

Klinik für Herz- und Kreislauferkrankungen  
Technische Universität München  
Deutsches Herzzentrum München  
(Direktor: Univ. -Prof. Dr. A. Schömig)

**Interaktion coxsackieviraler Proteasen mit dem kardioprotektiven  
Interleukin-6-Typ-Signaltransduktionsweg**

Christian Bradaric

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen  
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin (Dr. med.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ. -Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Priv. -Doz. Dr. R. Wessely
2. Univ. -Prof. Dr. B. Holzmann

Die Dissertation wurde am 14.06.2005 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 14.09.2005 angenommen.

<b>1.</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>5</b>
1.1	Die virale Herzmuskelerkrankung.....	5
1.2	Virale Myokarditis und dilatative Kardiomyopathie.....	6
1.3	Therapieoptionen.....	7
1.4	Das Coxsackievirus.....	8
1.4.1	Einteilung und Aufbau.....	8
1.4.2	Polyproteinprozessierung durch virale Proteasen.....	9
1.4.3	Pathophysiologische Bedeutung viraler Proteasen.....	10
1.5	Der IL-6-Typ-Signaltransduktionsweg.....	11
1.6	Ziel der Arbeit.....	14
<b>1.</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>15</b>
2.1	Zellkultur.....	15
2.1.1	Zelllinien und deren Kultivierung.....	15
2.1.2	Kryokonservierung und Auftauen von Zellen.....	15
2.2	Virologische Methoden.....	16
2.2.1	Viruspropagierung.....	16
2.2.2	Herstellung von plaque-purifiziertem Coxsackievirus B3.....	17
2.2.3	Bestimmung des Virus-Titers im Plaque-Forming-Assay.....	17
2.2.4	CVB3-Infektion von HeLa-Zellen.....	18
2.3	Proteinchemische Methoden.....	19
2.3.1	Proteinisolierung.....	19
2.3.2	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	19
2.3.3	Vorbereitung der Proteinproben.....	19
2.3.4	SDS-PAGE.....	20
2.3.5	Western-Transfer.....	20
2.3.6	Färbung der Membran.....	21
2.3.7	Proteindetektion.....	21

<b>2.4</b>	<b>Indirekte Immunfluoreszenz.....</b>	<b>23</b>
<b>2.5</b>	<b>Isolierung und Analyse von Plasmid-DNA.....</b>	<b>25</b>
2.5.1	Transformation von Bakterien.....	25
2.5.2	Präparation von Plasmid-DNA.....	25
2.5.3	Konzentrationsbestimmung von DNA.....	26
2.5.4	Restriktionsverdau von Plasmid-DNA.....	26
2.5.5	DNA-Gelelektrophorese.....	27
<b>2.6</b>	<b>Bestimmung der Spaltungswahrscheinlichkeiten von Proteinen durch virale Proteasen 2A und 3C.....</b>	<b>27</b>
<b>2.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>28</b>
<b>3.1</b>	<b>Analyse der Schnittwahrscheinlichkeit von Proteinen durch enterovirale Proteasen 2A und 3C.....</b>	<b>28</b>
<b>3.2</b>	<b>Untersuchung der prognostizierten Spaltungen von STAT3 und gp130 mittels Westernblot.....</b>	<b>29</b>
3.2.1	Spaltung von STAT3 nach coxsackieviraler Infektion.....	30
3.2.2	Spaltung von gp130 nach cosackieviraler Infektion.....	32
<b>3.3</b>	<b>Untersuchung der Auswirkung einer Spaltung von gp130 und STAT3 auf downstream-gelegene Proteine des IL-6-Signalings....</b>	<b>33</b>
3.3.1	Abnahme von pSTAT3 <sup>Tyr705</sup> nach CVB3-Infektion.....	34
3.3.2	Abnahme von pSTAT3 <sup>Ser727</sup> nach CVB3-Infektion.....	35
3.3.3	Abnahme von Bcl-xL nach CVB3-Infektion.....	36
3.3.4	Abnahme von Mcl-1 nach CVB3-Infektion.....	37
<b>3.4</b>	<b>Immunfluoreszenzfärbung CVB3-infizierter HeLa-Zellen.....</b>	<b>38</b>
3.4.1	Verlust der Phosphorylierung von STAT3 an Tyr705 nach CVB3-Infektion in Hela-Zellen.....	38
3.4.2	Zellulärer Phänotyp von gp130 in CVB3-infizierten HeLa-Zellen.....	41
<b>3.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>43</b>

<b>4.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>56</b>
<b>5.</b>	<b>Bibliographie.....</b>	<b>57</b>
<b>6.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>73</b>
<b>7.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>74</b>
<b>8.</b>	<b>Puffer und Lösungen.....</b>	<b>76</b>
<b>9.</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>78</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Die virale Herzerkrankung

Die Myokarditis ist definiert als Schädigung kardialer Myozyten mit reaktiver Infiltration des Herzmuskels durch Entzündungszellen, ausgenommen ischämische Läsionen (Böcker, 2000; Kandolf, 1996; Mall, 1995). In der Neufassung der WHO/ISFC-Task-Force-Nomenklatur von 1995 zählt die Myokarditis zu den spezifischen Kardiomyopathien und wird weiter unter den entzündlichen Kardiomyopathien untergliedert (Richardson, 1996).

Das Erreger-Spektrum infektiöser Myokarditiden ist groß und umfaßt u.a. Bakterien, Pilze, Protozoen, sowie virale Erreger (Böcker, 2000; Schwinger 2000, Feldman, 2000). Die in Europa und den Vereinigten Staaten am weitesten verbreitete Form der Myokarditis ist viraler Genese (Feldman, 2000) und somit eine bedeutsame Erscheinungsform der viralen Herzerkrankung, wobei das Coxsackie-B-Virus (CVB) als auslösendes Agens neben Adeno-, Echo- und Coxsackie-A-Viren (CVA) in der Häufigkeit führend ist (Woodruff, 1980).

Nachdem das Coxsackievirus erstmals 1947 von Dalldorf entdeckt und kultiviert wurde (Dalldorf, 1948), erkannte man Anfang der fünfziger Jahre bereits eine Assoziation von Enteroviren, speziell Coxsackieviren, und der Entstehung einer akuten Myokarditis (Fletcher, 1957; Van Creveld, 1956; Javett, 1956; Lerner, 1965; Smith, 1966). Hinweise auf die Dominanz des Coxsackievirus als auslösendes Agens von Herzmuskelentzündungen erlangte man in den sechziger Jahren durch epidemiologische Studien, die eine erhöhte Inzidenz viraler Myokarditiden infolge von Endemien mit Coxsackie-B-Viren zeigten (Helin, 1968). Durch die Etablierung molekularbiologischer Techniken wie der Filterhybridisierungstechnik (Slot-Blot), der In-Situ-Hybridisierung und der reversen Transkriptase gelingt heutzutage der direkte Nachweis selbst kleinster Mengen viralen Genoms in Endomyokardbiopsien (Bowles, 1986; Kandolf, 1995; Jin, 1990; Mullis, 1987; Sakakibara, 1962; Easton, 1988), wodurch die führende Rolle der

Coxsackieviren als Auslöser entzündlicher Herzmuskelerkrankungen belegt werden konnte.

