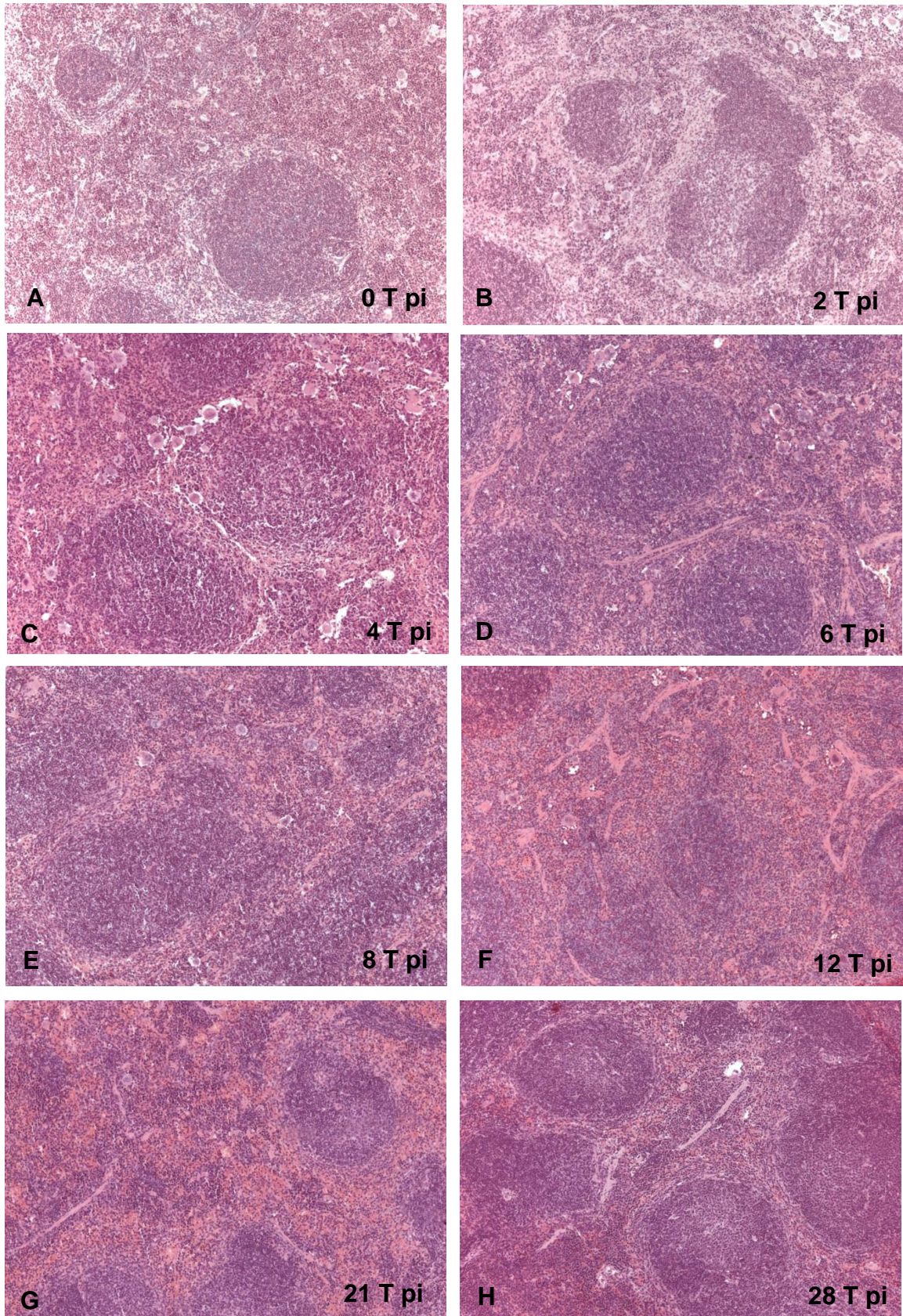


**Abbildung 7** – Lokalisation von CD3-positiven Lymphozyten (blau) mittels Immunhistochemie in murinen Herzen an Tag 0 pi (A), Tag 2 pi (B), Tag 4 pi (C), Tag 6 pi (D), Tag 8 pi (E), Tag 12 pi (F), Tag 21 pi (G) und Tag 28 pi (H). (Vergrößerung x200), n=7 pro Zeitpunkt.

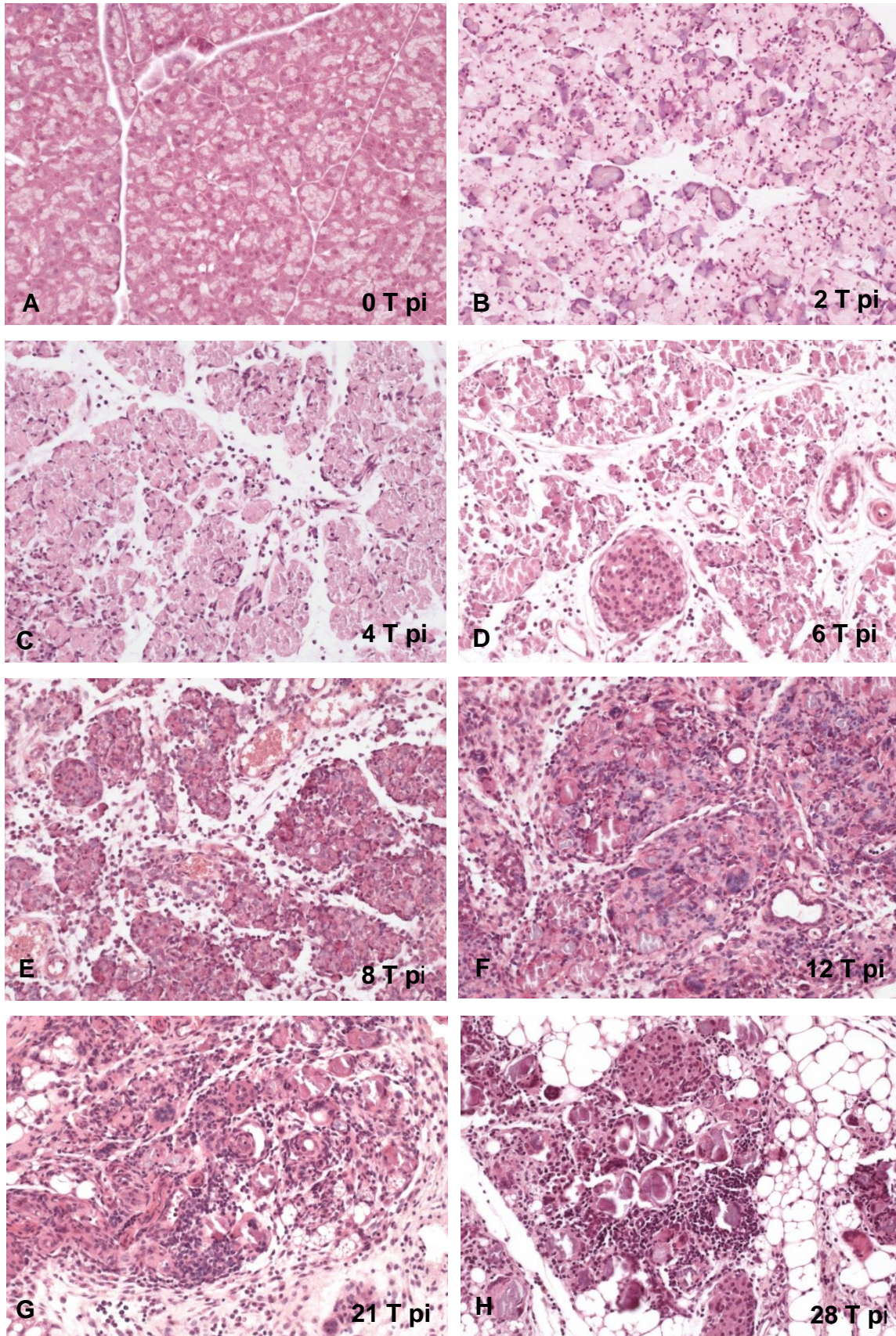
### **3.2 Histologische Untersuchungen muriner Milzen und Pankreata im Verlauf der CVB3 Infektion**

Auch Gewebeschnitte muriner Milzen und Pankreata wurden mit H.E. gefärbt und hinsichtlich der histologischen Veränderungen und entzündlichen Aktivität untersucht. An Tag 0 pi (Abbildung 8A) stellte sich in der weißen Pulpa der Milzen eine regelrechte Gewebearchitektur mit vielen Primärfollikeln dar. An Tag 2 pi (Abbildung 8B) fanden sich vergleichsweise mehr Follikel mit zentralen Arealen geringerer Zelldichte, vereinbar mit der Präsenz von Sekundärfollikeln inklusive Keimzentrum. An Tag 4 pi (Abbildung 8C) zeichnet sich eine Größenzunahme der Lymphfollikel ab. An Tag 6 pi (Abbildung 8D) wurde eine weitere Hyperplasie der Lymphfollikel beobachtet. An Tag 8 pi (Abbildung 8E) waren teilweise konfluierende hyperplastische Lymphfollikel sichtbar. An Tag 12 pi (Abbildung 8F) und 21 pi (Abbildung 8G) wurde eine Rückbildung der Hyperplasie festgestellt und an Tag 28 pi (Abbildung 8H) erreichte die Größe der einzelnen Follikel wieder diejenige zum Inokulationszeitpunkt.

Die Pankreata wiesen an Tag 0 pi (Abbildung 9A) eine regelmäßige Gewebearchitektur ohne Hinweise auf zytopathologische Veränderungen auf. Bereits an Tag 2 pi (Abbildung 9B) imponierten die Zellen des exokrinen Pankreas geschwollen, die Nuklei waren an den Rand des Zytoplasmas verlagert und einzelne Zellen waren vollständig aufgelöst. Die Beobachtungen sind gut vereinbar mit einem nekrotischen Zelluntergang. Der Durchmesser azinärer Lumina war durch die Größenzunahme der Azinuszellen deutlich verkleinert. Das endokrine Pankreas war unverändert. An Tag 4 pi (Abbildung 9C) zeigte sich eine Zunahme der nekrotischen Anteile im exokrinen Pankreas mit einer vermehrten Einlagerung von monozytären Entzündungszellen. Sechs (Abbildung 9D) und 8 Tage pi (Abbildung 9E) war eine weitere Auflösung der Gewebearchitektur zu erkennen, die mit einer deutlichen Entzündungszellinfiltration einherging. An Tag 12 pi (Abbildung 9F) und Tag 21 pi (Abbildung 9G) waren vereinzelt Fettvakuolen erkennbar sowie Kalkablagerungen im Rahmen einer fettigen Nekrose. An Tag 28 pi (Abbildung 9H) fand sich letztlich eine ausgeprägte Destruktion des exokrinen Pankreas mit ausgeprägter Verfettung als Konsequenz der ausgedehnten Nekrotisierung des Organs.



**Abbildung 8** – H.E.-gefärbte Gewebeschnitte muriner Milzen im Verlauf der CVB3 Infektion an Tag 0 pi (A), Tag 2 pi (B), Tag 4 pi (C), Tag 6 pi (D), Tag 8 pi (E), Tag 12 pi (F), Tag 21 pi (G) und Tag 28 pi (H). (Vergrößerung x100). n=7 pro Zeitpunkt



**Abbildung 9** – H.E.-gefärbte Gewebeschnitte muriner Pankreata im Laufe der CVB3 Infektion an Tag 0 pi (A), Tag 2 pi (B), Tag 4 pi (C), Tag 6 pi (D), Tag 8 pi (E), Tag 12 pi (F), Tag 21 pi (G) und Tag 28 pi (H). (Vergrößerung x200), n=7 pro Zeitpunkt.

### 3.3 Nachweis von Nachkommenviren durch Plaquetests

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Plaquetests durchgeführt, um den Nachweis replikationsfähiger Virionen im zeitlichen Verlauf der Infektion in den Gewebeproben zu erbringen.

Die durchschnittlich ermittelten Werte der einzelnen Proben (n=7 für Tag 2, 4, 6, 8, 12 pi; n=5 für Tage 21, 28 pi), gruppiert nach jeweiligem Organ und Tag nach Infektion, können *Tabelle 1* entnommen werden.

	2 T pi	4 T pi	6 T pi	8 T pi	12 T pi	21 T pi	28 T pi
Serum	$8.54 \times 10^6$	0	0	0	0	0	0
Milz	$1.56 \times 10^7$	$3.60 \times 10^3$	0	0	0	0	0
Pankreas	$4.91 \times 10^8$	$1.78 \times 10^6$	$7.20 \times 10^3$	$8.33 \times 10^2$	0	0	0
Herz	$1.78 \times 10^5$	$4.18 \times 10^6$	$8.92 \times 10^5$	$1.10 \times 10^5$	$2.5 \times 10^3$	0	0

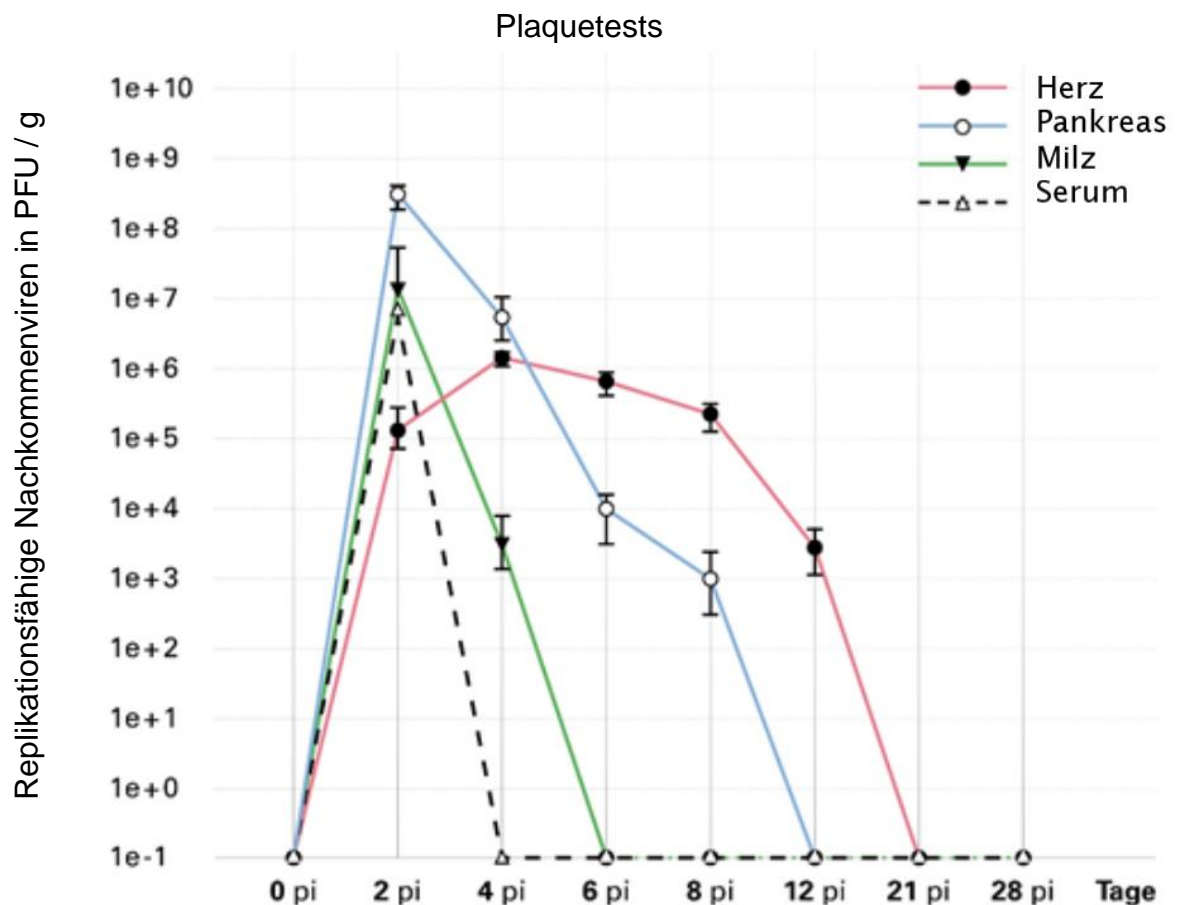
*Tabelle 1* – Durchschnittliche PFU/g für die Organe Herz, Pankreas & Milz im Verlauf der Infektion. n=7 für Tag 2, 4, 6, 8, 12 pi; n=5 für Tage 21, 28 pi.

Im Serum konnten Virionen mit dieser Untersuchungsmethode nur an Tag 2 pi nachgewiesen werden ( $8,54 \times 10^6$  PFU/g).

In der Milz wurde die höchste Konzentration replikationsfähiger Virionen am 2. Tag nach Inokulation beobachtet. Die Konzentration betrug hierbei  $1,56 \times 10^7$  PFU/g. Am 4. Tag pi waren  $3,6 \times 10^3$  PFU/g nachweisbar. Ab dem 6. Tag pi waren in der Milz keine replikationsfähigen Viren mehr nachzuweisen.

Das Pankreas ist ebenfalls durch initial hohe Mengen an infektiösen Viren gekennzeichnet. Zwei Tage pi wurde eine Konzentration von  $4,91 \times 10^8$  PFU/g bestimmt. Am 4. Tag pi betrug sie durchschnittlich  $1,78 \times 10^6$  PFU/g, am 6. Tag pi  $7,2 \times 10^3$  PFU/g und am 8. Tag pi  $8,33 \times 10^2$  PFU/g. Ab dem 12. Erkrankungstag sind mit dieser Methode keine infektiösen Virionen mehr nachweisbar.

Das Herz wies 2 Tage pi durchschnittlich  $1,78 \times 10^5$  PFU/g auf. Das Maximum der Konzentration an replikationsfähigen Viren wird mit  $4,18 \times 10^6$  PFU/g an Tag 4 pi erreicht. An Tag 6 pi wurde eine Konzentration von  $8,92 \times 10^5$  PFU/g beobachtet. An Tag 8 pi fiel die Konzentration weiter auf  $1,1 \times 10^5$  PFU/g Pankreasgewebe ab. An Tag 12 pi wurde eine Konzentration von  $2,5 \times 10^3$  PFU/g bestimmt. Im weiteren Verlauf der Infektion waren keine Erreger mehr nachweisbar.



**Abbildung 10** – Graphische Darstellung der Ergebnisse der Plaquetests ( $n=7$  für Tag 2, 4, 6, 8, 12 pi;  $n=5$  für Tage 21, 28 pi). Die (dekadisch-logarithmische) Y-Achse zeigt die Konzentration an replikationsfähigen Nachkommenviren in der Ausgangsprobe [PFU/g], die X-Achse den Zeitpunkt der Organentnahme nach Infektion [Tage pi]. Als Fehlerindikator wurde die einfache Standardabweichung gewählt. Sichtbar ist ein Nachweis von Nachkommenviren in allen Organen an Tag 2 pi. Im Pankreas (blaue Linie) wird dabei die höchste Konzentration im Vergleich zu anderen Organen gemessen. In Pankreas (blau), Milz (grün) und Serum (gestrichelt schwarz) wird an Tag 2 pi die höchste Konzentration detektiert. Dahingegen findet sich die höchste Konzentration an Virionen in den Herzen an Tag 4 pi. Während im Serum nur an Tag 2 pi Virionen detektiert werden, sind diese in der Milz bis Tag 6 pi, im Pankreas bis zu Tag 8 pi nachweisbar. Das Herz ist das Organ mit der längsten Persistenz an replikationsfähigen Virionen (bis zu Tag 12 pi). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen.

### 3.4 Nachweis viraler RNA

#### 3.4.1 Quantitative RT-PCR

Die quantitative RT-PCR wurde durchgeführt, um in den verschiedenen Organen und im Serum die Anzahl von CVB3 RNA Kopien im Verlauf der Infektion zu ermitteln (n=7 für Tag 2, 4, 6, 8, 12 pi; n=5 für Tage 21, 28 pi). Die gemessenen Werte wurden, wie in Material und Methoden beschrieben, mit einer bekannten Anzahl an CVB3 RNA Molekülen abgeglichen und zur absoluten Quantifizierung verwendet. Die Ergebnisse wurden graphisch in Abbildung 11 dargestellt. Tabelle 2 zeigt die errechneten Mittelwerte der jeweiligen Ergebnisse aller Proben eines Erkrankungstages.

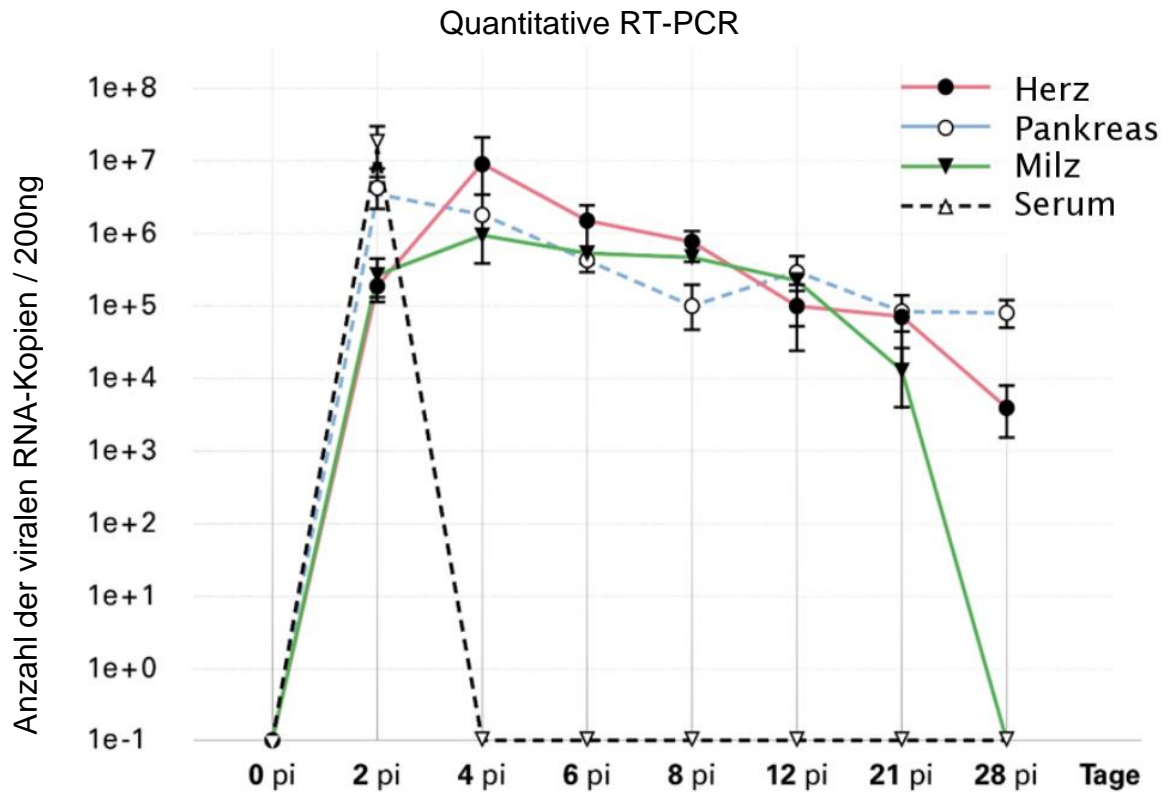
	2 dpi	4 dpi	6 dpi	8 dpi	12 dpi	21 dpi	28 dpi
Serum	$1.96 \times 10^7$	0	0	0	0	0	0
Milz	$2.73 \times 10^5$	$9.28 \times 10^5$	$5.15 \times 10^5$	$4.65 \times 10^5$	$2.20 \times 10^5$	$1.30 \times 10^4$	0
Pankreas	$3.42 \times 10^6$	$1.80 \times 10^6$	$4.31 \times 10^5$	$1.05 \times 10^5$	$2.61 \times 10^5$	$8.38 \times 10^4$	$9.89 \times 10^4$
Herz	$1.89 \times 10^5$	$9.03 \times 10^6$	$1.49 \times 10^6$	$7.55 \times 10^5$	$1.01 \times 10^5$	$7.00 \times 10^4$	$3.92 \times 10^3$

*Tabelle 2 – Durchschnittliche Anzahl nachweisbarer viraler RNA Kopien in den Ausgangsproben (200ng Gesamt-RNA) der jeweiligen Organe in Abhängigkeit der Tage pi (n=7 für Tag 2, 4, 6, 8, 12 pi; n=5 für Tage 21, 28 pi).*

Im Serum wurden an Tag 2 pi  $1,96 \times 10^7$  genomische RNA Kopien gemessen. Dies war der einzige Zeitpunkt, an welchem virale RNA im Serum detektiert wurde.

In der Milz wurden 2 Tage pi  $2,73 \times 10^5$  Kopien an viraler RNA gemessen. An Tag 4 pi wurde eine ca. 3fach höhere Menge ( $9,28 \times 10^5$  Kopien) und damit das Maximum im zeitlichen Verlauf notiert. An Tag 6 pi wurden  $5,15 \times 10^5$  und an Tag 8 pi  $4,65 \times 10^5$  Kopien detektiert. An Tag 12 pi war die Anzahl der RNA Kopien  $2,2 \times 10^5$  rückläufig. An Tag 21 pi fanden sich nur  $1,3 \times 10^4$  RNA Kopien. An Tag 28 pi war keine virale RNA in den Milzen nachweisbar.





**Abbildung 11** – Graphische Darstellung der Ergebnisse der RT-PCR ( $n=7$  für Tag 2, 4, 6, 8, 12 pi;  $n=5$  für Tage 21, 28 pi). Die (dekadisch-logarithmische) Y-Achse zeigt die Anzahl der viralen RNA Kopien in der Ausgangsprobe [RNA/200ng], die X-Achse den Zeitpunkt der Organentnahme nach Infektion [Tage]. Als Fehlerindikator wurde die einfache Standardabweichung gewählt. Im Serum (gestrichelt schwarz) ist virale RNA nur an Tag 2 pi detektierbar. Im Pankreas (blaue Linie, gestrichelt) findet sich die höchste Konzentration an Tag 2 pi. Im Herz (rot) findet sich die höchste Konzentration an Tag 4 pi. In der Milz (grün) findet sich die höchste Konzentration an Tag 2 pi. Bis einschließlich Tag 28 pi ist virale RNA in Herz und Pankreas nachzuweisen. In der Milz ist nur bis einschließlich Tag 21 pi virale RNA nachweisbar.

Im Pankreas wurde das Maximum der CVB3 RNA Kopien an Tag 2 pi gemessen (durchschnittlich  $3,42 \times 10^6$  Kopien), an Tag 4 pi  $1,80 \times 10^6$  RNA Kopien und an Tag 6 pi  $4,31 \times 10^5$  RNA Kopien. An Tag 8 pi wurden durchschnittlich  $1,05 \times 10^5$  virale RNA Kopien und an Tag 12 pi durchschnittlich  $2,61 \times 10^5$  virale RNA Kopien detektiert. Im weiteren Verlauf wurde eine weitere Reduktion an RNA Kopien festgestellt ( $8,38 \times 10^4$  RNA Kopien an Tag 21 pi und  $9,89 \times 10^4$  RNA Kopien an Tag 28 pi).

Im Myokard wurden am 2. Tag pi durchschnittlich  $1,89 \times 10^5$  RNA Kopien nachgewiesen. Das Maximum der viralen RNA wurde an Tag 4 pi detektiert ( $9,03 \times 10^6$  RNA Kopien). Im weiteren Verlauf nahm die Anzahl der CVB3 RNA Kopien ab (an Tag 6 pi  $1,49 \times 10^6$  RNA Kopien, an Tag 8 pi  $7,55 \times 10^5$  und an Tag 12 pi  $1,01 \times 10^5$ , an Tag 21 pi  $7,00 \times 10^4$ , an Tag 28 pi  $3,92 \times 10^3$  virale RNA Kopien).

### 3.4.2 RNA/RNA *in situ* Hybridisierung (ISH)

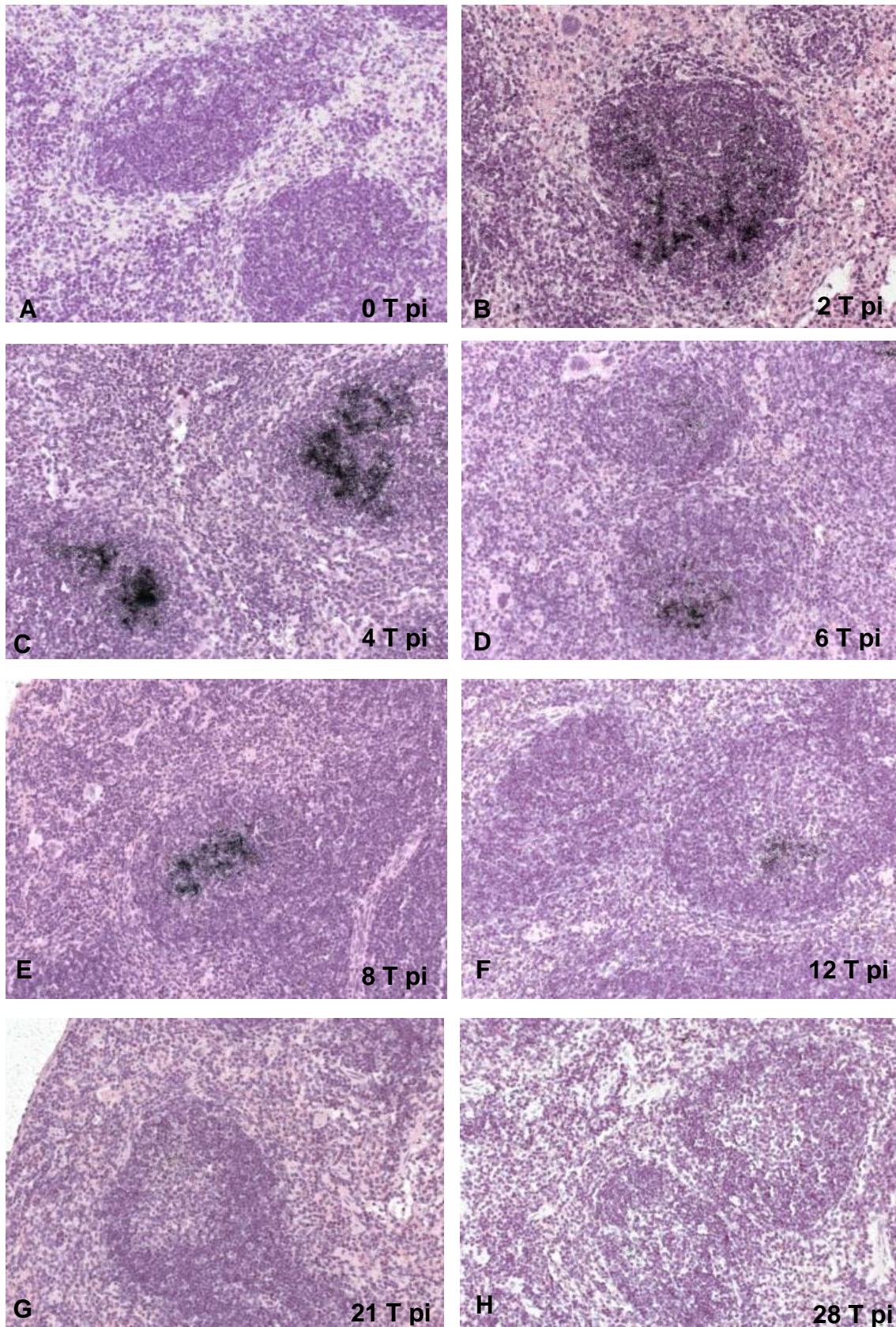
Die *in situ* Hybridisierung dient der Lokalisation von CVB3 RNA in histologischen Schnitten. Durch Beschichtung von Objektträgern mit einer Filmemulsion und nachfolgender Autoradiographie stellen sich die radioaktiv markierten Sonden als dunkle Signale (schwarze Silberkörner) in den Gewebeschnitten dar. Die Intensität und Fläche der detektierten Signale korreliert dabei mit der Menge der gebundenen radioaktiven Sonden und somit mit der Menge an viralen RNA Kopien. Die Methode zeichnet sich durch eine hohe Sensitivität aus, da die 100-400bp langen Sonden nahezu das gesamte virale Genom abdecken. Zur besseren Korrelation des nekrotischen Gewebes mit der Virusreplikation werden die Schnitte H.E.-gegengefärbt.

Erwartungsgemäß zeigte sich in der Milz an Tag 0 pi (Abbildung 12A) eine regelrechte Gewebestruktur ohne Nachweis viraler RNA. An Tag 2 pi (Abbildung 12B) waren nur wenige Areale mit autoradiographischen Signalen sichtbar, die auf einzelne Lymphfollikel beschränkt waren. An Tag 4 pi (Abbildung 12C) war das Maximum des Nachweises viraler RNA erreicht. Zu diesem Zeitpunkt zeigten sich hohe Signalintensitäten in vielen Lymphfollikeln. Wie von Klingel et al. 1995 beschrieben, handelt es sich hier in erster Linie um infizierte B-Lymphozyten. An Tag 6 pi (Abbildung 12D) nahm die Intensität und Verteilung der Signale ab. Acht Tage pi (Abbildung 12E) waren positive Zellen noch in einzelnen Follikeln nachweisbar. An Tag 12 pi (Abbildung 12F) zeigten sich im Vergleich zum vorausgegangenen Erhebungszeitpunkt weniger starke Signale, korrespondierend mit einer geringeren Menge an viraler RNA in nur noch einzelnen infizierten Zellen. Am 21. Tag (Abbildung 12G) nach der Infektion waren nur noch einzelne Signale in den Follikeln detektierbar. An Tag 28 pi (Abbildung 12H) waren keine RNA/RNA Hybride mehr in den Milzzellen nachweisbar.

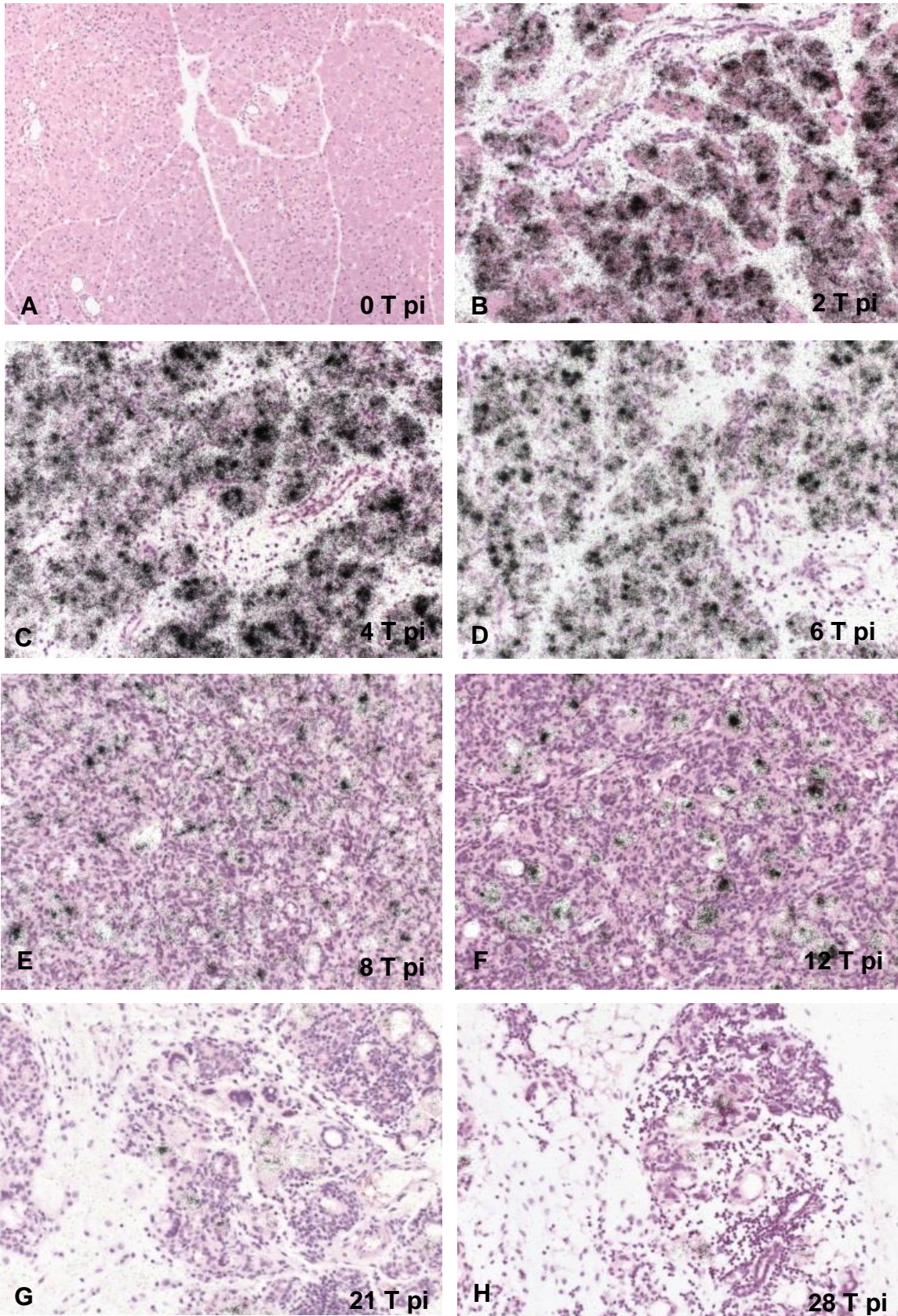
In den murinen Pankreata fand sich an Tag 0 pi erwartungsgemäß eine regelrechte Gewebestruktur ohne radioaktive Signale (Abbildung 13A). An Tag 2 pi (Abbildung 13B) waren radioaktive Signale in mehr als 50% der exokrinen Pankreazellen nachweisbar. Das Parenchym war stellenweise aufgelöst. An Tag 4 pi (Abbildung 13C) waren Signale in mehr als 70% aller exokrinen Pankreazellen sichtbar. Im weiteren Verlauf der Infektion an Tag 6 pi (Abbildung 13D) nahm die Intensität und Ausbreitung der Signale ab. Das Parenchym war bereits vollständig zerstört, die Zellen waren zu größten Teilen nicht anfärbbar, was vereinbar ist mit ausgeprägten

Nekrosen. Acht Tage pi (Abbildung 13E) waren nur noch wenige Herde mit Signalen erkennbar. Das Parenchym war durch ein Infiltrat aus mononukleären Zellen durchsetzt. Im weiteren Verlauf der Infektion (12 Tage pi, Abbildung 13F) zeigte sich ein weiterer Rückgang der autoradiographischen Signale. An Tag 21 (Abbildung 13G) und Tag 28 (Abbildung 13H) pi wurden nur noch vereinzelte Herde mit Silberkörnern detektiert. Das Parenchym war kaum anfärbbar, es zeigten sich ausgeprägte Kalkablagerungen, vereinbar mit einer fettigen Nekrose wie bereits in den H.E.-Färbungen beschrieben.