Die akute virale Myokarditis kann ein variables klinisches Bild bis hin zum kardiogenen Schock und plötzlichem Herztod annehmen. In der Mehrzahl jedoch verläuft die entzündliche Herzmuskelerkrankung inapparent bzw. mit einer nur milden, teils grippeähnlichen Symptomatik (Sigusch, 1998; Mall, 1995; Hufnagel, 1998). Es kommt in aller Regel meist innerhalb weniger Wochen zur vollständigen Viruselimination und Ausheilung der akuten viralen Herzerkrankung (Böcker, 2000; Schultheiß, 1998; Mall, 1995; Kandolf, 1998).

## **1.2 Virale Herzerkrankung und dilatative Kardiomyopathie**

Bei einer geringen Anzahl von Patienten kommt es nach der akuten Infektionsphase, vermutlich begünstigt durch unbekanntes genetische Faktoren, nicht zu einer vollständigen Elimination des Virus (Kandolf, 1998; Mall, 1995; Schultheiß, 1998). Es vermag sich der lokalen Immunabwehr weitgehend zu entziehen und in eine chronische Entzündungsreaktion oder eine latente Infektion, ohne apparente, entzündliche Begleitreaktion, überzugehen (Kandolf, 1998, 1999).

Coxsackievirale Persistenz kann, bedingt durch Verlust an Myozyten, Hypertrophie und konsekutiver Veränderungen des kontraktiven Apparates, zu einer progredienten, myokardialen Pumpfunktionsstörung und dem Bild einer dilatativen Kardiomyopathie (DCM) führen (Juilliere, 1988; Mall, 1995; Strauer, 1995; Kandolf, 1998).

An kultivierten Kardiomyozyten konnte belegt werden, dass coxsackievirale Persistenz einen direkten zytopathischen Effekt induzieren kann, sowie kausal an der Entwicklung einer DCM beteiligt sein kann (Wessely, 1998a; Wessely, 1998b). Studien zeigen, dass enterovirale RNA in mehr als 20% der Patienten mit idiopathischer DCM mittels molekularbiologischer Methoden (in situ Hybridisierung, PCR) nachweisbar ist (Baboonian, 1997a). Somit gilt als gesichert,

dass Viren, speziell Enteroviren, an der Pathogenese zumindest einer Untergruppe von DCM beteiligt sein können (Remes, 1990; MacArthur, 1984; Martino, 1994, Maisch, 1997).

Zudem konnte in klinischen Studien bereits mehrfach belegt werden, dass Patienten mit positivem Virusgenomnachweis eine höhere Mortalität aufweisen, als bioptisch virusnegative Probanden (Archard, 1991; Why, 1994). Folglich ist die allgemeine Prognose einer klinisch manifesten DCM im Gegensatz zur akuten Myokarditis, aufgrund einer meist progredienten Herzinsuffizienz, sehr ungünstig. Die Zehn-Jahres-Überlebensrate beträgt nur etwa 30% (Maisch, 1990).

### **1.3 Therapieoptionen**

Die therapeutischen Möglichkeiten der akuten bzw. chronischen viralen Myokarditis oder der viralen DCM sind zumeist nur symptomatisch und haben die Verbesserung der Herzinsuffizienz und die Behandlung eventuell auftretender Rhythmusstörungen zum Ziel (Hufnagel, 1998; Schwinger, 2000). Die Medikation richtet sich v.a. nach den gängigen Kriterien der Herzinsuffizienztherapie und vermag lediglich das Voranschreiten der chronischen Erkrankung zu verlangsamen, jedoch nicht aufzuhalten (Kühl, 2003).

Interferone spielen bei der Abwehr viraler Infektionen eine zentrale Rolle, was sowohl *in vitro*, als auch im Tiermodell gut belegt ist (Wessely, 2001; Müller, 1994; Sen, 2001; Heim, 1992; Matsumori, 1988; Lutton, 1985). Eine Pilotstudie an Patienten mit myokardialer Enterovirus- oder Adenovirus-Persistenz ergab, dass bei IFN- $\beta$ -therapierten Patienten eine vollständige Viruselimination, sowie bei einem Großteil der Patienten eine Verbesserung der LV-Funktion resultierte (Kühl, 2003). Diese Studie zeigt einen Ansatz zur Therapie der viralen Myokarditis auf, jedoch ist die Erforschung der zugrundeliegenden molekularen und zellulären Pathogenese, v.a. der Virus-Zell-Interaktion durch virale Proteasen, für die Entwicklung gezielter Therapieoptionen entscheidend. Proteaseinhibitoren, wie sie bereits seit mehreren Jahren mit guten Erfolgen hinsichtlich der Verzögerung der Progredienz u.a. bei HIV-Infektion eingesetzt werden, könnten so als

therapeutisches Tool auch bei der viralen Herzerkrankung Anwendung finden (Lüllmann, 1999; Korant, 1986; Hellen, 1992).

## **1.4 Das Coxsackievirus**

### **1.4.1 Einteilung und Aufbau**

Das Coxsackievirus entstammt als Mitglied der Picornaviren-Familie dem Genus der Enteroviren, wozu u.a. auch das Poliovirus oder das Echovirus gerechnet werden. Sie werden in zwei Gruppen (A, B) unterteilt, wobei CVA in 23 weitere Serotypen (A1-22,24) und CVB in 6 Serotypen (B1-6) unterteilt werden.

Enteroviren besitzen eine hüllenlose, ikosaederförmige Struktur mit einem Durchmesser von etwa 28-30nm (Kandolf, 1996; Rueckert, 1996; Modrow, 1998).

Das genetische Material des Virus besteht aus positiv orientierter, einzelsträngiger RNA, welche von den Strukturproteinen VP1, VP2, VP3, sowie VP4 umkapselt ist (Rueckert, 1996). Das virale RNA-Genom kann aufgrund seiner Orientierung wie zelluläre mRNA agieren und nach Einschleusung in die Zelle auf direktem Wege translatiert werden. Die 7,4 Kilo-Basen große virale RNA besitzt, wie auch zelluläre mRNA, am 3'-Ende einen Poly-A-Schwanz und ist am 5'-Ende kovalent mit einem kleinen Protein, dem viruskodierten Protein VPg (Virales Protein, genomassoziiert) assoziiert (siehe Abbildung 1) (Wimmer, 1982; Modrow, 1998; Rueckert, 1996). Der etwa 6,8 Kilo-Basen große offene Leserahmen kodiert für ein etwa 2200 Aminosäuren langes Polyprotein. Das Polyprotein ist an beiden Seiten mit nicht-kodierenden Regionen assoziiert, wobei am 5'-Ende eine ausgeprägte stabile Sekundärstruktur vorliegt (Kandolf, 1996). Hier befindet sich die IRES (Internal Ribosomal Entry Site), welche virale RNA für zelluläre Ribosomeneinheiten als mRNA erkennbar macht und die Funktion der 5'-Cap-Struktur bei der korrekten Erkennung von Ribosomenuntereinheiten an den Translationsstartpunkt übernimmt (Jang, 1989, 1990; Pelletiere, 1988; Jackson, 1990). Eine solche IRES-Struktur konnte außer bei Picornaviren z.B. auch bei Hepatitis-C-Viren identifiziert werden (Tsukiyama-Kohara, 1992).



### 1.4.2 Polyproteinprozessierung durch virale Proteasen

Enterovirale Proteasen, v.a.  $2A^{Pro}$  und  $3C(D)^{Pro}$ , sind co- und posttranslational an der viralen Polyproteinprozessierung beteiligt (siehe Abbildung 1) (Lawrence, 1975; Toyoda, 1986; Modrow, 1998; Seipelt, 1999; Rueckert, 1996).

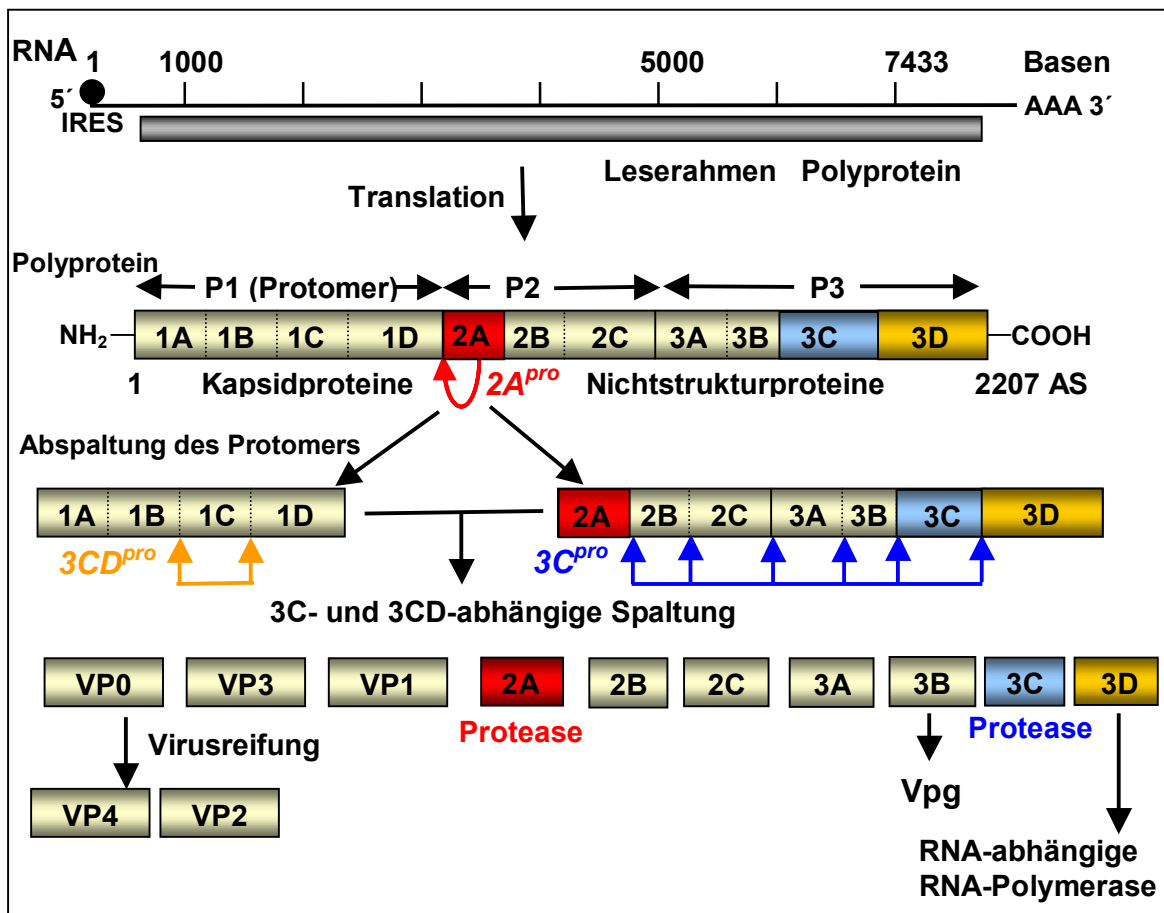


Abb.1 Schematische Darstellung der Organisation des enteroviralen Genoms und der Polyproteinprozessierung durch enterovirale Proteasen

(nach Modrow/Falke, 1998; Einzelheiten siehe Text)

Hierbei trennt die  $2A$ -Protease, eine trypsinähnliche Serinprotease mit einem Cystein im aktiven Zentrum, den Kapsidvorläufer (P1) von den Nicht-Strukturprotein-Vorläufern (P2, P3) zwischen den Aminosäuren Tyrosin und Glycin ab (Seipelt, 1999). Die  $3C$ -Protease, ebenfalls eine trypsinähnliche Serinprotease mit einem Cystein im aktiven Zentrum, spaltet bevorzugt zwischen Glycin und Glutamin und sorgt zusammen mit dem  $3C$ -Vorläufer-Protein  $3CD$  für nahezu alle

weiteren Prozessierungsschritte des Polyproteins (Miyashita, 1996; Seipelt, 1999; Modrow, 1998). 3CD besitzt neben seiner proteolytischen Aktivität die Funktion einer RNA-abhängigen RNA-Polymerase. Die Polymerase dient der Umschreibung des positiv-orientierten RNA-Stranges in die komplementäre Minustrang-RNA. Diese fungiert als Matrize für die Synthese weiterer Positiv-RNA-Stränge, welche in die neugebildeten Viruspartikel verpackt werden. Die Strukturproteine VP2 und VP4 entstehen letztendlich durch autokatalytische Aktivität innerhalb des VP2 aus dem Vorläufer VP0 (Modrow, 1998).

### **1.4.3 Pathophysiologische Bedeutung coxsackieviraler Proteasen**

Die Proteasen 2A und 3C spielen pathophysiologisch eine bedeutsame Rolle. Sie sind nicht alleine an der Virusmaturation beteiligt, sondern können durch Spaltung zellulärer Proteine einen zytopathischen Effekt in infizierten Zellen induzieren (Modrow, 1998).

Bekanntes Ziel enteroviraler Proteasen sind hierbei u.a. der eukaryote Translationsfaktor eIF4G. Dieser wird durch die enterovirale Protease 2A gespalten, wodurch es zu einer Inhibition cap-abhängiger Translation zellulärer mRNAs kommt (Etchison, 1982; Lamphear, 1993, 1995). Der resultierende „host shutoff“ wird durch die proteolytische Spaltung des Poly(A)-Bindungs-Proteins (PABP) via der 2A und 3C Proteasen weiter verstärkt (Joachims, 1999; Kerekatte, 1999; Kuyumku-Martinez, 2002).

Einen neuen Erklärungsansatz für die Entstehung einer DCM nach coxsackieviraler Myokarditis fanden Badorff et al. (1999), die zeigen konnten, dass die enterovirale Protease 2A das Zytoskelettprotein Dystrophin sowohl *in vitro* als auch *in vivo* proteolytisch spaltet und dadurch weitgehend inaktiviert. Dies kann im Rahmen einer Enterovirus-Infektion die Zerstörung des Zytoskeletts bedingen und so die Entstehung einer DCM begünstigen (Badorff, 1999, 2000).