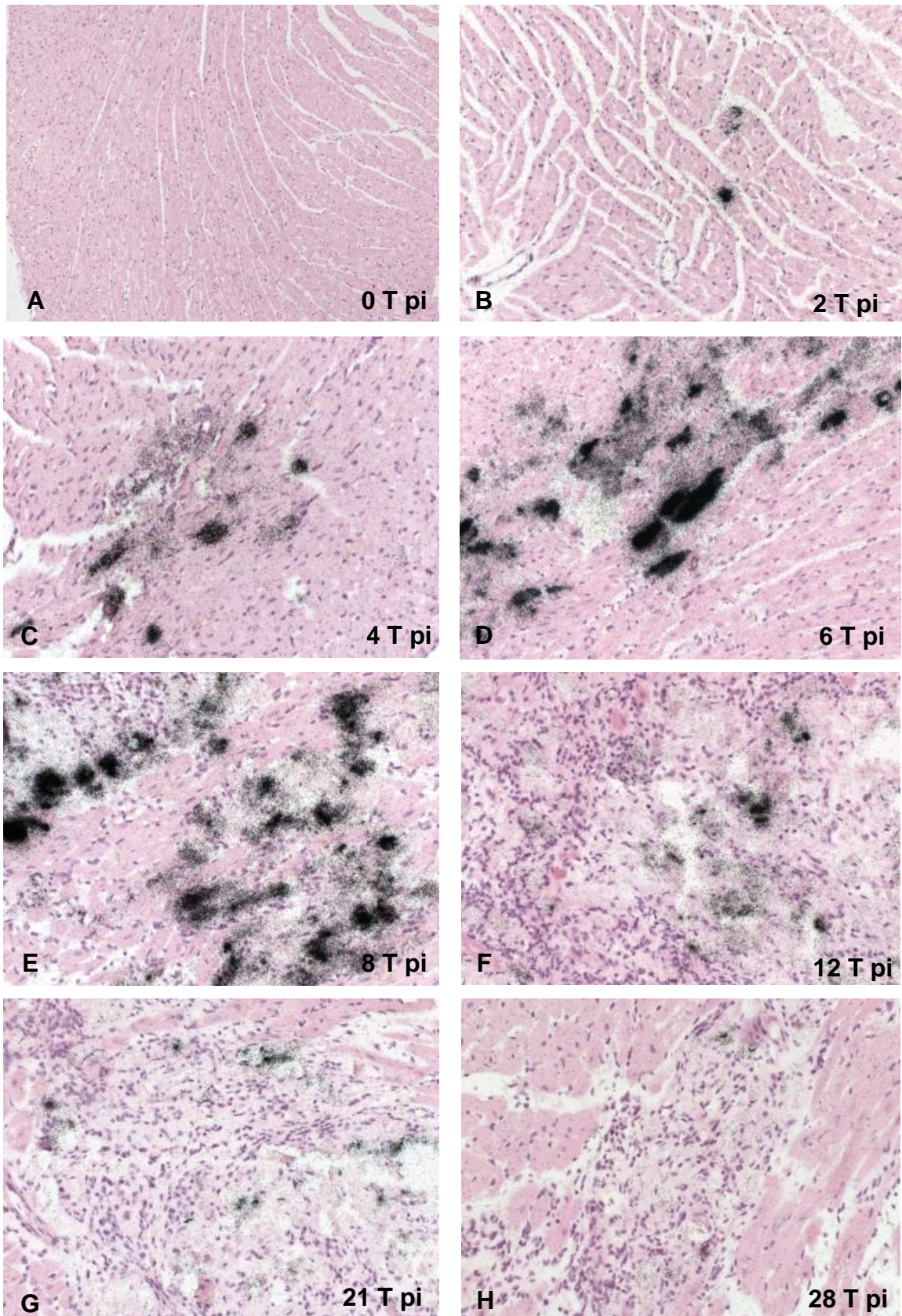
In den murinen Herzen war, wie erwartet, an Tag 0 pi (Abbildung 14A) eine regelrechte Gewebestruktur ohne Hybridisierungssignale zu verzeichnen. Bereits an Tag 2 pi (Abbildung 14B) wurden einzelne Signale in singulären Myozyten ohne erkennbare Prädilektionsstellen im Myokard detektiert. An Tag 4 pi (Abbildung 14C) fanden sich kleine Gruppen mit positiven myokardialen Zellen. Im weiteren Verlauf nahm die Anzahl und Größe der ISH positiven Herde (Tag 6 pi, Abbildung 14D) weiter zu, wobei an Tag 8 pi (Abbildung 14E) das Maximum der Anzahl positiver Myozyten detektiert wurde. An Tag 12 pi (Abbildung 14F) wurden weniger ISH positive Zellen und auch eine geringere Intensität der Signale als zu vorausgegangenen Untersuchungszeitpunkten gemessen. Alle Signale fanden sich innerhalb nekrotischer Areale. An Tag 21 pi (Abbildung 14G) wurden noch weniger Silberkörner im Myokard detektiert als an Tag 12 pi. An Tag 28 pi (Abbildung 14H) wurden nur vereinzelt virale Nukleinsäuren in Myozyten gefunden.



**Abbildung 12** – ISH von Gewebeausschnitten muriner Milzen im Verlauf der CVB3 Infektion an Tag 0 pi (A), Tag 2 pi (B), Tag 4 pi (C), Tag 6 pi (D), Tag 8 pi (E), Tag 12 pi (F), Tag 21 pi (G) und Tag 28 pi (H). Mittels in situ Hybridisierung wurde CVB3 RNA autoradiographisch nachgewiesen, erkennbar als schwarze Silberkörner. (Vergrößerung x200), n=7 pro Zeitpunkt.



**Abbildung 13** – ISH von Gewebeausschnitten muriner Pankreata im Verlauf der CVB3 Infektion an Tag 0 pi (A), Tag 2 pi (B), Tag 4 pi (C), Tag 6 pi (D), Tag 8 pi (E), Tag 12 pi (F), Tag 21 pi (G) und Tag 28 pi (H). Mittels in situ Hybridisierung wurde CVB3 RNA autoradiographisch nachgewiesen, erkennbar als schwarze Silberkörner. (Vergrößerung x200), n=7 pro Zeitpunkt.

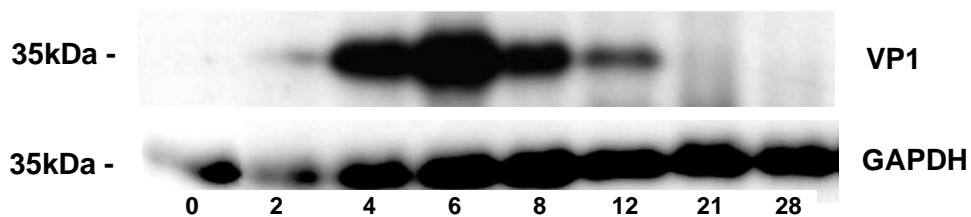


**Abbildung 14** - ISH von Gewebeschnitten muriner Herzen im Verlauf einer CVB3 Infektion an Tag 0 pi (A), Tag 2 pi (B), Tag 4 pi (C), Tag 6 pi (D), Tag 8 pi (E), Tag 12 pi (F), Tag 21 pi (G) und Tag 28 pi (H). Mittels *in situ* Hybridisierung wurde CVB3 RNA autoradiographisch nachgewiesen, erkennbar als schwarze Silberkörner. (Vergrößerung x200), n=7 pro Zeitpunkt.

### 3.5 Nachweis von viralem Kapsidprotein CVB3 VP1

#### 3.5.1 Western Blot Hybridisierung

Western Blot Analysen wurden zum semiquantitativen Nachweis des viralen Kapsidproteins VP1 mit Hilfe des CVB3 VP1 spezifischen Antikörpers (Cox mAB31A2, Mediagnost, Reutlingen) durchgeführt (Abbildung 15). Dabei wurden murine Herzen und Milzen im Verlauf der Infektion untersucht (n=7 für Tag 2, 4, 6, 8, 12 pi; n=5 für Tag 21, 28 pi). Pankreas stand auf Grund der geringen Menge an Material nach den vorausgegangenen Untersuchungen hierfür nicht mehr zur Verfügung.

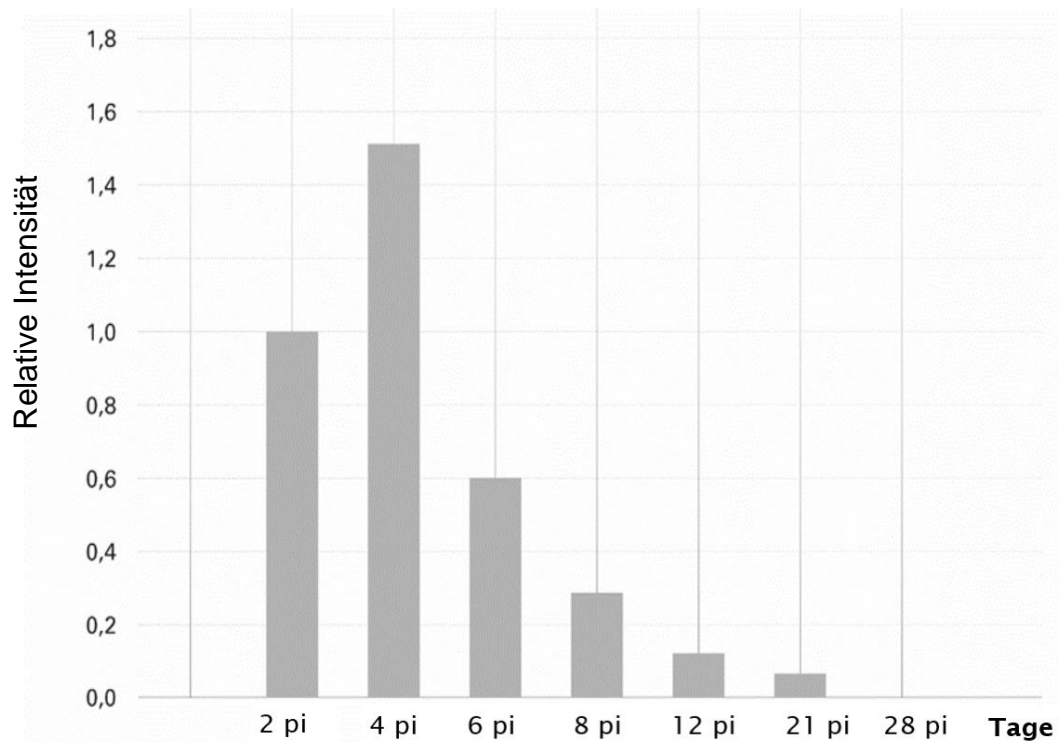


**Abbildung 15** – Exemplarische Western Blot Analyse zum Nachweis von VP1 in einzelnen Herzen CVB3-infizierter Mäuse (obere Reihe) und GAPDH (untere Reihe) als Ladekontrolle. Auf der X-Achse sind die Tage pi markiert. (n=7 für Tag 2, 4, 6, 8, 12 pi; n=5 für Tag 21, 28 pi).

Zur quantitativen Darstellung des VP1 Proteins wurde das Protein Aktin als Ladekontrolle verwendet, welches mit der Menge an Zellmaterial korreliert. Der Quotient  $I_R$  (relative Intensität) aus den Zahlenwerten der Signale von VP1 und den Zahlenwerten der Signale von Aktin entspricht dem Verhältnis der Menge an vorhandenem Virusprotein VP1 im Verhältnis zur Menge an Zellmaterial. Zur geeigneteren Darstellung der Ergebnisse wurde der Quotient aus relativer Intensität des jeweiligen Erhebungszeitpunktes und  $I_R$  des ersten Erhebungszeitpunktes gebildet (sog. „relative densitometric score“, RDS).

In den Milzen (Abbildung 16) zeigte sich an Tag 2 pi ein RDS von 1. An Tag 4 pi lag der RDS bei 1,56 (das heißt, auf eine Signalintensität von 156% im Vergleich zum ersten Erhebungszeitpunkt an Tag 2 pi). Sechs Tage pi fiel der RDS auf 0,59, am 8. Tag pi auf 0,28, an Tag 12 pi auf 0,12 und an Tag 21 pi auf nur 0,05. Am Tag 28 pi war kein Nachweis von VP1 möglich.

## Western Blots zum Nachweis des viralen Kapsidproteins von VP1 in der Milz

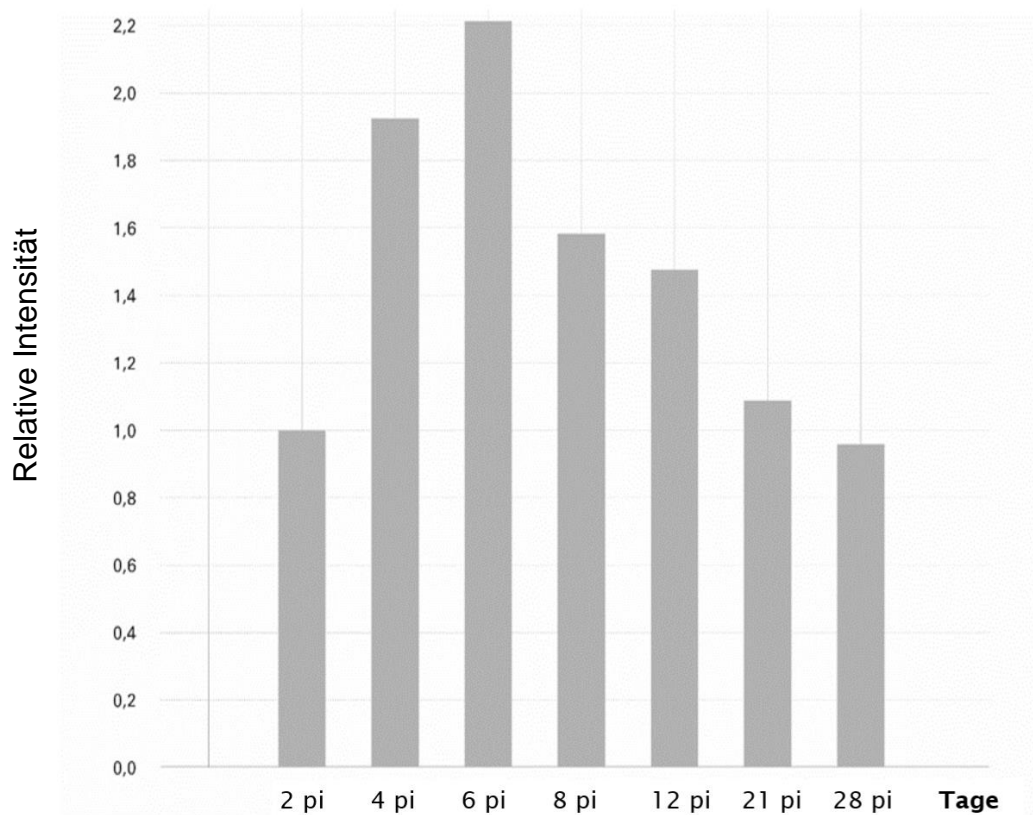


**Abbildung 16** – Graphische Darstellung der Ergebnisse der Western Blot Analyse der Milzen. Die X-Achse zeigt den Zeitpunkt (Tage nach Infektion), die Y-Achse die relative Intensität der Belichtung bei Cox mAB 31A2 Primärantikörpern gegen die Belichtung bei Aktin-Antikörpern, bezogen auf das Signal zum ersten Erhebungszeitpunkt (n=7 für Tag 2, 4, 6, 8, 12 pi; n=5 für Tag 21, 28 pi).

Im Myokard (Abbildung 17) war an Tag 2 pi ein RDS von 1,0 zu erkennen. An Tag 4 pi war ein RDS von 1,9, an Tag 6 pi 2,21, an Tag 8 pi 1,59, an Tag 12 pi 1,5, an Tag 21 pi 1,12 und an Tag 28 pi war VP1 nicht mehr verlässlich nachweisbar.



## Western Blots zum Nachweis des viralen Kapsidproteins von VP1 im Myokard



**Abbildung 17** – Graphische Darstellung der Ergebnisse der Western Blot Analyse der Herzen. Die X-Achse beschreibt die Anzahl der Tage nach Infektion, die Y-Achse (auf den Wertebereich 1,0-2,4 betont) die relative Intensität der Belichtung bei COX mAB, 31A2 Primärantikörpern gegen die Belichtung bei Anti-Aktin-Antikörpern, bezogen auf die Belichtung zum ersten Erhebungszeitpunkt. (n=7 für Tag 2, 4, 6, 8, 12 pi; n=5 für Tag 21, 28 pi)

### 3.5.2 Immunfluoreszenzfärbung

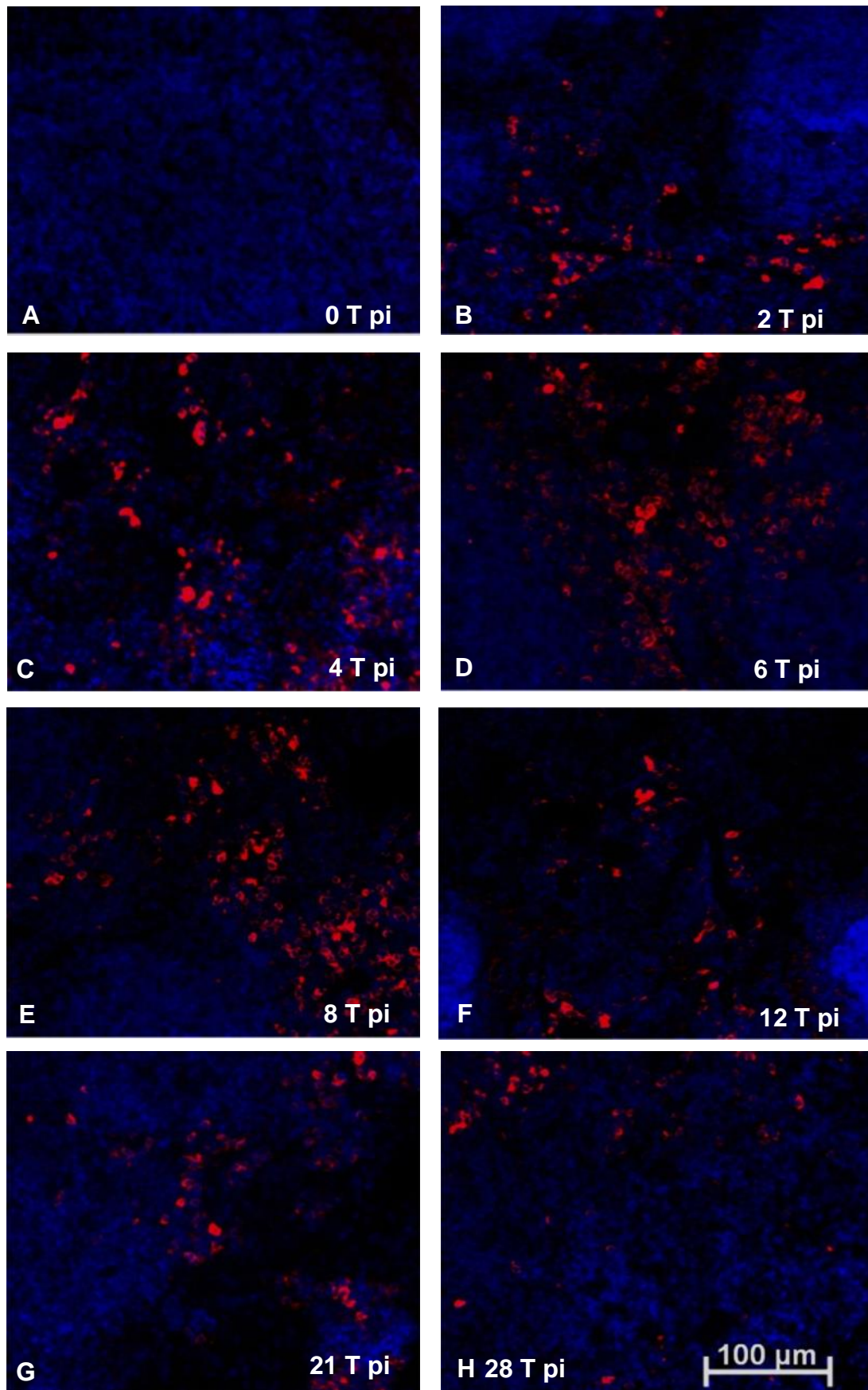
Da in der Forschung häufig Immunfluoreszenzfärbungen zum Nachweis viraler Proteine zum Einsatz kommen, wurden hier Paraffinschnitte von Milzen, Pankreata und Herzen CVB3-infizierter Mäuse im Verlauf der Infektion nach Immunfluoreszenzfärbung von CVB3 VP1 mittels des Cox mAB31A2 untersucht und miteinander verglichen. Zellen, die virales VP1 enthalten, stellen sich leuchtend rot dar. Zellkerne erschienen durch DAPI-Färbung blau.

In den Milzen war an Tag 0 pi (Abbildung 18A) wie erwartet kein VP1 detektierbar. An Tag 2 pi (Abbildung 18B) wurde VP1 in einigen Zellen detektiert. An Tag 4 pi

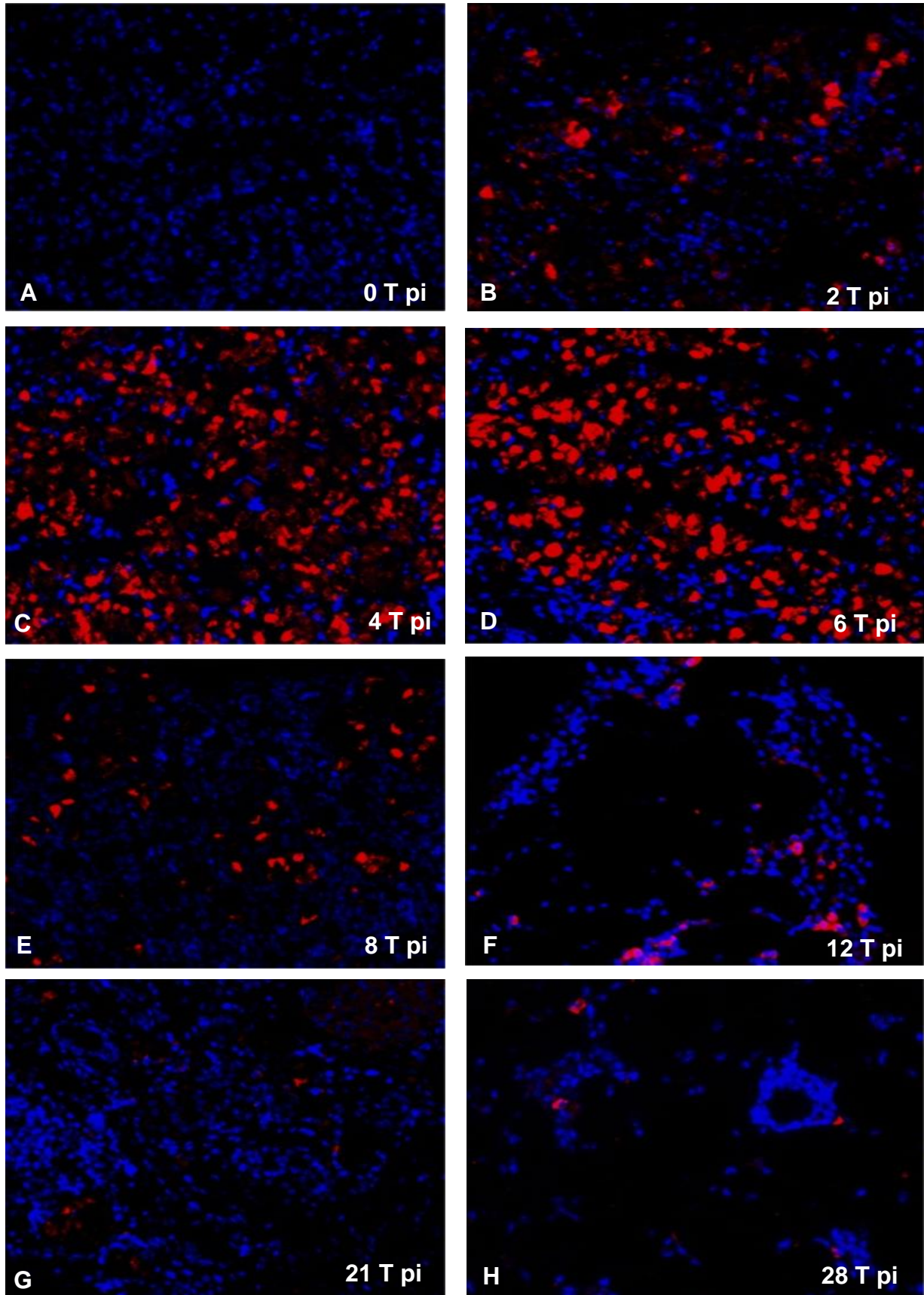
(Abbildung 18C) fand sich eine Zunahme viruspositiver Zellen und ein Maximum im Verlauf der Infektion. An Tag 6 pi (Abbildung 18D) und Tag 8 pi (Abbildung 18E) wurden geringfügig weniger VP1 positive Zellen gefunden. Zwölf Tage pi (Abbildung 18F) waren VP1 positive Zellen deutlich reduziert. Die Anzahl infizierter Zellen war bis 21 Tage pi (Abbildung 18G) konstant. 28 Tage pi (Abbildung 18H) konnten noch einzelne VP1 positive Zellen nachgewiesen werden.

In den murinen Pankreata fanden sich an Tag 0 pi (Abbildung 19A), wie erwartet, keine VP1 positive Zellen. An Tag 2 pi (Abbildung 19B) konnten in ungefähr einem Drittel der beobachteten Zellen VP1 nachgewiesen werden. An Tag 4 pi (Abbildung 19C) waren ungefähr die Hälfte aller Zellen viruspositiv. An Tag 6 pi (Abbildung 19D) wurden geringfügig weniger VP1-positive Zellen beobachtet. Acht (Abbildung 19E) und 12 Tage pi (Abbildung 19F) zeigten sich deutlich weniger CVB3-infizierte Zellen. An Tag 21 pi (Abbildung 19G) und Tag 28 pi (Abbildung 19H) wurden nur noch vereinzelte VP1 Signale beobachtet.

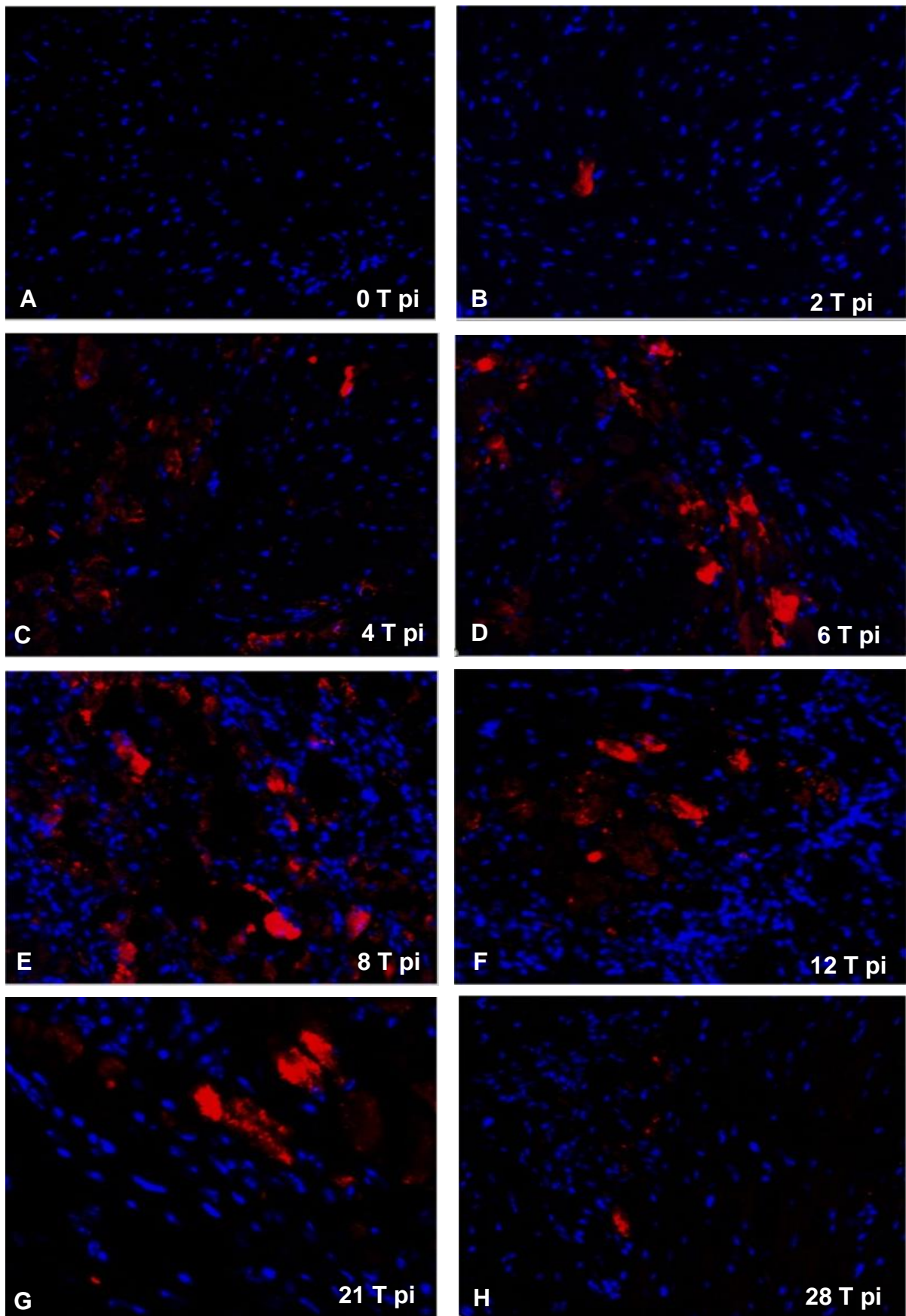
Im Myokard war erwartungsgemäß an Tag 0 pi (Abbildung 20A) kein VP1 nachweisbar. An Tag 2 pi (Abbildung 20B) wurden einzelne infizierte Zellen beobachtet. An Tag 4 pi (Abbildung 20C) fanden sich einige Herde mit viruspositiven Zellen mit enger topographischer Beziehung. An Tag 6 pi (Abbildung 20D) wurde eine weitere Zunahme der Anzahl VP1-positiver Zellen verzeichnet, die am achten Tag pi (Abbildung 19E) das Maximum erreichte. An Tag 12 pi (Abbildung 20F) war die Anzahl VP1 positiver Zellen rückläufig. An Tag 21 pi (Abbildung 20G) und an Tag 28 pi (Abbildung 20H) konnte VP1 noch in einzelnen Zellen nachgewiesen werden.



**Abbildung 18:** Gewebeschnitte muriner Milzen, die mit Immunfluoreszenz auf VP1 (rote Signale) untersucht wurden. Die blauen Signale entsprechen DAPI-gefärbten Zellkernen. (Vergrößerung x200), n=7 pro Zeitpunkt.



**Abbildung 19:** Gewebeschnitte muriner Pankreata, die mit Immunfluoreszenz auf VP1 (rote Signale) untersucht wurden. Die blauen Signale entsprechen DAPI-gefärbten Zellkernen. (Vergrößerung x200), n=7 pro Zeitpunkt.



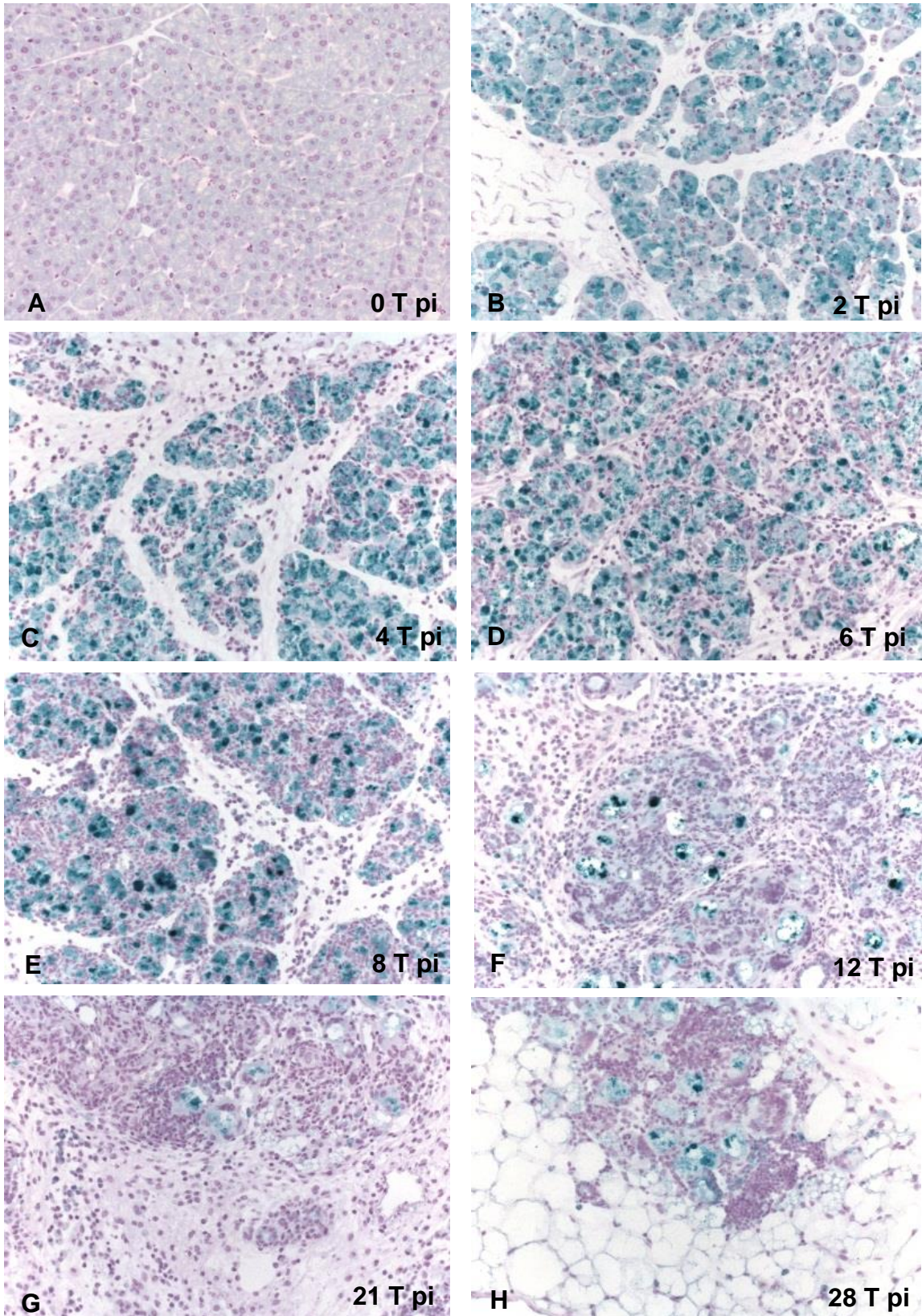
**Abbildung 20:** Gewebeschnitte muriner Herzen, die mit Immunfluoreszenz auf VP1 (rote Signale) untersucht wurden. Die blauen Signale entsprechen DAPI-gefärbten Zellkernen. (Vergrößerung x200), n=7 pro Zeitpunkt.