Die 3C-Protease führt durch Spaltung des Mikrotubulus-assoziierten Proteins 4 (MAP-4) zu morphologischen Veränderungen in infizierten Zellen sowie zu einer Inhibition der Transkription durch Proteolyse der Transkriptionsfaktoren

TATA-bindendes Protein (TBP), TFIIIC, Oct-1 und CREB (Joachims, 1995; Clark, 1993; Das, 1993; Yalmanchili, 1997(a,b)).

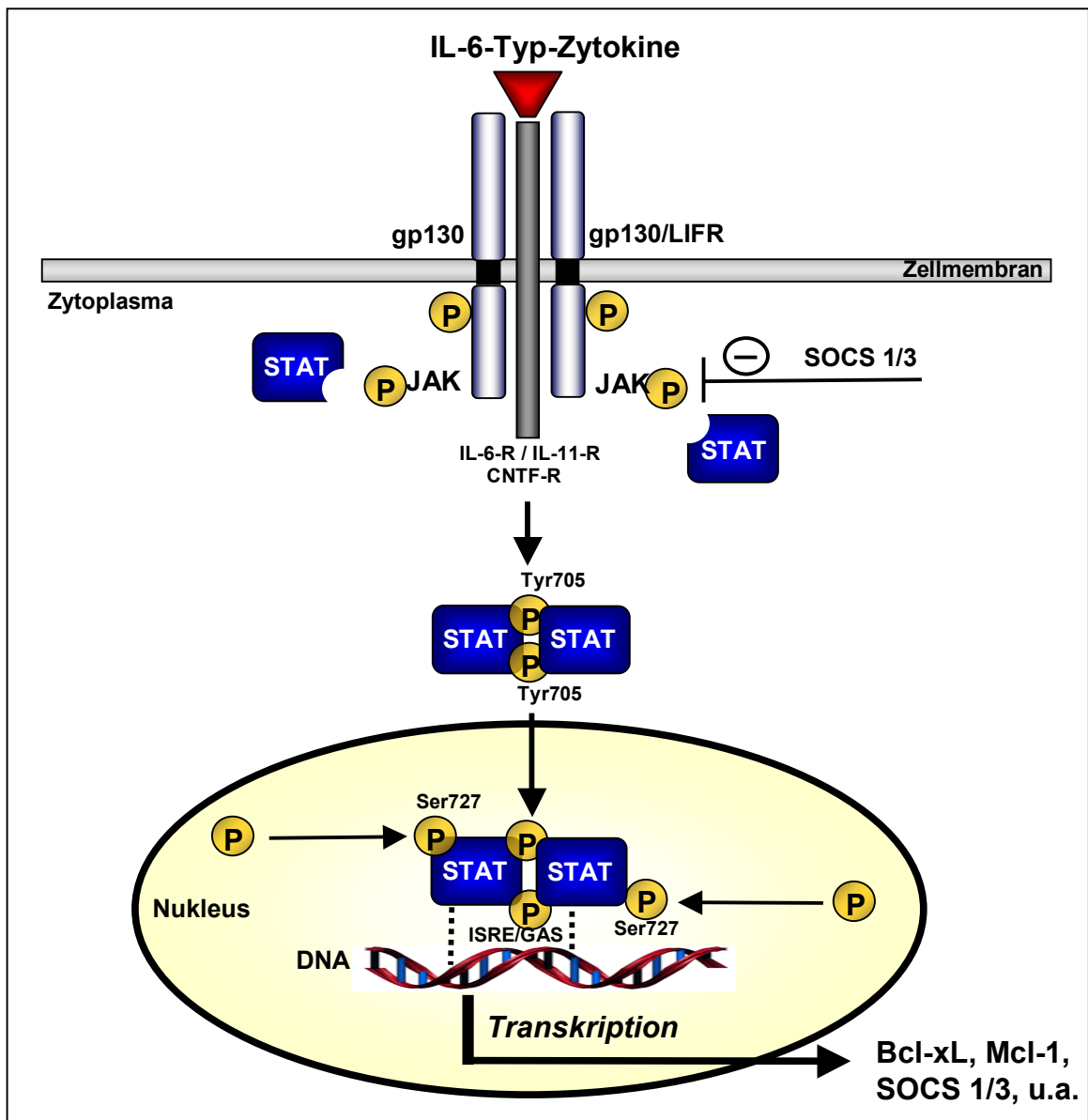
## **1.5 Der IL-6-Typ-Signaltransduktionsweg**

Viren sind einem hohen Selektionsdruck durch das Immunsystem ausgesetzt. Dies kann durch selektive Mutationen dazu führen, dass Viren die Fähigkeit erlangen, Proteine zu exprimieren, welche mit essentiellen zellulären Funktionen, wie Zytokin-Signaltransduktionswegen, interagieren können. Hierdurch kann es ihnen gelingen, ihre Replikation zu fördern, sich der Elimination durch das Immunsystem zu entziehen oder auch durch Triggerung von Apoptose die virale Verbreitung zu erhöhen (Hiscott, 2001). Bekanntermaßen können manche Virus-Infektionen so zur Degradation oder Inhibition von STAT- (Signal Transducers and Activators of Transcription) oder JAK- (Janus Kinasen) Proteinen des IL-6-Typ-Signaltransduktionsweges oder des IFN-Signalweges führen (Ulane, 2003; Levy, 2001; Miller, 1998; Parisien, 2001, 2002; Garcin, 2001).

Der IL-6-Typ-Signaltransduktionsweg wird durch die Familie der IL-6-Typ-Zytokine aktiviert. Hierzu gehören Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-11 (IL-11), Leukemia Inhibitory Factor (LIF), Oncostatin M (OSM), Ciliary Neurotrophic factor (CNTF), Cardiotrophin-1 (CT-1) und Cardiotrophin-like Cytokine (CLC) (Heinrich, 2003).

Für diese Zytokine ist die membranständige Rezeptoruntereinheit Glykoprotein 130 (gp130) zur Signaltransduktion essentiell. Die Bindung der Liganden an den jeweiligen Rezeptor führt initial zur Homo- oder Heterodimerisierung der entsprechenden Rezeptoruntereinheiten. IL-6 und IL-11 bedingen eine gp130-Homodimerisierung (Murakami, 1993; Yin, 1993), wobei CNTF (Davis, 1993), LIF (Gearing, 1992) und CT-1 (Pennica, 1995) über ein Heterodimer von gp130/LIFR signalisieren. Nachfolgend werden gp130-assoziierte Kinasen der Janus-Familie (JAK1, JAK2, TYK2) phosphoryliert und aktiviert (Yeh, 1999). Diese Kinasen übertragen Phosphat-Gruppen auf zytoplasmatische Tyrosin-Reste von gp130, was für die Aktivierung von Mitgliedern der STAT-Familie von Transkriptionsfaktoren Voraussetzung ist (Heinrich, 1998; Stahl, 1995; Gerhartz,

1996). STAT3, eines von sieben Mitgliedern dieser Protein-Familie, wird durch IL-6-Typ-rezeptorassoziierte Kinasen an einem Tyrosinrest (Position 705) phosphoryliert (Kaptein, 1996). Hierdurch können sich die STATs entweder zu Homo- (z.B. STAT3/STAT3), aber auch zu Heterodimeren (z.B. STAT1/STAT3) zusammenschließen. Die Dimerisierung ist für die Translokation in den Zellkern essentiell (Shuai, 1994; Heinrich, 1998). Nach weiterer Phosphorylierung an Serinrest 727 im Zellkern durch Serinkinasen (MAPK, Mitogen Aktivierte Kinasen (u.a.)), binden die STATs an Promoter- und Enhancer-Elemente (ISRE, Interferon Stimulating Response Element; GAS, Gamma Activating Site) verschiedener Zielgene (u.a. Akut-Phase-Proteine, Bcl-xL, Mcl-1, SOCS1/3) und induzieren so deren Transkription (Lutticken, 1995; Zhang, 1995).