### 3.5.3 Immunhistologie

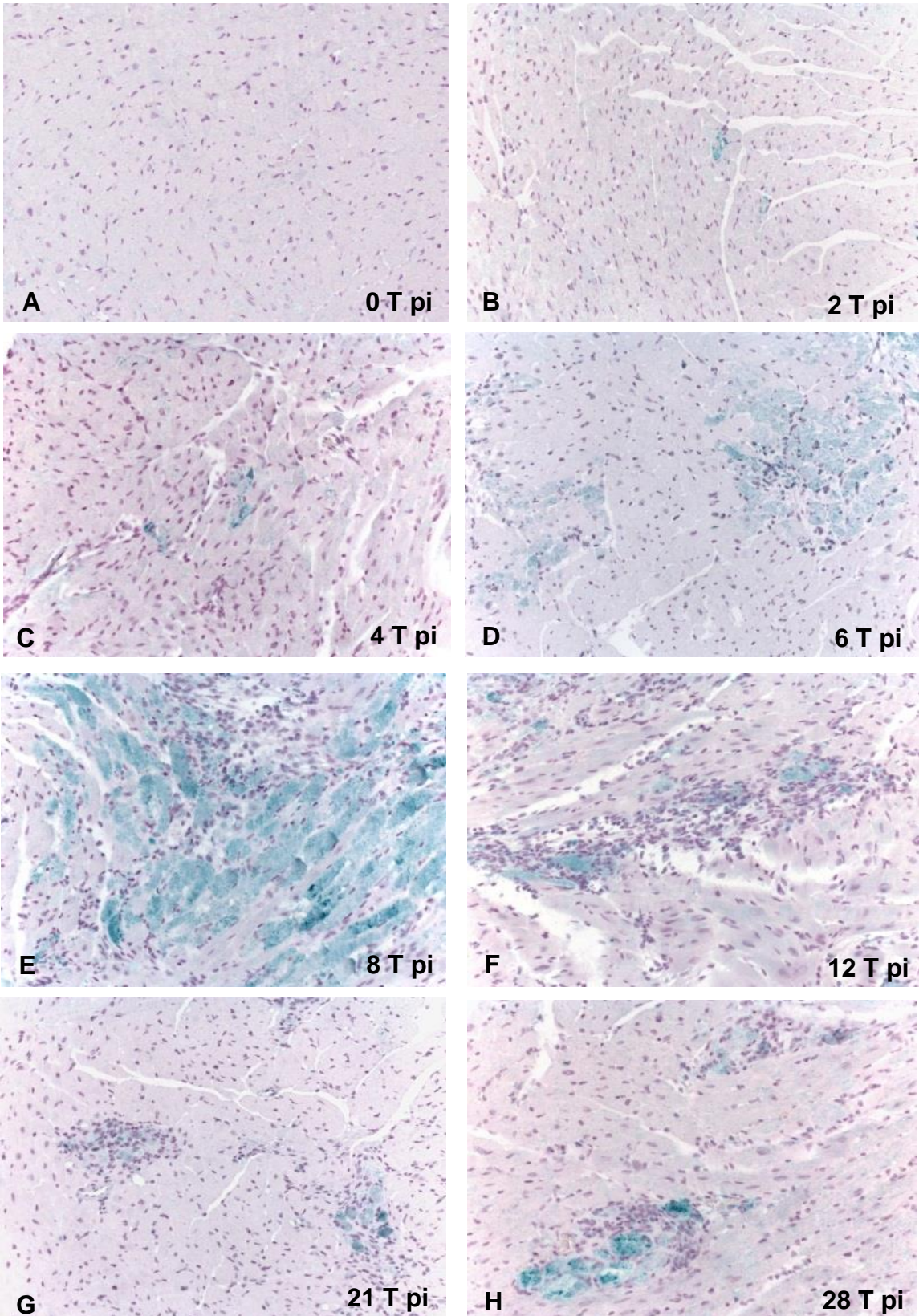
Murine Pankreata und Herzen wurden hinsichtlich Lokalisation und Menge von CVB3 VP1 mittels Immunhistologie untersucht. Das virale Protein stellt sich türkisgrün dar. Das Gewebe wurde mit H.E. gegengefärbt.

In den Pankreata zeigte sich an Tag 0 pi (Abbildung 21A) eine regelrechte Gewebestruktur ohne Nachweis von VP1. An Tag 2 pi (Abbildung 21B) war VP1 in nahezu allen Zellen des exokrinen Pankreas nachweisbar. Am 4. Tag pi (Abbildung 21C) und am 6. Tag pi (Abbildung 21D) war eine weitere Zunahme der Intensität an VP1 positiven Signalen zu erkennen. Im weiteren Verlauf der Infektion (Tag 8 pi, (Abbildung 21E), Tag 12 pi (Abbildung 21F) und Tag 21 pi (Abbildung 21G)) war die Menge an VP1 rückläufig. An Tag 28 pi (Abbildung 21H) war VP1 nur noch in sehr wenigen Zellen detektierbar.

In den Herzen zeigte sich an Tag 0 pi (Abbildung 22A) eine regelhafte Organstruktur ohne Nachweis von VP1. An Tag 2 pi (Abbildung 22B) wurde VP1 in einzelnen Myozyten nachgewiesen. An Tag 4 pi (Abbildung 22C) waren vergleichsweise mehr VP1-positive Myozyten detektierbar. Es wurden sowohl mehr einzelne Signale, als auch eine Größenzunahme der Herde (mehr benachbarte VP1-positive Zellen) beobachtet. An Tag 6 pi (Abbildung 22D) wurde eine deutliche Zunahme an VP1-positiven Zellen mit herdförmiger Ausbreitung im Sinne der Zell-zu-Zell Ausbreitung der Virusinfektion verzeichnet. An Tag 8 pi (Abbildung 22E) war das Maximum an konfluierenden VP1-positiven Zellherden zu finden. An Tag 12 pi (Abbildung 22F) wurde deutlich weniger VP1 in einzelnen Myozyten nachgewiesen. An Tagen 21 pi (Abbildung 22G) und 28 pi (Abbildung 22H) war VP1 nur in einzelnen Zellen vorzufinden.



**Abbildung 21:** Gewebeschnitte muriner Pankreata, die mittels Immunhistochemie auf die Lokalisation von VP1 (türkisblaue Färbung) untersucht wurden. Zur Darstellung des Gewebes wurde eine H.E.-Färbung angewandt. (Vergrößerung x200), n=7 pro Zeitpunkt.



**Abbildung 22:** Gewebeschnitte muriner Herzen, die mittels Immunhistochemie auf die Lokalisation von VP1 (türkisblaue Färbung) untersucht wurden. Zur Darstellung des Gewebes wurde eine H.E.-Färbung angewandt. (Vergrößerung x200), n=7 pro Zeitpunkt.



#### **4. Diskussion**

Die hier beschriebenen Versuchsreihen wurden zur Beantwortung der Fragestellung durchgeführt, welche virologischen, molekularpathologischen und immunhistologischen Methoden sich am besten zum Nachweis von CVB3 in Abhängigkeit vom Untersuchungszeitpunkt und Organ hinsichtlich Sensitivität und Spezifität eignen. Ziel dieser Arbeit war ferner, die jeweiligen Vor- und Nachteile der Verfahren zu benennen, mögliche Erklärungsansätze für Diskrepanzen aufzuzeigen und daraus konkrete Empfehlungen für den Einsatz der jeweiligen Methode für die enterovirale Diagnostik abzuleiten.

Hierbei muss betont werden, dass die Interpretation der Ergebnisse zum Nachweis von Virionen, viraler Nukleinsäuren und Proteine auf dem Hintergrund der histologischen und immunhistologischen Untersuchungen in den Organen erfolgen muss.

In Zusammenschau der Ergebnisse ist festzuhalten, dass ein Virusnachweis prinzipiell mit *allen* eingesetzten Methoden möglich ist. Die Nachweismethoden unterscheiden sich jedoch hinsichtlich ihrer Sensitivität, welche von der Art des detektierten Erregermaterials (Virionen, Nukleinsäuren, Protein), dem Erhebungszeitpunkt und dem jeweiligen Organ abhängt. Als Gründe für Unterschiede zwischen der Sensitivität der einzelnen Methoden sind intrinsische und extrinsische Faktoren zu unterscheiden:

- 1.) Unter „intrinsischen Faktoren“ ist zu verstehen, dass im Verlauf der Infektion unterschiedliche Mengen an Erregermaterial vorliegen. Es finden sich veränderliche Anteile an RNA, Proteinen und Nachkommenviren. Somit sind beispielsweise Untersuchungen mittels *in situ* Hybridisierung in jenen Erkrankungsphasen, in welchen Nukleinsäuren in vergleichsweise großer Menge vorliegt, gegenüber Protein-Nachweismethoden überlegen. Analog dazu wären Untersuchungen mittels Western Blots in jenen Krankheitsphasen durch eine besonders schlechte Sensitivität gekennzeichnet, in denen nur wenig virales Protein vorliegt.

2.) Unter „extrinsischen Faktoren“ sind technische und menschliche Einflussgrößen zu verstehen. Dazu zählen menschliche Fehler, Bindungsaffinitäten eingesetzter Antikörper, Aufnahmekapazitäten von Detektionsgeräten und Unterschiede in der Probengewinnung und -aufbereitung.

### ***Histologische und immunhistologische Untersuchungen zum Nachweis der Schädigung und Inflammation des Gewebes infolge einer CBV3 Infektion***

Gewebeschnitte von Milz, Pankreas und Herzen wurden mit H.E.-Färbungen auf Zeichen von Nekrose, Fibrose und von Entzündungszellen hin untersucht. In der Milz zeigte sich eine Hyperplasie der Lymphfollikel bereits ab Tag 2 pi. Die ersten Nekrosen zeigten sich im Pankreas 2 Tage pi. Im Pankreas war eine nahezu vollständige Gewebedestruktion (fettige Nekrose) zu beobachten, wobei das endokrine Pankreas nicht betroffen war. Im Myokard wurden ab Tag 4 pi progrediente Koagulationsnekrosen und entzündliche Infiltrate festgestellt.

Es handelt sich bei der H.E.-Färbung um eine ubiquitär verfügbare und kostengünstige Methode, die als Screening-Verfahren eingesetzt werden kann, um Versuchstiere mit entzündlichen/nekrotischen Organveränderungen zu identifizieren.

Die Histologie zum Nachweis einer CVB3 Infektion ist jedoch durch erhebliche Nachteile gekennzeichnet: Die Darstellung von Entzündungszeichen oder Zelluntergang erlaubt keine sichere ätiologische Zuordnung. Auch das Ausmaß der Gewebedestruktion und Inflammation korreliert nicht unmittelbar mit der viralen Replikation (Mahfoud et al., 2011). Zudem geht eine Virusinfektion nicht immer mit histologischen Veränderungen einher, die eindeutig in einer H.E.-Färbung sichtbar gemacht werden. Es wurde gezeigt, dass Enteroviren mit RT-PCR im Myokard bei Patienten mit klinischem Verdacht auf eine Myokarditis auch in Fällen nachgewiesen werden konnte, in denen die histologischen Kriterien einer Myokarditis mittels H.E.-Färbung nicht erfüllt waren (Martin et al., 1994).

Trotz Bestrebungen einer operationalisierten H.E.-Diagnostik (siehe „Dallas-Kriterien“, Einleitung) zeigen Studien weiterhin eine hohe untersucherabhängige Variation (Shanes et al., 1987), welche auf den Interpretationsspielraum bei der Begutachtung von H.E.-gefärbten Gewebeschnitten zurückzuführen ist.

Ferner induzieren kardiovirulente CVB3-Stämme im Mausmodell zunächst eine Pankreatitis und erst im späteren Verlauf eine Myokarditis (Tracy, 2000). Dieser intrinsische Faktor bedingt, dass Untersuchungen von H.E.-Schnitten des Pankreas im sehr frühen Krankheitsverlauf (Tag 2 pi) eine deutlich höhere Sensitivität aufweisen als H.E.-basierte Untersuchungen anderer Organe.

### ***Immunhistochemischer Nachweis von Makrophagen und T-Zellen***

Murine Herzen wurden auf die Präsenz von Mac3-positiven Makrophagen und CD3-positiven Lymphozyten untersucht. Makrophagen waren ab Tag 4 pi bis Tag 28 pi nachweisbar. Lymphozyten waren ab Tag 8 bis Tag 28 pi in signifikant erhöhter Anzahl zu finden. Wie hier bestätigt werden konnte, stellen Mac3-positive Makrophagen den größten Anteil des Infiltrats dar (Klingel et al., 1992). Auch beim Menschen machen Makrophagen den größten Teil des Infiltrates aus (Cioc et al., 2002). Dennoch müssen auch immer T-Zellen immunhistologisch dargestellt werden, um im Vorfeld eine virale von einer bakteriellen Infektion abzugrenzen.

Immunhistochemische Markierungen von Immunzellen weisen eine höhere Sensitivität zum Nachweis einer Myokarditis im Vergleich zu einer H.E.-Färbung auf (Mahfoud et al., 2011). Sie sind jedoch durch einen erheblich höheren Aufwand und Kosten gekennzeichnet und ermöglichen ebenfalls keine spezifische ätiologische Zuordnung.

### ***Vergleich viraler Nachweismethoden im Serum***

Serumproben der Versuchstiere wurden unter Nutzung von Plaquetests und RT-PCR auf das Vorhandensein von Nachkommenviren und viraler RNA untersucht. Der Nachweis von Virionen und RNA Genomen gelang im Serum beider Untersuchungsmethoden nur an Tag 2 pi. Diese Beobachtung ist auf eine nur kurze Phase der Virämie im Rahmen der akuten Infektion zurückzuführen. Die Dauer der Virämie ist von der Virulenz eingesetzter Virusstämme abhängig (Tracy, 2000). Während die Virämiephase im Mausmodell auf wenige Tage beschränkt ist, kann CVB3 im Serum von Makakken noch an Tag 30 pi nachgewiesen werden (Han et al., 2013), was auf eine Abhängigkeit vom jeweiligen Wirtsorganismus hinweist.

Die kurze Dauer der Virämie ist vermutlich maßgeblich durch eine hohe Bindungsaffinität der Virionen gegenüber endothelialer Rezeptoren und der daraus resultierenden hämatogenen Aussaat bedingt (Lyden et al., 1987). Auch

neutralisierende Antikörper, die bereits an Tag 4 pi gebildet werden, tragen zur kurzen Dauer der Virämie bei (Tomioka et al., 1986). Gleichwohl korrelieren Serumantikörper nicht mit dem Nachweis viraler Nukleinsäuren im Myokard und eignen sich somit nicht zu diagnostischen Zwecken (Mahfoud et al., 2011).

### ***Vergleich viraler Nachweismethoden in Milzen***

Murine Milzen wurden mit Plaquetests, RT-PCR, *in situ* Hybridisierung, Western Blot Hybridisierung und Immunfluoreszenz auf CVB3 untersucht. Mittels Plaquetests konnten replikationsfähige Virionen an Tag 2 pi und in deutlich geringerer Menge an Tag 4 pi nachgewiesen werden. Zu späteren Zeitpunkten war mit dieser Methode kein Virusnachweis mehr möglich.

Ein Nachweis von viraler Nukleinsäure war mit RT-PCR sowie mittels *in situ* Hybridisierung bis Tag 21 pi möglich. Virale Proteine wurden mit Western Blot Hybridisierung bis Tag 21 pi nachgewiesen. Mit Immunfluoreszenz war ein Nachweis auch noch an Tag 28 pi möglich.

Die Persistenz viraler Proteine bei zugleich raschem Abbau replikationsfähiger Virionen ist Ausdruck der immunologischen Funktion des lymphatischen Gewebes mit Präsentation viraler Antigene im Lymphfollikel.

### ***Vergleich viraler Nachweismethoden in Pankreata***

Die Pankreata wurden mit Plaquetests, RT-PCR, *in situ* Hybridisierung, Immunfluoreszenz und Immunhistologie auf virale Bestandteile hin untersucht. Replikationsfähige Nachkommenviren waren bis 8 Tage pi mittels Plaquetests nachweisbar. Nukleinsäuren konnten mit RT-PCR und *in situ* Hybridisierung bis zum letzten Erhebungszeitpunkt (Tag 28 pi) nachgewiesen werden. Das Kapsidprotein VP1 wurde mit Immunfluoreszenz und Immunhistochemie bis 28 Tage pi nachgewiesen.

Während replikationsfähige Virionen nur kurz nach der Infektion nachweisbar sind, ist mit H.E.-Färbungen ein ausgedehnter Gewebeuntergang mit zeitlicher Verzögerung und längerer Dauer feststellbar. Diese Diskrepanz ist am ehesten darauf zurückzuführen, dass virusinduzierte Zellyse selbst zur Freisetzung autodigestiver Enzyme führt, welche wiederum eine eigenständige Noxe darstellen. Das Ausmaß und die Regenerationsfähigkeit des Organs scheint maßgeblich vom eingesetzten Mausstamm abzuhängen (Hall et al., 2016). Zudem ist es auch möglich, dass eine

Viruspersistenz zu einer chronischen Entzündung führt oder dass das Vorhandensein viraler Bestandteile zu einer Störung der Zellfunktion beiträgt (Chapman et al., 2008). Für letzteres spricht auch, dass in der vorliegenden Studie Virusprotein und virale RNA auch zum letzten Erhebungszeitpunkt festgestellt werden konnten.

### ***Vergleich viraler Nachweismethoden in den Herzen***

Murine Herzen wurden mittels Plaquetests, RT-PCR, *in situ* Hybridisierung, Western Blot Hybridisierung, Immunfluoreszenz und Immunhistologie auf das Vorhandensein von Virionen, viraler RNA und viraler Proteine hin untersucht. Mit Hilfe von Plaquetests wurden replikationsfähige Virionen bis 12 Tage pi und damit länger als in allen anderen untersuchten Organen nachgewiesen. Virale RNA wurde mit RT-PCR und *in situ* Hybridisierung bis zum letzten Erhebungszeitpunkt (Tag 28 pi) detektiert. Virusprotein war mittels Western Blots bis 12 Tage pi nachweisbar, an 21 und 28 Tagen pi war VP1 nicht mehr verlässlich nachweisbar. Mit Immunfluoreszenz und Immunhistochemie war ein Nachweis viraler Proteine bis 28 Tage pi im Myokard möglich.