**Abb.2 Schematische Darstellung der IL-6-Typ-Signaltransduktion**

verwendete Abkürzungen: JAK, Janus Kinasen; SOCS, Suppressor of Cytokine Signaling; P, Phosphatgruppe; Tyr, Tyrosinrest; Ser, Serinrest; -R, Rezeptor; STAT, Signal Transducer and Activator of Transcription; ISRE, Interferone Stimulating Response Element; GAS, Gamma Activating Site (Einzelheiten siehe Text).

Die negative Regulation dieses Signalweges wird neben PIAS (Protein Inhibitors of Activated STATs) auch u.a. durch negative Feedback-Inhibition via SOCS-Proteine (Suppressors of Cytokine Signaling) durch Hemmung der JAKs sichergestellt (Hamanaka, 2001; Yasukawa, 2001; Krebs, 2000; Chung, 1997).

Den Zytokinen der IL-6-Familie kommt eine wichtige Bedeutung bei komplexen zellulären Prozessen wie Genaktivierung, Proliferation, Differenzierung, Apoptose, sowie der Angiogenese zu (Heinrich, 1998; Horvath, 2000). Der IL-6-Typ-Signalweg ist in dieser Hinsicht mittels seiner Signalkomponenten gp130 und STAT3 durch Vermittlung anti-apoptotischer Signale der Bcl-2-Familie (Bcl-xL, Mcl-1) und Induktion von Hypertrophie für das Überleben von Kardiomyozyten essentiell (Fukada, 1996; Uozumi, 2001; Zolk, 2002; Hirota, 1999; Wollert, 2001; Negoro, 2000, 2001; Fujio, 1997; Song, 2002). Zudem sorgen die pleiotropen Effekte von IL-6 sowohl für die Induktion der Akut-Phasen-Antwort als auch für die Differenzierung von B-Zellen in Antikörper sezernierende Plasmazellen und begünstigen T-Zell -Wachstum, -Differenzierung und -Überleben. (Lutticken, 1994; Alonzi, 2001; Hirano, 1986; Rincon, 1997; Muraguchi, 1988; Takeda, 1998; Takeda, 2000; Faris, 1997).

## **1.6 Ziel der Arbeit**

Die essentielle Bedeutung der IL-6-Signalkaskade für die Immunantwort und das Überleben der Zelle macht sie zu einem attraktiven Ziel für coxsackievirale Proteasen. Eine proteolytische Interaktion viraler Proteasen mit der IL-6-Signalkaskade könnte somit ein bedeutender Faktor im Rahmen der coxsackieviralen Infektion, Ausbreitung und Persistenz sein.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Identifizierung und Analyse potentieller Zielstrukturen für coxsackievirale Proteasen 2A und/oder 3C innerhalb des kardioprotektiven IL-6-Typ-Signaltransduktionsweges, sowie die Darstellung der Effekte einer Interaktion auf downstream-gelegene Proteine.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Zellkultur**

#### **2.1.1 Zelllinien und deren Kultivierung**

In dieser Arbeit wurden folgende permanente Zelllinien verwendet:

- HeLa-Zellen: humane Zervix-Karzinom-Zellen (ATCC, Manassas, USA, #CCL-2)
- COS7-Zellen: Affennieren-Zellen (ATCC, Manassas, USA, #CRL-1651)

Zellkulturarbeiten wurden unter einer HeraSafe Sterilbank (Heraeus, Hanau, Typ HS18) durchgeführt. Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen mit 175 cm<sup>2</sup> Bodenfläche (Sarstedt, Nambrecht, #83.1812.002) in Kultur gehalten und in einem HeraCell Brutschrank (Heraeus, Hanau) in wasserdampfgesättigter Luft bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Als Medium wurde für beide Zelllinien Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium (DMEM) mit Glutamax-I (Gibco, Karlsruhe, #32430-027) verwendet und 10% hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum (FCS) (Biochrom KG, Berlin, #S0115), sowie 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (P/S-Fertiglösung, Sigma, Taufkirchen, #P0781) zugesetzt. Bei 70-80%-iger Konfluenz wurden die Zellen zur Weiterkultivierung mit PBS (Sigma, Taufkirchen, #D8537) gespült und durch Zugabe von Trypsin/EDTA (Gibco, Eggenstein, #25300-054) enzymatisch vom Flaschenboden gelöst. Nach Aufnahme in frischem Medium wurden die Zellen im Verhältnis 1:2 bis 1:5 auf neue Kulturflaschen verteilt.

#### **2.1.2 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen**

Zur Kryokonservierung wurden Zellen durch Trypsinieren vom Flaschenboden gelöst und nach Aufnahme in Medium kurz bei 1000 rpm (ca.160 g) in einer Megafuge 1.0R (Heraeus, Hanau) zentrifugiert. Nach Resuspension in PBS wurden die Zellen erneut zentrifugiert. Das resultierende Zellsediment wurde in

0,1 ml DMSO (Sigma, Taufkirchen, #200-664-3) und 0,9 ml DMEM aufgenommen, kurz resuspendiert und in Kryogenic Vials (Nalge, Rochester, USA, #5000-1020) überführt. Diese wurden in einem mit Isopropanol (Sigma, Taufkirchen, #I-9516) gefüllten Nalge™Cryo 1 °C Freezing Container (Nalge, Rochester, USA, #5100-0001) bei -70 °C tiefgefroren. Nach 24 h wurden die Zellen zur längerfristigen Konservierung in flüssigen Stickstoff überführt.

Zur Weiterkultivierung wurden die Zellen im Wasserbad bei 37 °C zügig aufgetaut und direkt in vorgewärmtes Medium einer Zellkulturflasche überführt. Nach einem Tag Inkubation im Brutschrank wurde ein Mediumwechsel vorgenommen, um das für die Zellen toxische DMSO vollständig zu entfernen.

## **2.2 Virologische Methoden**

### **2.2.1 Viruspropagierung**

Das in dieser Arbeit verwendete Coxsackievirus B3 entstammt der infektiösen cDNA-Kopie der kardiotropen Variante H3 (Woodruff-Variante). Hierfür wurde die cDNA, inkloniert in ein pcDNA3-Plasmid (Invitrogen, Karlsruhe, #V79020), mittels Superfect (Qiagen, Hilden, #301305) in für CVB3 nicht permissive COS7-Zellen einer 6-Well Platte transfiziert. Nach 48-stündiger Expression des CVB3 in COS7-Zellen und Freisetzung von CVB3 in den Zellüberstand wurden HeLa-Zellen in einer 6-Well-Platte mit zentrifugiertem COS7-Zellüberstand überschichtet. Die Inkubationsdauer bei 37 °C betrug erneut 48 h. Durch dreimaliges Einfrieren (-70 °C) und Auftauen der Zellen wurden die Zellmembranen der HeLa-Zellen aufgebrochen und das in den Zellen befindliche Virus freigesetzt.

Zur Vermehrung des CVB3 in größerem Maßstab wurde je 1 ml der HeLa-Zellüberstände auf einen 80%-igen HeLa-Zellrasen einer 75 cm<sup>2</sup>-Kulturflasche gebracht, eine Stunde inkubiert und durch 7 ml DMEM ergänzt. Nach 8-12 h wurden die Zellmembranen durch mehrmaliges Einfrieren und Auftauen lysiert (s.o.) und der Überstand durch Zentrifugation mit 4000 rpm (ca. 2500 g) von Zellresten befreit. Diese Lösung wurde zur Plaque-Purifikation (siehe 2.2.2) eingesetzt.



### **2.2.2 Herstellung von Plaque-purifiziertem Coxsackievirus B3**

Ein konfluent HeLa-Zellrasen einer 6-Well-Platte wurde mit 300 µl CVB3-Lösung (siehe 2.2.1) überschichtet und im Brutschrank inkubiert. Nach 1 h wurde der Zellrasen mit einem 1:1-Gemisch von 1,3%-igem Seaplaque-Agar (BMA, Rockland, USA, #50101) und 2x DMEM überschichtet und für weitere 48 h inkubiert. Als Annahme gilt, dass jeweils ein Virus in einer Stunde genau eine Zelle infiziert. Durch den Agarüberzug kann eine Infektion weiterer Zellen nur über direkten Zellkontakt erfolgen. Dies führt zu einer lokal begrenzten Lyse und zur Entstehung von einzelnen Plaques im Zellrasen, welche aus avitalen Zellen bestehen. Jeder dieser Plaques repräsentiert eine Plaque-forming-unit (PFU) aus je einem infektiösem viralen Partikel.

Ein Plaque wurde mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze aufgenommen, mit 1 ml DMEM vermischt, dreimal eingefroren (-70 °C) und wieder aufgetaut. Ausgehend von dieser Lösung wurde in oben beschriebener Weise (s. 2.2.1) die Viruspropagierung durchgeführt.

### **2.2.3 Bestimmung des Virus-Titers im Plaque-Test**

Zunächst wurde von der Viruslösung eine Verdünnungsreihe in DMEM von  $10^{-4}$  -  $10^{-8}$  hergestellt. Konfluente HeLa-Zellen wurden daraufhin in einer 6-Well Platte mit je 300 µl der einzelnen Verdünnungsstufen bedeckt, 1 h im Brutschrank inkubiert und mit einem Agar-2x DMEM-Gemisch überschichtet (s.2.2.2).

Nach etwa 48 h wurden die Zellen fixiert, indem für 3-5 min ein 1:3-Essigsäure (J.T. Baker, Deventer, Holland, #6052)-Methanol-Gemisch auf den Agar gegeben wurde. Der Agar wurde mit einem Spatel gelöst. Die so fixierten Zellen wurden nach kurzem Waschen mit ddH<sub>2</sub>O, mit 1,5%-igem Kristallviolett (Sigma, Taufkirchen, #C-3886) (w/v) in PBS gefärbt und hierdurch die Plaques als unangefärbte Löcher im violett gefärbten Zellrasen sichtbar.

Durch Zählung der Plaques in einem Well, konnte auf den Titer der Viruslösung mit folgender Formel rückgerechnet werden:

$$\text{PFU/ml} = \frac{\text{Anzahl der Plaques (n) pro Well}}{\text{Verdünnungsstufe} \times 0,3 \text{ ml}}$$

#### 2.2.4 CVB3-Infektion von HeLa-Zellen

Die Infektion von HeLa-Zellen mit CVB3 erfolgte jeweils bei etwa 70%-iger Konfluenz, mit einer MOI=1 (multiplicity of infection), entweder in zweikammerigen-Plättchen (Nalge Nunc, Naperville, USA, #177429) oder in 175 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen.

Für die Infektion in 175 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 2 ml DMEM-CVB3-Lösung überschichtet. Nach einer Stunde Inkubation im Brutschrank wurden 8 ml DMEM zugegeben und die Zellen bis zur Lyse (siehe 2.3.1) im Brutschrank inkubiert.

Für die Infektion in zweikammerigen Plättchen wurden die mit PBS gewaschenen Zellen mit 1,5 ml DMEM-CVB3-Lösung überschichtet und bis zur Lyse im Brutschrank inkubiert.

Jeweils eine Stunde vor dem jeweiligen Lysezeitpunkt wurden die Zellen entweder mit CT-1 (2 ng/ml) (Calbiochem, Schwalbach, #218200), mit LIF (2 ng/ml) (Calbiochem, Schwalbach, #PF044) oder mit IL-6 (100 ng/ml) (Calbiochem, Schwalbach, #407652) stimuliert, indem die jeweilige Lösung in den angegebenen Konzentrationen direkt ins Medium gegeben und durch Schwenken verteilt wurde.

## **2.3 Proteinchemische Methoden**

### **2.3.1 Proteinisolation**

Zellen wurden mit PBS gewaschen und direkt mit 1 ml eisgekühltem Lysepuffer versetzt. Mit einem Gummischaber (Corning, New York, USA, #3011) wurden die Zellen vom Boden gelöst, in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß mit einem Vortex-Genie2 (Scientific Ind., New York) „gevortext“ und 30 min auf Eis inkubiert. Um störende Membranbestandteile abzutrennen wurde, das Zelllysat für 20 min bei 13000 rpm (ca. 12000 g) und 4 °C in einer Biofuge fresco (Heraeus, Hanau) zentrifugiert, der Überstand in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei –70 °C in einem Hera freeze Gefrierschrank (HFU 586 Basic) gelagert.

### **2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration**

Der Proteingehalt wurde mittels eines Protein Assay Kits (BioRad, München, #500-0001) in Doppelbestimmung nach einer an Lowry (Lowry, 1951) angelehnten Methode ermittelt. Der Assay basiert auf einer kalorimetrischen Reaktion von Proteinen mit einer alkalischen Kupfer-Tartrat-Lösung (Lösung A) und einem Folin-Reagenz (Lösung B) (1). Nach Zugabe der BioRad-Lösungen A (25 µl) und B (200 µl) zu der zu bestimmenden Proteinprobe wurde nach 15 min die Absorption in 96well Elisa-Platten (Greiner Bio-One, Frickenhausen, #655180) bei 750 nm in einem Biotrak-II-Elisa-Reader (Amersham Biosciences, Freiburg) gemessen. Aus der jeweiligen Absorption ergab sich anhand einer BSA-Eichkurve die jeweilige Konzentration der Proben.