In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass CVB3 im Myokard auch über den Zeitraum der akuten Infektion hinaus persistiert (Klingel et al., 1996; Reetoo et al., 2000).

Untersuchungen der Viruskinetik zeigen, dass virale RNA von allen untersuchten Organen am längsten im Myokard nachweisbar ist (Reetoo et al., 2000). Dabei zeichnet sich ein biphasischer Verlauf ab, in welchem zunächst rasch replikationsfähige Virionen durch das Immunsystem des Wirtsorganismus abgebaut werden – der Abbau residualer RNA jedoch erheblich länger andauert (Klingel et al., 1992). Diese Beobachtung entspricht auch den Ergebnissen der vorliegenden Studie.

### ***Plaquetests zum Nachweis replikationsfähiger Virionen***

Mittels Plaquetests war ein Virusnachweis an Tag 2 pi im Serum, bis Tag 4 pi in der Milz, Tag 8 pi im Pankreas und bis Tag 12 pi im Herz möglich. Die unterschiedliche Dauer der Persistenz von Virionen in den einzelnen Organen ist am ehesten auf Unterschiede in der Clearance der Virionen nach Virämie und auf den Organtropismus zurückzuführen (Klingel et al., 1996). Außerdem beeinflusst die Auswahl des Zelltyps der Plaquetests das Replikationsverhalten des Virus (Tracy, 2000). Da Plaquetests ausschließlich intakte replikationsfähige Virionen nachweisen, ist die Sensitivität zu

späteren Erhebungszeitpunkten vermindert. Zudem ist hier die Effektivität des adaptiven Immunsystems des Wirtsorganismus für die Dauer des Nachweises intakter Virionen von Bedeutung, beispielsweise durch die genannte Produktion neutralisierender Antikörper (Cammock et al., 2013). Die Höhe der festgestellten Virustiter hängt auch vom eingesetzten Virusstamm ab, korreliert jedoch nicht mit dessen Virulenz (Tracy, 2000).

Untersuchungen am Menschen deuten darauf hin, dass die Menge an detektierten Virionen mit der klinischen Schwere der Infektion korreliert (Yen et al., 2007). Ferner ist es naheliegend, dass die Menge an Virionen die Kontagiosität maßgeblich beeinflusst und dessen Kenntnis somit zur Beantwortung epidemiologischer Fragestellungen bedeutsam ist.

Im Vergleich mit allen anderen hier angewandten Untersuchungsmethoden weisen Plaquetests eine geringe Sensitivität auf. Der Virusnachweis gelingt nur bei Vorliegen replikationsfähiger Virionen und somit nur zu frühen Phasen der Infektion.

### ***RT-PCR zum Nachweis viraler RNA***

Mit RT-PCR war CVB3 im Serum ausschließlich an Tag 2 pi nachweisbar. In der Milz konnte virale RNA bis Tag 21 pi, in Herz und Pankreas bis Tag 28 pi nachgewiesen werden. Prinzipiell ist es möglich, sowohl virale Plus- als auch Minusstrang RNA durch RT-PCR nachzuweisen. In dieser Arbeit wurde ausschließlich virale Plusstrang RNA detektiert, da diese zu jedem Zeitpunkt der Infektion vorhanden ist. Virale Minusstrang RNA liegt auf Grund der asymmetrischen Replikation des Virus im Verlauf der Infektion in unterschiedlicher Menge vor (Klingel et al., 1996).

Es wurde gezeigt, dass die Dauer der Persistenz viraler RNA nicht mit der initialen Menge an detektierter Virus RNA korreliert (Reetoo et al., 2000).

Im Vergleich zu allen anderen Untersuchungen ist die RT-PCR durch einen hohen Grad an Sensitivität und Automatisierung und daher hoher Reliabilität gekennzeichnet. Die numerischen Ergebnisse unterliegen keiner weiteren Interpretation, was eine hohe Objektivität bedingt. Der Arbeitsaufwand ist gegenüber *in situ* Hybridisierungen geringer. Die Methode ist zum quantitativen Nachweis viraler Nukleinsäuren geeignet. Fragestellungen, die Angaben zur Lokalisation viraler RNA erfordern, können mit dieser Methode nicht beantwortet werden.

### ***In situ Hybridisierung zur Lokalisation viraler RNA***

Mittels *in situ* Hybridisierung war ein Nachweis viraler Nukleinsäuren im Serum an Tag 2 pi, in Milz bis Tag 21 pi und in Herz und Pankreas bis Tag 28 pi möglich. Die Sensitivität entspricht daher derjenigen der RT-PCR. Der Arbeitsaufwand der *in situ* Hybridisierung ist deutlich höher als der einer RT-PCR bei vergleichbarer Sensitivität. Auch durch ISH kann sowohl virale Plus- als auch Minusstrang RNA dargestellt werden (Hohenadl et al., 1991; Klingel et al., 1992).

Vorteil der *in situ* Hybridisierung gegenüber der RT-PCR sind Erkenntnisse über die Lokalisation der viralen RNA und deren Zuordnung zu spezifischen Zelltypen, was insbesondere für Untersuchungen bezüglich von Pathogenesemechanismen relevant ist (Klingel et al., 1996).

### ***Western Blot Hybridisierung (WB) zum Nachweis viraler Proteine***

Mit Western Blot Hybridisierung war das CVB3 Kapsidprotein VP1 mit einem sehr spezifischen und sensitiven Antikörper (Ettischer-Schmid et al., 2016) in der Milz bis Tag 8 pi in hoher Menge, bis Tag 21 pi in sehr geringer Menge nachweisbar. Im Myokard war VP1 während der akuten Infektion in hoher Menge, an Tag 21 und 28 pi nicht mehr verlässlich nachweisbar. Grundsätzlich sind beim WB als extrinsische Einflussgrößen die Aufbereitung der Proben sowie die Bindungsaffinität eingesetzter Antikörper und Belichtungszeit zu nennen. Als intrinsische Faktoren sind die geringen Mengen an produziertem VP1 zu späteren Zeitpunkten der Infektion zu beachten sowie der Einfluss des Immunsystems des Wirtsorganismus, welche die Neutralisation viraler Proteine bewirkt, die dann nicht mehr nachweisbar sind.

Die Sensitivität der Western Blot Methode zum Nachweis von VP1 ist zu späten Erkrankungszeitpunkten deutlich geringer als Immunfluoreszenz und Immunhistologie. Die Methode liefert auch keine Information hinsichtlich der Lokalisation viraler Proteine.

### ***Immunfluoreszenz zum Nachweise viraler Proteine im Schnittpräparat***

Mit Immunfluoreszenz ist ein Nachweis von CVB3 VP1 in allen untersuchten Organen ab Tag 2 pi bis Tag 28 pi möglich (Ettischer-Schmid et al., 2016). Die intrinsischen Einflussgrößen sind identisch zu jenen der Western Blot Hybridisierung (s.o.). Zwar kann die Verteilung und Menge von VP1 mit Immunfluoreszenz dargestellt werden, aber eine Zuordnung zu Gewebestrukturen und Zelltypen ist hierbei nicht möglich.

### ***Immunhistologie zum Nachweise viraler Proteine im Schnittpräparat***

Mit Immunhistologie sind virale Proteine in allen untersuchten Organen ab Tag 2 pi bis zum 28. Tag pi nachweisbar, in Bestätigung der Ergebnisse von Klingel et al., 1996. Die intrinsischen Einflussgrößen sind mit jenen der Western Blot Hybridisierung und Immunfluoreszenz (s.o.) vergleichbar. Vorteil dieser Methode ist, dass eine genaue Lokalisierung der gesuchten viralen Antigene möglich ist. Somit können Verteilungsmuster infizierter Zellen sowie die viruspositiven Zelltypen identifiziert werden.

### ***Limitationen***

Die hier vorliegende Studie hatte zum Ziel im Mausmodell der CVB3 Myokarditis verschiedene Methoden zu vergleichen, welche in der Virologie/Pathologie/Kardiologie eingesetzt werden, um eine Virusinfektion bzw. deren Folgen (Schädigung der Organe) nachzuweisen. Hierbei wurden Methoden zur Detektion von Virionen (Plaquetests), viraler RNA (RT-PCR, radioaktive in situ Hybridisierung) und viraler Proteine (Western Blots, Immunfluoreszenz, Immunhistochemie) untersucht. Die Schädigung/Inflammation der Organe wurde mittels HE Färbung und immunhistochemischen Färbungen zur Lokalisation von T-Zellen und Makrophagen belegt.

Insbesondere sollte in der Arbeit der maximale Zeitpunkt (Endpunkt) ermittelt werden, bei dem nach intraperitonealer Inokulation von CVB3 noch infektiöse Virionen, virale RNA und virale Proteine in den wichtigsten Organen (Herz, Pankreas und Milz) noch nachweisbar sind. Das Mausmodell der CVB3 Infektion ist ein seit langem etabliertes System, das sich durch eine geringe Varianz der Infektionsmuster zu einem bestimmten Zeitpunkt der Infektion auszeichnet (Klingel et al, 1992). Daher wurden in den Untersuchungen meist nur sieben Proben pro Zeitpunkt verglichen, da der Verlauf der Infektion und deren Schädigungsmuster prinzipiell schon lange bekannt sind. Eine statistische Auswertung innerhalb der Gruppen bzw. zwischen den Zeitpunkten nach Infektion war für die Beantwortung der Fragestellung nicht relevant und wurde daher auch nicht durchgeführt. Diese Studie kann daher nicht herangezogen werden, um genaue quantitative Vorhersagen hinsichtlich der Viruskinetik im Tierversuch anzuwenden. Zur Beantwortung dieser Fragestellung erreichen die hier erhobenen Daten nicht das geforderte Signifikanzniveau.



Die vorliegende Studie beantwortet jedoch die eingangs gestellte Frage, welche Untersuchungsmethoden im Zuge der Virusinfektion und der technischen Limitationen der jeweiligen Methode qualitativ zu welchem Untersuchungszeitpunkt sinnvollerweise angewandt werden können. Sie unterstreicht zudem die Bedeutung der Unterscheidung der jeweiligen Virusbestandteile (infektiöse Virionen, virale Nukleinsäure, virales Kapsidprotein) bei Fragestellungen hinsichtlich eines „Virusnachweises“ in den untersuchten Organen, was auch für Untersuchungen in menschlichen Proben von großer Relevanz ist.

### ***Zusammenfassende Empfehlungen für die Diagnose der CVB3 Infektion***

Die Kenntnis der viralen Kinetik von CVB3 im Mausmodell ist bei der Wahl einer geeigneten Nachweismethode unerlässlich, da die gesuchten Zielstrukturen (virale RNA und Proteine) zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Infektion in unterschiedlicher Menge vorliegen. Nach der intraperitonealen Inokulation erfolgt die systemische Ausbreitung des Virus zunächst hämatogen, was sich in einer kurzen Phase der Virämie widerspiegelt. Im Anschluss an diese hämatogene Aussaat ist eine Zell-zu-Zell-Ausbreitung innerhalb der einzelnen Organe zu erkennen. Das Pankreas ist dabei als erstes solides Organ betroffen. Erst im Verlauf finden sich typische Läsionen und infizierte Areale auch in Herz und Milz. Mehrere Wochen nach intraperitonealer Infektion ist eine im Vergleich zur akuten Infektion restringierte Virusreplikation (Hohenadl et al., 1991; Klingel et al., 1992) noch im Pankreas und Myokard, aber nicht mehr in der Milz nachweisbar. Die Sensitivität der jeweiligen Nachweismethode ist in Abbildung 22 zusammenfassend dargestellt.

Die vorliegende Studie sowie Ergebnisse anderer Forschungsgruppen (Cammock et al., 2013; Tracy, 2000) zeigen, dass Virionen nur wenige Tage nach Inokulation nachweisbar sind. Virale Proteine sowie virale Nukleinsäuren sind deutlich länger nachweisbar. Die Immunhistologie und Immunfluoreszenz sind für einen allgemeinen Virusnachweis zu allen Zeitpunkten nach Infektion die sensitivsten Nachweisverfahren. VP1 kann von Tag 2-28 pi mit diesen Verfahren nachgewiesen werden. Western Blot Hybridisierungen sind hingegen durch eine geringere Sensitivität gekennzeichnet, was auf extrinsische Faktoren (z.B. Abhängigkeit der Signalintensität von der Belichtungszeit und den eingesetzten Reagenzien) sowie der relativ hohen Mengen an Proteinen zum sicheren Nachweis zurückzuführen ist.

Häufig weisen Antikörper eine Kreuzreaktivität gegenüber anderen Antigenen mit ähnlichen Epitopen auf. Somit sind antikörperbasierte Verfahren im Allgemeinen weniger spezifisch als der Nachweis viraler RNA. Ein immunhistochemischer Nachweis von VP1 im Menschen gelang beispielsweise in einer Studie bei bis zu 20% der Patienten einer CVB3-negativen Kontrollgruppe (Krogvold et al., 2015). Der in der vorliegenden Studie eingesetzte Antikörper Cox mAB 31A2 zeichnet sich durch eine sehr hohe Sensitivität und Spezifität aus, was die Diagnostik zum Nachweis von CVB3 erheblich verbessern könnte, wie bereits von Ettischer-Schmid (2017) gezeigt.

Virale Nukleinsäuren sind durch RT-PCR und *in situ* Hybridisierung in Pankreas und Herz von Tag 2-28 pi, in der Milz hingegen nur bis Tag 21 pi nachweisbar. Dieser Unterschied ist auf intrinsische Faktoren zurückzuführen, etwa einer schnelleren Clearance der viralen RNA aus der Milz durch das Immunsystem des Wirts. Insgesamt sind beide Methoden zum Nachweis viraler RNA sowohl in der akuten als auch in der chronischen Phase der Infektion als hochsensitiv und dementsprechend für die Diagnostik geeignet anzusehen.

Ein Nachweis replikationsfähiger Viren mit Plaquetests sollte auf Grund des vergleichsweise kurzen diagnostischen Fensters für spezifische Fragestellungen (beispielsweise hinsichtlich der Infektiosität einer Probe) vorbehalten werden. Unspezifische Nachweisverfahren wie Hämatoxylin-Eosin-Färbungen und immunhistochemische Darstellungen von Entzündungszellen können bei immunkompetenten Versuchstieren als Screeningverfahren für den Nachweis der virus-induzierten myokardialen Schädigung eingesetzt werden. Die Sensitivität und Spezifität des immunhistologischen Nachweises von Entzündungszellen hängt maßgeblich von den verwendeten Antikörpern und der Menge der nachzuweisenden Zellen ab. Mit einem Beobachtungszeitraum bis zu Tag 28 pi liefern die gesammelten Datensätze ein umfassendes Bild über die Ausbreitung und Replikation des Virus während der akuten und chronischen Phase der Infektion. Da virale RNA und Proteine noch zum letzten Erhebungszeitpunkt (28 Tage pi) nachgewiesen werden können, sind weitere Veränderungen der Kinetik und damit auch der Sensitivität und Spezifität der Methoden zu späteren Zeitpunkten nicht auszuschließen. Eine weitere vergleichende Erhebung der Daten zu deutlich späteren Zeitpunkten nach Infektion wäre daher anzudenken.

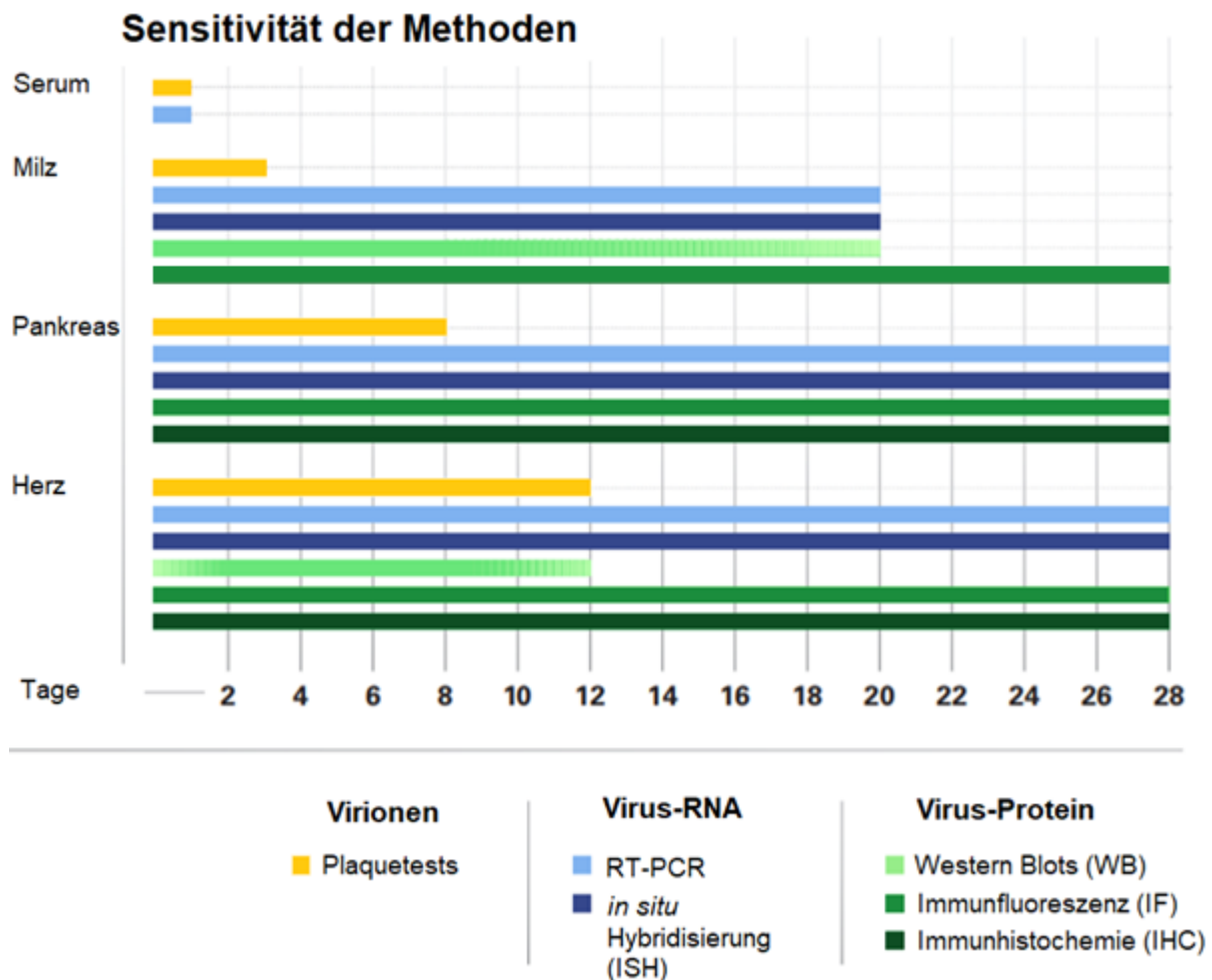


Abbildung 23: Das Diagramm stellt die Sensitivität der jeweiligen Nachweismethode im jeweiligen Organ (Y-Achse) in Abhängigkeit des Zeitpunkts post inoculationem (X-Achse) dar.