### **2.3.3 Vorbereitung der Proteinproben**

Für die quantitative Analyse von Proteinen im Westernblot wurden zu vergleichende Proben einander in ihrer Konzentration mit NTE-Puffer angeglichen. Die Proteinlysate wurden mit 2x Lämmli-Probenpuffer (Novex, Frankfurt,

#LC2676) versetzt und für wenige Minuten bei 95 °C im Heizblock (Eppendorf, Hamburg) denaturiert.

#### **2.3.4 SDS-PAGE**

In der denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) werden Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt, indem sie auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen und einem elektrischem Feld ausgesetzt werden. Je nach Größe der zu untersuchenden Proteine wurden folgende TrisGlycine-Gele von Novex (Frankfurt) verwendet:

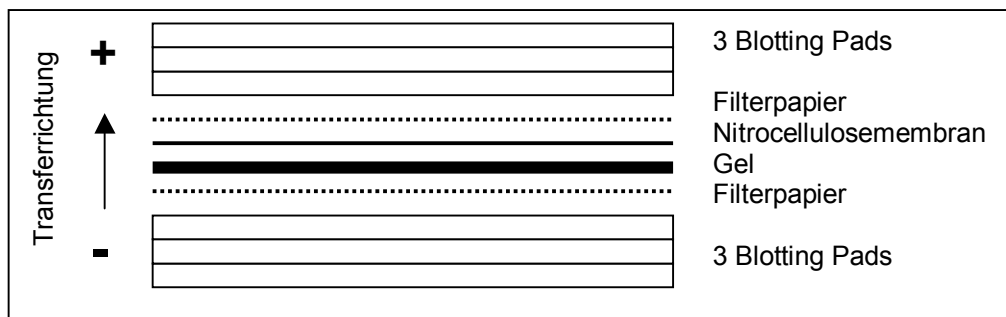
6%:	1,5 mm; 10 Wells (Novex, #EC6068)
4-20%:	1,5 mm; 10 Wells (Novex, #EC6028)
18%:	1,5 mm; 10 Wells (Novex, #EC6508)
12%:	1,5 mm; 10 Wells (Novex, #EC6008)

Die Gele wurden in einer XCell Mini-Cell Kammer (Novex, Frankfurt, #EI9001) arretiert und mit 1x TrisGlycine SDS-Laufpuffer umspült.

Je 30-80 µg Gesamtprotein der vorbereiteten Zelllysate (siehe 2.2.3) wurden in die Geltaschen geladen und durch Anschluss der Gelkammer an einen Power Pac 300 (BioRad, München) in etwa 120 min bei konstanten 125 V elektrophoretisch aufgetrennt. Als Proteinstandard wurde der vorgefärbte Marker SeeBlue Plus2 (Novex, Frankfurt, LC5925) verwendet.

#### **2.3.5 Western-Transfer**

Der Protein-Transfer vom Gel auf eine Hybond C Nitrocellulosemembran (Amersham, Freiburg, #RPN 203C) erfolgte in einem XCell-Blot Modul (Novex, Frankfurt, #EI9051) als sogenanntes Wet-Blotting durch Anlegen eines elektrischen Feldes. Die Taschen des Gels wurden abgetrennt und sechs Blotting Pads (Novex, Frankfurt, #EI9052), 2 Filterpapiere (Whatman, Maidstone, England, #3030917), eine Membran und das jeweilige Gel in 1xTransfer-Puffer getränkt. Den Aufbau der Kammer für den Protein-Transfer zeigt Abbildung 3.



**Abb.3 „Gel-Sandwich“ für den Western-Transfer**

Das „Sandwich“ (Abbildung 3) wurde luftblasenfrei in dem XCell Blot Modul eingeschlossen und in einer XCell Mini-Cell Kammer arretiert. Nach Auffüllen der inneren Kammer mit 1x Transfer Puffer wurde für etwa 120 min eine konstante Spannung von 30 V angelegt und so die Proteine aus dem Gel auf die Nitrocellulosemembran übertragen.

### 2.3.6 Färbung der Membran

Um die Vollständigkeit und Gleichmäßigkeit des Transfers zu beurteilen, wurde die Membran mit PonceauS-Färbelösung (Sigma, Taufkirchen, #P-7170) kurz auf einem Schüttler (IKA-Labortechnik, Staufen) inkubiert. Nach mehrfachem Spülen mit ddH<sub>2</sub>O wurde die Membran fotografiert und mit PBS wieder entfärbt. Zur Verminderung unspezifischer Bindungen, wurde die Membran vor der Antikörperinkubation mit 5% Trockenmilch (Santa Cruz, Santa Cruz, USA, #sc-2325) oder 5% BSA (Roth, Karlsruhe, #T8443) in TBS-T bei RT auf einem Schüttler etwa 1h inkubiert.

### 2.3.7 Proteindetektion

Zur Proteindetektion wurden nachfolgende Antikörper verwendet, die jeweils mit TBS-T auf die angegebenen Verdünnungen eingestellt werden:

Primäre Antikörper:

Maus-anti-STAT3	monoklonaler AK gegen den N-terminalen Bereich von STAT3; 1:2000 + 1% Trockenmilch (Transduction Laboratories, Heidelberg, #610190)
Kaninchen-anti-pSTAT3 <sup>Y705</sup>	polyklonaler AK gegen an Tyrosin 705 phosphoryliertes STAT3, 1:1000 + 5% BSA (CellSignaling, Frankfurt a. Main, #9131)
Kaninchen-anti-pSTAT3 <sup>Y727</sup>	polyklonaler AK gegen an Tyrosin 727 phosphoryliertes STAT3, 1:1000 + 5% BSA (CellSignaling, Frankfurt a. Main, #9134)
Kaninchen-anti-gp130	polyklonaler AK gegen gp130, 1:1000 + 5% BSA (CellSignaling, Frankfurt a. Main, #3732)
Maus-anti-Mcl1	monoklonaler AK gegen den N-terminalen Bereich von Mcl1 1:250 + 1% Trockenmilch (Transduction Laboratories, Heidelberg, #559027)
Kaninchen-anti-Bcl-xL	polyklonaler AK gegen Bcl-xL, 1:1000 + 5% Trockenmilch (Cell Signaling, Frankfurt a. Main, #2762)
Ziege-anti-Aktin	polyklonaler AK gegen Aktin, 1:500 + 1% Trockenmilch (SantaCruz, Santa Cruz, USA, #sc-1616)

Sekundäre Antikörper:

Ziege-anti-Maus	polyklonaler AK gegen Maus-IgG, HRP-konjugiert, 1:2000 + 1% Trockenmilch (SantaCruz, Santa Cruz, USA, #sc-2005)
Affe-anti-Kaninchen	polyklonaler AK gegen Kaninchen-IgG, HRP-konjugiert, 1:2000 + 1% Trockenmilch (SantaCruz, Santa Cruz, USA, #sc-2313)

Rind-anti-Ziege                      polyklonaler AK gegen Ziegen-IgG, HRP-konjugiert,  
1:2000 + 1% Trockenmilch (SantaCruz, Santa Cruz,  
USA, #sc-2350)

Die Inkubation der Membran mit dem primären Antikörper erfolgte auf einem Schüttler bei 4 °C über Nacht oder für eine Stunde bei Raumtemperatur. Durch mehrmaliges Waschen mit TBS-T wurde die Membran von nicht gebundenem AK befreit und unter Schütteln bei RT mit sekundärem AK eine Stunde inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde die Membran mit den Lösungen A und B des Western Blotting Luminol Reagenz (SantaCruz, Santa Cruz, USA, #sc-2048) im Verhältnis 1:1 für etwa eine Minute bedeckt und unter Rotlicht in einer Plastikfolie auf einen 13x18 cm-Röntgenfilm (Fuji Film, Düsseldorf) aufgelegt. In einer Röntgenkassette eingeschlossen, wurde der Film je nach Stärke des Signals für 1-10 min belichtet. Die Filmentwicklung erfolgte durch Entwickler-(#103482) und Fixierer-(#103655) Lösungen von Tetenal (Norderstedt).