Aus den hier genannten Limitationen und dem Vergleich mit weiteren Arbeiten in der aktuellen Forschungsliteratur sind verschiedene Folgestudien zur weiteren Charakterisierung des Mausmodells der CVB3-Infektion vorstellbar. So könnten, neben der Variation der Virusstämme und einer Ausdehnung des Beobachtungszeitraumes, auch die Anwendung weiterer indirekter Nachweismethoden, wie etwa die Evaluation viruspezifischer Antikörper durch ELISA oder die Quantifizierung von Immunglobulinen oder Zytokinen als Ausdruck einer Entzündungsreaktion, analysiert werden. Auch wirtschaftliche Überlegungen und eine genauere Aufstellung des Kosten- und Arbeitsaufwandes einzelner Nachweismethoden z.B. im Rahmen des Einsatzes für die Diagnostik einer Enterovirusinfektion sollten berücksichtigt werden.

## Zusammenfassung

Coxsackieviren der Gruppe B sind hochrelevante humanpathogene Viren, die unter anderem ursächlich an der Entstehung einer viralen Myokarditis beteiligt sind.

Die vorliegende Arbeit zielte darauf ab, unterschiedliche Methoden des Virusnachweises im Verlauf der akuten und chronischen Phase der Infektion mit Coxsackieviren der Gruppe B organspezifisch im Mausmodell vergleichend darzustellen. Somit konnten Aussagen über die Sensitivität und Spezifität des Einsatzes der jeweiligen Methode zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Krankheitsverlauf getroffen werden.

In dieser Arbeit wurden Mäuse des Stamms ABY.SnJ mit  $10^5$  PFU Coxsackievirus B3 (Nancy Strain) intraperitoneal inokuliert und zwei, vier, sechs, acht, zwölf, 21 und 28 Tage pi jeweils Herz, Milz, Pankreas und Serum entnommen und untersucht.

Mittels Immunfluoreszenz, Immunhistologie und Western Blot Hybridisierung wurde die Präsenz des viralen Hüllproteins VP1 in den Gewebeproben nachgewiesen. Der Nachweis viraler RNA erfolgte mittels *in situ* Hybridisierung und quantitativer RT-PCR. Infektiöse Virionen wurden durch die Evaluation verschiedener Organe und des Serums mit Plaquetests erfasst.

Die viralen Nachweismethoden unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Sensitivität, welche von der Art des detektierten Erregermaterials (Virionen, Nukleinsäuren, Protein), dem Erhebungszeitpunkt und dem jeweiligen Organ abhängt. Plaquetests sind nur für eine begrenzte Zeit nach Inokulation zum Nachweis infektiöser Virionen geeignet. Im Serum ist ein Virusnachweis nur bis 2 Tage p.i. möglich. In Herz und Pankreas ist infektiöses Virus am längsten nachweisbar (max. bis 12 Tage pi im Herzmuskel). Virale Nukleinsäure kann durch RT-PCR und *in situ* Hybridisierung im Pankreas und Herzmuskel bis 28 Tage pi und in der Milz bis 21 Tage pi detektiert werden. CVB3 VP1 ist mittels Immunfluoreszenz in allen Organen bis Tag 28 Tage pi nachweisbar. Diese Methode stellt das vergleichsweise sensitivste Verfahren zum Nachweis viraler Proteine dar. Zum Nachweis von CVB3 VP1 eignet sich der Antikörper Cox mAB 31A2 hervorragend, welcher sich durch eine hohe Sensitivität und Spezifität in allen angewandten Methoden auszeichnet.

## Literaturverzeichnis

- Acheson, N. H. (2011). *Fundamentals of molecular virology* (2nd ed.). Hoboken, NJ: John Wiley & Sons.
- Anderson, D. R., Wilson, J. E., Carthy, C. M., Yang, D., Kandolf, R., & McManus, B. M. (1996). Direct interactions of coxsackievirus B3 with immune cells in the splenic compartment of mice susceptible or resistant to myocarditis. *J Virol*, *70*(7), 4632-4645.
- Aretz, H. T., Billingham, M. E., Edwards, W. D., Factor, S. M., Fallon, J. T., Fenoglio, J. J., Jr., . . . Schoen, F. J. (1987). Myocarditis. A histopathologic definition and classification. *Am J Cardiovasc Pathol*, *1*(1), 3-14.
- Badorff, C., Lee, G. H., Lamphear, B. J., Martone, M. E., Campbell, K. P., Rhoads, R. E., & Knowlton, K. U. (1999). Enteroviral protease 2A cleaves dystrophin: evidence of cytoskeletal disruption in an acquired cardiomyopathy. *Nat Med*, *5*(3), 320-326. doi:10.1038/6543
- Basavappa, R., Syed, R., Flore, O., Icenogle, J. P., Filman, D. J., & Hogle, J. M. (1994). Role and mechanism of the maturation cleavage of VP0 in poliovirus assembly: structure of the empty capsid assembly intermediate at 2.9 Å resolution. *Protein Sci*, *3*(10), 1651-1669. doi:10.1002/pro.5560031005
- Bergelson, J. M., Cunningham, J. A., Droguett, G., Kurt-Jones, E. A., Krithivas, A., Hong, J. S., . . . Finberg, R. W. (1997). Isolation of a Common Receptor for Coxsackie B Viruses and Adenoviruses 2 and 5. *Science*, *275*(5304), 1320-1323. doi:10.1126/science.275.5304.1320
- Bienz, K., Egger, D., Bienz-Isler, G., & Loeffler, H. (1972). Light and electron microscopic autoradiography of coxsackievirus A1 infected muscles: Viral RNA synthesis and inhibition of host cell RNA synthesis. *Archiv für die gesamte Virusforschung*, *39*(1-3), 35-47. doi:10.1007/BF01241527
- Caforio, A. L. P., Pankuweit, S., Arbustini, E., Basso, C., Gimeno-Blanes, J., Felix, S. B., . . . Elliott, P. M. (2013). Current state of knowledge on aetiology, diagnosis, management, and therapy of myocarditis: a position statement of the European Society of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *Eur Heart J*, *34*(33), 2636-2648.
- Cammock, C. E., Halnon, N. J., Skoczylas, J., Blanchard, J., Bohm, R., Miller, C. J., . . . Krogstad, P. A. (2013). Myocarditis, disseminated infection, and early viral persistence following experimental coxsackievirus B infection of cynomolgus monkeys. *PLoS One*, *8*(9), e74569. doi:10.1371/journal.pone.0074569
- Chansaenroj, J., Vongpunsawad, S., Puenpa, J., Theamboonlers, A., Vuthitanachot, V., Chattakul, P., . . . Poovorawan, Y. (2015). Epidemic outbreak of acute haemorrhagic conjunctivitis caused by coxsackievirus A24 in Thailand, 2014. *Epidemiology & Infection*, *143*(14), 3087-3093.
- Chapman, N. M., & Kim, K. S. (2008). Persistent coxsackievirus infection: enterovirus persistence in chronic myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Curr Top Microbiol Immunol*, *323*, 275-292.
- Chatterjee, N. K., & Nejman, C. (1985). Membrane-bound virions of coxsackievirus B4: cellular localization, analysis of the genomic RNA, genome-linked protein, and effect on host macromolecular synthesis. *Arch Virol*, *84*(1-2), 105-118.
- Chatterjee, N. K., & Tuchowski, C. (1981). Comparison of capsid polypeptides of group B coxsackie-viruses and polypeptide synthesis in infected cells. *Arch Virol*, *70*(3), 255-269.
- Chau, D. W., Yuan, J., Zhang, H., Cheung, P., Lim, T., Liu, Z., . . . Yang, D. (2007). Coxsackievirus B3 proteases 2A and 3C induce apoptotic cell death through

- mitochondrial injury and cleavage of eIF4GI but not DAP5/p97/NAT1. *Apoptosis*, 12(3), 513-524. doi:10.1007/s10495-006-0013-0
- Chow, L. H., Radio, S. J., Sears, T. D., & McManus, B. M. (1989). Insensitivity of right ventricular endomyocardial biopsy in the diagnosis of myocarditis. *Journal of the American College of Cardiology*, 14(4), 915-920. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/0735-1097\(89\)90465-8](http://dx.doi.org/10.1016/0735-1097(89)90465-8)
- Chung, S. K., Kim, J. Y., Kim, I. B., Park, S. I., Paek, K. H., & Nam, J. H. (2005). Internalization and trafficking mechanisms of coxsackievirus B3 in HeLa cells. *Virology*, 333(1), 31-40. doi:10.1016/j.virol.2004.12.010
- Cioc, A. M., & Nuovo, G. J. (2002). Histologic and in situ viral findings in the myocardium in cases of sudden, unexpected death. *Mod Pathol*, 15(9), 914-922. doi:10.1097/01.mp.0000024291.37651.cd
- Cornell, C. T., Kiosses, W. B., Harkins, S., & Whitton, J. L. (2007). Coxsackievirus B3 Proteins Directionally Complement Each Other To Downregulate Surface Major Histocompatibility Complex Class I. *Journal of virology*, 81(13), 6785-6797. doi:10.1128/jvi.00198-07
- Cunningham, A. J. (1965). A method of increased sensitivity for detecting single antibody-forming cells. *Nature*, 207(5001), 1106-1107.
- Dalldorf, G. (1950). The Coxsackie viruses. *Am J Public Health Nations Health*, 40(12), 1508-1511.
- Dalldorf, G., Sickles, G. M., & et al. (1949). A virus recovered from the feces of poliomyelitis patients pathogenic for suckling mice. *J Exp Med*, 89(6), 567-582.
- de Jong, A. S., de Mattia, F., Van Dommelen, M. M., Lanke, K., Melchers, W. J. G., Willems, P. H. G. M., & van Kuppeveld, F. J. M. (2008). Functional Analysis of Picornavirus 2B Proteins: Effects on Calcium Homeostasis and Intracellular Protein Trafficking. *J Virol*, 82(7), 3782-3790. doi:10.1128/jvi.02076-07
- Doedens, J. R., Giddings, T. H., & Kirkegaard, K. (1997). Inhibition of endoplasmic reticulum-to-Golgi traffic by poliovirus protein 3A: genetic and ultrastructural analysis. *J Virol*, 71(12), 9054-9064.
- El Houmami, N., Minodier, P., Dubourg, G., Martin-Laval, A., Lafont, E., Jouve, J.-L., . . . Fournier, P.-E. (2015). An Outbreak of Kingella kingae Infections Associated with Hand, Foot and Mouth Disease/Herpangina Virus Outbreak in Marseille, France, 2013. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 34(3), 246-250. doi:10.1097/inf.0000000000000572
- Ettischer-Schmid, N., Normann, A., Sauter, M., Kraft, L., Kalbacher, H., Kandolf, R., . . . Klingel, K. (2016). A new monoclonal antibody (Cox mAB 31A2) detects VP1 protein of coxsackievirus B3 with high sensitivity and specificity. *Virchows Archiv*, 469(5), 553-562.
- Fairweather, D., & Rose, N. R. (2007). Coxsackievirus-induced myocarditis in mice: A model of autoimmune disease for studying immunotoxicity. *Methods*, 41(1), 118-122. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ymeth.2006.07.009>
- Gaaloul, I., Riabi, S., Harrath, R., Evans, M., Salem, N. H., Mlayeh, S., . . . Aouni, M. (2012). Sudden unexpected death related to enterovirus myocarditis: histopathology, immunohistochemistry and molecular pathology diagnosis at post-mortem. *BMC Infect Dis*, 12, 212. doi:10.1186/1471-2334-12-212
- Gauntt, Gomez, P., Duffey, P., Grant, J., Trent, D., Witherspoon, S., & Paque, R. (1984). Characterization and myocarditic capabilities of coxsackievirus B3 variants in selected mouse strains. *Journal of virology*, 52(2), 598-605.
- Gauntt, C., Godeny, E., Lutton, C. W., Arizpe, H., Crapman, N., Tracy, S., . . . Rozek, M. (1989). Mechanism(S) of Coxsackievirus-Induced Acute Myocarditis in the

- Mouse. In L. de la Maza & E. Peterson (Eds.), *Medical Virology 8* (pp. 161-182): Springer US.
- Gruez, A., Selisko, B., Roberts, M., Bricogne, G., Bussetta, C., Jabafi, I., . . . Canard, B. (2008). The crystal structure of coxsackievirus B3 RNA-dependent RNA polymerase in complex with its protein primer VPg confirms the existence of a second VPg binding site on Picornaviridae polymerases. *J Virol*, *82*(19), 9577-9590. doi:10.1128/jvi.00631-08
- Hall, J. H., & Clemens, D. L. (2016). Use of Coxsackievirus B3 as a Model of Acute Pancreatitis. *Pancreapedia: The Exocrine Pancreas Knowledge Base*.
- Halonen, P., Rosen, L., & Huebner, R. J. (1959). Homologous and heterologous complement fixing antibody in persons infected with ECHO; Coxsackie and poliomyelitis viruses. *Proc Soc Exp Biol Med*, *101*(2), 236-241.
- Hammer, E., Phong, T. Q., Steil, L., Klingel, K., Salazar, M. G., Bernhardt, J., . . . Volker, U. (2010). Viral myocarditis induced by Coxsackievirus B3 in A.BY/SnJ mice: analysis of changes in the myocardial proteome. *Proteomics*, *10*(9), 1802-1818. doi:10.1002/pmic.200900734
- Han, T., Zhao, K., Wu, C., Lu, H., Song, D., He, W., & Gao, F. (2013). Viral kinetics are associated with changes in cytokines and chemokines in serum and target organs of SSM-CVB3-infected macaques. *Exp Mol Pathol*, *94*(1), 174-181. doi:10.1016/j.yexmp.2012.06.006
- Harris, K. S., Xiang, W., Alexander, L., Lane, W. S., Paul, A. V., & Wimmer, E. (1994). Interaction of poliovirus polypeptide 3CDpro with the 5' and 3' termini of the poliovirus genome. Identification of viral and cellular cofactors needed for efficient binding. *J Biol Chem*, *269*(43), 27004-27014.
- Harvala, H., Kalimo, H., Bergelson, J., Stanway, G., & Hyypia, T. (2005). Tissue tropism of recombinant coxsackieviruses in an adult mouse model. *J Gen Virol*, *86*(Pt 7), 1897-1907. doi:10.1099/vir.0.80603-0
- Herold, G. (2011). *Herold: Innere Medizin*.
- Hogle, J., Chow, M., & Filman, D. (1985). Three-dimensional structure of poliovirus at 2.9 Å resolution. *Science*, *229*(4720), 1358-1365. doi:10.1126/science.2994218
- Hohenadl, C., Klingel, K., Mertsching, J., Hofschneider, P. H., & Kandolf, R. (1991). Strand-specific detection of enteroviral RNA in myocardial tissue by in situ hybridization. *Molecular and Cellular Probes*, *5*(1), 11-20. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/0890-8508\(91\)90033-G](http://dx.doi.org/10.1016/0890-8508(91)90033-G)
- ICTV. (2016). International Committee on Taxonomy of Viruses. Retrieved from <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>
- Imrie, C. W., Ferguson, J. C., & Sommerville, R. G. (1977). Coxsackie and mumpsvirus infection in a prospective study of acute pancreatitis. *Gut*, *18*(1), 53-56.
- Inal, J. M., & Jorfi, S. (2013). Coxsackievirus B transmission and possible new roles for extracellular vesicles. *Biochem Soc Trans*, *41*(1), 299-302. doi:10.1042/bst20120272
- Jerne, N. K., & Nordin, A. A. (1963). Plaque Formation in Agar by Single Antibody-Producing Cells. *Science*, *140*(3565), 405-405.
- Kandolf, R. (1987). In situ detection of enteroviral genomes in myocardial cells by nucleic acid hybridization: an approach to the diagnosis of viral heart disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *84*(17), 6272-6276.
- Kandolf, R. (2011). Myokarditis-Diagnostik. [Diagnosis of myocarditis]. *Dtsch med Wochenschr*, *136*(16), 829-835. doi:10.1055/s-0031-1275813

- Kandolf, R., & Hofschneider, P. (1989). Viral heart disease. *Springer Seminars in Immunopathology*, 11(1), 1-13. doi:10.1007/BF00197080
- Kandolf, R., & Hofschneider, P. H. (1985). Molecular cloning of the genome of a cardiotropic Coxsackie B3 virus: full-length reverse-transcribed recombinant cDNA generates infectious virus in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82(14), 4818-4822.
- Kandolf, R., Klingel, K., Canu, A., Zell, R., Selinka, H. C., McPhee, F., . . . McManus, B. (1993). Enterovirus-Induced Cardiomyopathy: Molecular Analysis of Acute and Persistent Myocardial Infections. In H.-R. Figulla, R. Kandolf, & B. McManus (Eds.), *Idiopathic Dilated Cardiomyopathy* (pp. 267-283): Springer Berlin Heidelberg.
- Kandolf, R., Sauter, M., Aepinus, C., Schnorr, J.-J., Selinka, H.-C., & Klingel, K. (1999). Mechanisms and consequences of enterovirus persistence in cardiac myocytes and cells of the immune system. *Virus Research*, 62(2), 149-158. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1702\(99\)00041-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1702(99)00041-6)
- Kemball, C. C., Alirezai, M., Flynn, C. T., Wood, M. R., Harkins, S., Kiosses, W. B., & Whitton, J. L. (2010). Coxsackievirus infection induces autophagy-like vesicles and megaphagosomes in pancreatic acinar cells in vivo. *J Virol*, 84(23), 12110-12124. doi:10.1128/jvi.01417-10
- Kerekatte, V., Keiper, B. D., Badorff, C., Cai, A., Knowlton, K. U., & Rhoads, R. E. (1999). Cleavage of Poly(A)-binding protein by coxsackievirus 2A protease in vitro and in vivo: another mechanism for host protein synthesis shutoff? *J Virol*, 73(1), 709-717.
- Klingel, Sechtem, U., & Kindermann, I. (2017). Myokardbiopsie. *Der Kardiologe*, 1-19.
- Klingel, K., Hohenadl, C., Canu, A., Albrecht, M., Seemann, M., Mall, G., & Kandolf, R. (1992). Ongoing enterovirus-induced myocarditis is associated with persistent heart muscle infection: quantitative analysis of virus replication, tissue damage, and inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(1), 314-318.
- Klingel, K., Hohenadl, C., Canu, A., Albrecht, M., Seemann, M., Mall, G., & Kandolf, R. (1992). Ongoing enterovirus-induced myocarditis is associated with persistent heart muscle infection: quantitative analysis of virus replication, tissue damage, and inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(1), 314-318.
- Klingel, K., McManus, B. M., & Kandolf, R. (1995). *Enterovirus-infected immune cells of spleen and lymph nodes in the murine model of chronic myocarditis: a role in pathogenesis?* (Vol. 16).
- Klingel, K., Stephan, S., Sauter, M., Zell, R., McManus, B. M., Bultmann, B., & Kandolf, R. (1996). Pathogenesis of murine enterovirus myocarditis: virus dissemination and immune cell targets. *J Virol*, 70(12), 8888-8895.
- Klump, W. M., Bergmann, I., Muller, B. C., Ameis, D., & Kandolf, R. (1990). Complete nucleotide sequence of infectious Coxsackievirus B3 cDNA: two initial 5' uridine residues are regained during plus-strand RNA synthesis. *J Virol*, 64(4), 1573-1583.
- Krogvold, L., Edwin, B., Buanes, T., Frisk, G., Skog, O., Anagandula, M., . . . Dahl-Jorgensen, K. (2015). Detection of a low-grade enteroviral infection in the islets of langerhans of living patients newly diagnosed with type 1 diabetes. *Diabetes*, 64(5), 1682-1687. doi:10.2337/db14-1370
- Lang, C., Sauter, M., Szalay, G., Racchi, G., Grassi, G., Rainaldi, G., . . . Klingel, K. (2008). Connective tissue growth factor: a crucial cytokine-mediating cardiac



- fibrosis in ongoing enterovirus myocarditis. *Journal of Molecular Medicine*, 86(1), 49-60. doi:10.1007/s00109-007-0249-3
- Lerner, A. M. (1969). Coxsackievirus Myocardopathy. *The Journal of Infectious Diseases*, 120(4), 496-499. doi:10.2307/30105198
- Li, Hsu, T.-A., Chen, T.-C., Chang, S.-C., Lee, J.-C., Chen, C.-C., . . . Shih, S.-R. (2002). The 3C protease activity of enterovirus 71 induces human neural cell apoptosis. *Virology*, 293(2), 386-395.
- Li, Xu, W., Guo, Q., Jiang, Z., Wang, P., Yue, Y., & Xiong, S. (2009). Differential macrophage polarization in male and female BALB/c mice infected with coxsackievirus B3 defines susceptibility to viral myocarditis. *Circ Res*, 105(4), 353-364. doi:10.1161/circresaha.109.195230
- Lindberg, A. M., Stålhandske, P. O. K., & Pettersson, U. (1987). Genome of coxsackievirus B3. *Virology*, 156(1), 50-63. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/0042-6822\(87\)90435-1](http://dx.doi.org/10.1016/0042-6822(87)90435-1)
- Lindenbaum, J. E., Van Dyck, P. C., & Allen, R. G. (1975). Hand, foot and mouth disease associated with coxsackievirus group B. *Scand J Infect Dis*, 7(3), 161-163.
- Lyden, D. C., Olszewski, J., Feran, M., Job, L. P., & Huber, S. A. (1987). Coxsackievirus B-3-induced myocarditis. Effect of sex steroids on viremia and infectivity of cardiocytes. *Am J Pathol*, 126(3), 432-438.
- Mahfoud, F., Gärtner, B., Kindermann, M., Ukena, C., Gadomski, K., Klingel, K., . . . Kindermann, I. (2011). *Virus serology in patients with suspected myocarditis: utility or futility?* (Vol. 32).
- Maron, B. J., Towbin, J. A., Thiene, G., Antzelevitch, C., Corrado, D., Arnett, D., . . . Young, J. B. (2006). Contemporary Definitions and Classification of the Cardiomyopathies: An American Heart Association Scientific Statement From the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention. *Circulation*, 113(14), 1807-1816. doi:10.1161/circulationaha.106.174287
- Martin, A. B., Webber, S., Fricker, F. J., Jaffe, R., Demmler, G., Kearney, D., . . . Ni, J. (1994). Acute myocarditis. Rapid diagnosis by PCR in children. *Circulation*, 90(1), 330-339. doi:10.1161/01.cir.90.1.330
- Martinez-Salas, E., Pacheco, A., Serrano, P., & Fernandez, N. (2008). New insights into internal ribosome entry site elements relevant for viral gene expression. *J Gen Virol*, 89(Pt 3), 611-626. doi:10.1099/vir.0.83426-0
- Mattern, C. F. (1962). Some physical and chemical properties of Coxsackie viruses A9 and A10. *Virology*, 17, 520-532.
- Maze, S. S., & Adolph, R. J. (1990). Myocarditis: unresolved issues in diagnosis and treatment. *Clin Cardiol*, 13(2), 69-79.
- Muckelbauer, J. K., Kremer, M., Minor, I., Diana, G., Dutko, F. J., Groarke, J., . . . Rossmann, M. G. (1995). The structure of coxsackievirus B3 at 3.5 Å resolution. *Structure*, 3(7), 653-667. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0969-2126\(01\)00201-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0969-2126(01)00201-5)
- Nakamura, H., Yamamura, T., Fukuta, S., Matsumori, A., & Matsuzaki, M. (1996). A pathogenic mechanism of chronic ongoing myocarditis. *Jpn Circ J*, 60(8), 609-617.
- Neznanov, N., Kondratova, A., Chumakov, K. M., Angres, B., Zhumabayeva, B., Agol, V. I., & Gudkov, A. V. (2001). Poliovirus Protein 3A Inhibits Tumor Necrosis Factor (TNF)-Induced Apoptosis by Eliminating the TNF Receptor from the Cell

- Surface. *J Virol*, 75(21), 10409-10420. doi:10.1128/jvi.75.21.10409-10420.2001
- Park, K., Lee, B., Baek, K., Cheon, D., Yeo, S., Park, J., . . . Choi, Y. (2012). Enteroviruses isolated from herpangina and hand-foot-and-mouth disease in Korean children. *Virology*, 9, 205. doi:10.1186/1743-422x-9-205
- Pathak, H. B., Oh, H. S., Goodfellow, I. G., Arnold, J. J., & Cameron, C. E. (2008). Picornavirus genome replication: roles of precursor proteins and rate-limiting steps in oril-dependent VPg uridylylation. *J Biol Chem*, 283(45), 30677-30688. doi:10.1074/jbc.M806101200
- Patzke, C., Max, K. E., Behlke, J., Schreiber, J., Schmidt, H., Dorner, A. A., . . . Rathjen, F. G. (2010). The coxsackievirus-adenovirus receptor reveals complex homophilic and heterophilic interactions on neural cells. *J Neurosci*, 30(8), 2897-2910. doi:10.1523/jneurosci.5725-09.2010
- Pichichero, M. E., McLinn, S., Rotbart, H. A., Menegus, M. A., Cascino, M., & Reidenberg, B. E. (1998). Clinical and Economic Impact of Enterovirus Illness in Private Pediatric Practice. *Pediatrics*, 102(5), 1126-1134.
- Putnak, J. R., & Phillips, B. A. (1981). Picornaviral structure and assembly. *Microbiol Rev*, 45(2), 287-315.
- Ray, P. S., & Das, S. (2002). La autoantigen is required for the internal ribosome entry site-mediated translation of Coxsackievirus B3 RNA. *Nucleic Acids Res*, 30(20), 4500-4508.
- Reetoo, Osman, S. A., Illavia, S. J., Cameron-Wilson, C. L., Banatvala, J. E., & Muir, P. (2000). Quantitative analysis of viral RNA kinetics in coxsackievirus B3-induced murine myocarditis: biphasic pattern of clearance following acute infection, with persistence of residual viral RNA throughout and beyond the inflammatory phase of disease. *Journal of General Virology*, 81(11), 2755-2762.
- Reetoo, K. N., Osman, S. A., Illavia, S. J., Cameron-Wilson, C. L., Banatvala, J. E., & Muir, P. (2000). Quantitative analysis of viral RNA kinetics in coxsackievirus B3-induced murine myocarditis: biphasic pattern of clearance following acute infection, with persistence of residual viral RNA throughout and beyond the inflammatory phase of disease. *J Gen Virol*, 81(Pt 11), 2755-2762.
- Roivainen, M., & Klingel, K. (2010). Virus infections and type 1 diabetes risk. *Curr Diab Rep*, 10(5), 350-356. doi:10.1007/s11892-010-0139-x
- Rueckert, R. R., & Wimmer, E. (1984). Systematic nomenclature of picornavirus proteins. *J Virol*, 50(3), 957-959.
- Samuilova, O., Krogerus, C., Fabrichniy, I., & Hyypiä, T. (2006). ATP hydrolysis and AMP kinase activities of nonstructural protein 2C of human parechovirus 1. *Journal of virology*, 80(2), 1053-1058.
- Sawyer, M. H. (2002). Enterovirus infections: Diagnosis and treatment. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases*, 13(1), 40-47. doi:<http://dx.doi.org/10.1053/spid.2002.29756>
- Shanes, J. G., Ghali, J., Billingham, M. E., Ferrans, V. J., Fenoglio, J. J., Edwards, W. D., . . . Furner, S. (1987). Interobserver variability in the pathologic interpretation of endomyocardial biopsy results. *Circulation*, 75(2), 401-405. doi:10.1161/01.cir.75.2.401
- Sieczkarski, S. B., & Whittaker, G. R. (2002). Dissecting virus entry via endocytosis. *J Gen Virol*, 83(Pt 7), 1535-1545.
- Spigland, I., Fox, J. P., Elveback, L. R., Wassermann, F. E., Ketler, A., Brandt, C. D., & Kogon, A. (1966). The Virus Watch program: a continuing surveillance of viral

- infections in metropolitan New York families. II. Laboratory methods and preliminary report on infections revealed by virus isolation. *Am J Epidemiol*, 83(3), 413-435.
- Tam, P. E., & Messner, R. P. (1999). Molecular Mechanisms of Coxsackievirus Persistence in Chronic Inflammatory Myopathy: Viral RNA Persists through Formation of a Double-Stranded Complex without Associated Genomic Mutations or Evolution. *Journal of virology*, 73(12), 10113-10121.
- Tan, X., Li, L., Zhang, B., Jorba, J., Su, X., Ji, T., . . . Xu, W. (2015). Molecular epidemiology of coxsackievirus A6 associated with outbreaks of hand, foot, and mouth disease in Tianjin, China, in 2013. *Arch Virol*, 160(4), 1097-1104. doi:10.1007/s00705-015-2340-3
- Tavares, F. N., Costa, E. V., Oliveira, S. S., Nicolai, C. C., Baran, M., & da Silva, E. E. (2006). Acute hemorrhagic conjunctivitis and coxsackievirus A24v, Rio de Janeiro, Brazil, 2004. *Emerg Infect Dis*, 12(3), 495-497. doi:10.3201/eid1205.051173
- Tomioka, N., Kishimoto, C., Matsumori, A., & Kawai, C. (1986). Effects of prednisolone on acute viral myocarditis in mice. *Journal of the American College of Cardiology*, 7(4), 868-872. doi:10.1016/S0735-1097(86)80349-7
- Tomko, R. P., Xu, R., & Philipson, L. (1997). HCAR and MCAR: The human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(7), 3352-3356.
- Tracy, H. K., Pirruccello S, Lane PH, Reyna SM, Gauntt CJ. (2000). Group B coxsackievirus myocarditis and pancreatitis: connection between viral virulence phenotypes in mice. *Journal of Medical Virology*, 2000(62), 70-81.
- Tracy, S. (1985). Comparison of genomic homologies in the coxsackievirus B group by use of cDNA:RNA dot-blot hybridization. *Journal of Clinical Microbiology*, 21(3), 371-374.
- Ungewickell, E., & Branton, D. (1981). Assembly units of clathrin coats. *Nature*, 289(5796), 420-422.
- van der Linden, L., Wolthers, K. C., & van Kuppeveld, F. J. (2015). Replication and Inhibitors of Enteroviruses and Parechoviruses. *Viruses*, 7(8), 4529-4562. doi:10.3390/v7082832
- Vella, C., Brown, C. L., & McCarthy, D. A. (1992). Coxsackievirus B4 infection of the mouse pancreas: acute and persistent infection. *J Gen Virol*, 73 ( Pt 6), 1387-1394.
- Vuorinen, T., Vainionpaa, R., Kettinen, H., & Hyypia, T. (1994). Coxsackievirus B3 infection in human leukocytes and lymphoid cell lines. *Blood*, 84(3), 823-829.
- Weller, T. H., Enders, J. F., Buckingham, M., & Finn, J. J., Jr. (1950). The etiology of epidemic pleurodynia: a study of two viruses isolated from a typical outbreak. *J Immunol*, 65(3), 337-346.
- Wojnicz, R., Nowalany-Kozielska, E., Wojciechowska, C., Glanowska, G., Wilczewski, P., Niklewski, T., . . . Wodniecki, J. (2001). Randomized, Placebo-Controlled Study for Immunosuppressive Treatment of Inflammatory Dilated Cardiomyopathy: Two-Year Follow-Up Results. *Circulation*, 104(1), 39-45. doi:10.1161/01.cir.104.1.39
- Wolfgram, L. J., Beisel, K. W., Herskowitz, A., & Rose, N. R. (1986). Variations in the susceptibility to Coxsackievirus B3-induced myocarditis among different strains of mice. *J Immunol*, 136(5), 1846-1852.
- Woodruff, J. F. (1980). Viral myocarditis. A review. *Am J Pathol*, 101(2), 425-484.

- Yamashita, T., Ito, M., Taniguchi, A., & Sakae, K. (2005). Prevalence of coxsackievirus A5, A6, and A10 in patients with herpangina in Aichi Prefecture, 2005. *Jpn J Infect Dis*, *58*(6), 390-391.
- Yen, M.-H., Tsao, K.-C., Huang, Y.-C., Huang, C.-G., Huang, Y.-L., Lin, R., . . . Lin, T.-Y. (2007). Viral Load in Blood Is Correlated with Disease Severity of Neonatal Coxsackievirus B3 Infection: Early Diagnosis and Predicting Disease Severity Is Possible in Severe Neonatal Enterovirus Infection. *Clinical Infectious Diseases*, *44*(10), e78-e81. doi:10.1086/515399
- Ylipaasto, P., Klingel, K., Lindberg, A. M., Otonkoski, T., Kandolf, R., Hovi, T., & Roivainen, M. (2004). Enterovirus infection in human pancreatic islet cells, islet tropism in vivo and receptor involvement in cultured islet beta cells. *Diabetologia*, *47*(2), 225-239. doi:10.1007/s00125-003-1297-z
- Yoon, J. W. (1990). The role of viruses and environmental factors in the induction of diabetes. *Curr Top Microbiol Immunol*, *164*, 95-123.
- Young, N. A. (1973). Polioviruses, Coxsackieviruses, and Echoviruses: Comparison of the Genomes by RNA Hybridization. *J Virol*, *11*(6), 832-839.
- Zhao, X., Lamphear, B. J., Xiong, D., Knowlton, K., & Rhoads, R. E. (2003). Protection of cap-dependent protein synthesis in vivo and in vitro with an eIF4G-1 variant highly resistant to cleavage by Coxsackievirus 2A protease. *J Biol Chem*, *278*(7), 4449-4457. doi:10.1074/jbc.M212393200

### **Erklärung zum Eigenanteil**

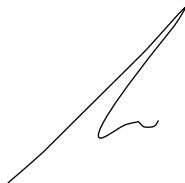
Die Einarbeitung in die verschiedenen Methoden erfolgte durch Frau Dr. N. Ettischer, Frau Dr. M. Sauter und Frau S. Bundschuh (CTA) in der damaligen Abteilung Molekulare Pathologie des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Tübingen.

Ich habe folgende Untersuchungen selbständig durchgeführt: Plaquetests, Western Blots, RT-PCR, Immunfluoreszenzfärbungen.

Die Durchführung der radioaktiven *in situ* Hybridisierungen, immunhistochemischen Färbungen und H.E. Färbungen erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Sauter.

Ich versichere, das Manuskript selbständig nach Anleitung durch Frau Prof. Dr. K. Klingel verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Stuttgart, den 01.11.2020



Julian D. Barthen

## **Danksagung**

Mein größter Dank gilt meiner Doktormutter und Betreuerin Frau Prof. Dr. med. Karin Klingel für die Bereitstellung des Themas der vorliegenden Dissertation, ihre umfassende Unterstützung bei der Klärung von Problemen und ihrem außergewöhnlich großen Engagement während der Entstehung dieser Arbeit. Insbesondere ihre unermüdliche Geduld und Präsenz habe ich nie als selbstverständlich angesehen. Vielen Dank.

Ebenfalls möchte ich einen besonderen Dank an die Mitarbeiter der Abteilung Molekulare Pathologie, insbesondere Frau Dr. N. Ettischer-Schmid und Frau Dr. M. Sauter für die sehr gute Zusammenarbeit in der Durchführung der Experimente und Erhebung der Daten aussprechen. Mein herzlichster Dank gilt Frau Sandra Bundschuh, chemisch-technische Mitarbeiterin in der Abteilung, für ihre Geduld in der Anleitung der Versuche und der Einarbeitung in die Laborarbeit.

Schließlich möchte ich mich bei meinen Eltern und meinem Bruder bedanken, ohne deren Unterstützung mein Studienwunsch nie in Erfüllung gegangen wäre. Ebenso bedanke ich mich bei meinem besten Freund, Herrn Björn Staudinger, für die Loyalität und den Rückhalt, den unsere Freundschaft auszeichnet.

Ferner danke ich Frau Sonja Bochon für das mühevollen Korrekturlesen meiner Arbeit.

Und nicht zuletzt danke ich meiner Frau, Nadine, für ihre Geduld, Unterstützung und Liebe.