## **2.4 Indirekte Immunfluoreszenz**

Für Immunfluoreszenzfärbungen wurden Zellen auf zweikammerigen Plättchen kultiviert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen durch Zugabe von 4% PFA (Sigma, Taufkirchen, #P-6148) für 15 min bei RT fixiert und nach Entfernung des PFA durch PBS mit 0,1% (v/v) TritonX-100 (Sigma, Taufkirchen, #X-100) und 0,1 M Glycin (Sigma, Taufkirchen, #G-8790) in PBS für 15 min bei RT permeabilisiert. Um unspezifische Antikörperbindungen zu reduzieren, wurden die permeabilisierten Zellen für 15min mit 3% BSA in PBS inkubiert.

Die AK wurden jeweils mit 3% BSA (w/v) in PBS auf die angegebenen Verdünnungen eingestellt:

Primäre Antikörper:

Maus-anti-CVB3	monoklonaler AK gegen das virale Kapsidprotein VP1, 1:200 (Chemicon, Temecula, USA, #MAB948)
Kaninchen-anti-gp130	polyklonaler AK gegen gp130, 1:50 (SantaCruz, Santa Cruz, USA, # sc-9048)
Kaninchen-anti-pSTAT3 <sup>Y705</sup>	polyklonaler AK gegen an Tyrosin 705 phosphoryliertes STAT3, 1:1000 + 5% BSA (CellSignaling, Frankfurt a. Main, #9131)

Sekundäre Antikörper:

Ziege-anti-Maus IgG	AK gegen die schweren und leichten Ketten von Maus-IgG, 1:200 (Molecular Probes, Eugene, USA, AlexaFluor 488)
Ziege-anti-Kaninchen	AK gegen die schweren und leichten Ketten von Kaninchen-IgG, 1:200 (Molecular Probes, Eugene, USA, AlexaFluor 594)

Die AK-Inkubation mit den fixierten Zellen erfolgte sowohl für primäre als auch für sekundäre AK unter gleichen Bedingungen. Es wurden je 100 µl der AK-Verdünnungen auf die Zellen aufgebracht, durch Bedeckung mit Parafilm (American National Can<sup>TM</sup>, Chicago) vor Austrocknung bewahrt und so bei 37 °C für 1h inkubiert. Nach den Inkubationen erfolgten jeweils mehrfache Waschschrte mit PBS, um rückständige AK-Reste zu entfernen.

Bei allen Immunfluoreszenzfärbungen wurde eine abschließende Kernfärbung durchgeführt. Diese erfolgt mit Hoechst Dye (Molecular Probes, Eugene, USA, #33342) in einer 1:1000-Verdünnung mit ddH<sub>2</sub>O für 15 min bei 37 °C. Die Zellplättchen wurden nach einigen Waschschrten mit einem Zellstofftuch getrocknet. Nach Aufbringen eines Tropfens DAKO Fluoreszenz Mounting Mediums (Sigma, Taufkirchen, #S3023) in die Mitte des Plättchens wurden ein Deckgläschen aufgelegt und die Zellplättchen bei 4 °C gelagert.



## **2.5 Isolierung und Analyse von Plasmid-DNA**

### **2.5.1 Transformation von Bakterien**

50 µl DH5α kompetente E.Coli-Zellen (Gibco BRL, Eggenstein, #2793) wurden mit 0,1 µg Plasmid-DNA versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde für exakt 90 sec bei 42 °C ins Wasserbad gestellt und nach ein bis zwei Minuten auf Eis direkt in ein belüftetes Falcon-Röhrchen (BD, Heidelberg, #2059) zu 950 µl LB-Medium überführt. Nach 45 min Inkubation auf einem Schüttler bei 37 °C wurden 100 µl des Ansatzes auf einer LB-Agarplatte (+100 µg/ml Ampicillin) ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

### **2.5.2 Präparation von Plasmid-DNA**

Jeweils eine angewachsene Kolonie wurde mit einer Pipettenspitze aus dem Agar gestanzt, in 5 ml LB-Medium (+50 µg/ml Ampicillin) eines belüfteten Falcons abgeworfen und auf einem Schüttler bei 37 °C über Nacht inkubiert. Von dieser Bakterienkultur wurden 500 µl abgenommen und in 250 ml LB-Medium (+50 µg/ml Ampicillin) eines Erlenmeyerkolbens über Nacht bei 37 °C auf einem Schüttler inkubiert. Diese Kultur wurde in einen Plastik-Zentrifugationsbecher gefüllt und für 20 min mit 6000 x g bei 4 °C (wie auch die folgenden Zentrifugationsschritte) in einer Sorvall®RC 5B plus Zentrifuge (Asheville, USA) zentrifugiert. Die Aufreinigung der amplifizierten Plasmid-DNA aus den E.Coli Zellen erfolgte mit dem QIAfilter™ Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden, #12263).

Hierfür wurde das Zellpellet nach Angaben des Herstellers mit Puffer 1 (+RNase), Puffer 2 und gekühltem Puffer 3 versetzt, resuspendiert und so lysiert. Nach 10 min Inkubation in einer QIAfilter Säule wurde das Lysat mit einem Stempel in eine mit Puffer QBT equilibrierte QIAGEN-tip 500 Filtersäule gedrückt. Das Lysat wurde durch die Säule hindurch laufen gelassen, wobei Plasmid-DNA im Filter zurückgehalten wurde. Nach zwei Wachsritten mit Puffer QC wurde die Plasmid-DNA mit Puffer QF aus dem Filter eluiert und in einem gebackenen Corex-Glasröhrchen aufgefangen. Die DNA wurde durch Zugabe von Isopropanol

präzipitiert und mit 15000 g für 30 min bei 4 °C sedimentiert. Durch Zugabe von 70% Ethanol und vorsichtigem Resuspendieren wurde die DNA gewaschen und erneut mit 15000 g für 20 min bei 4 °C sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet für 10min luftgetrocknet und in 100 µl TE-Puffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA) aufgenommen. Die Lagerung erfolgte bei –20 °C in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß.

### 2.5.3 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die quantitative Konzentrationsbestimmung der isolierten Plasmid-DNA erfolgte photometrisch mit einem Gene Quant Pro Photometer (Amersham, Freiburg, #80211498). Hierzu wurde eine 1:100-Verdünnung der DNA mit ddH<sub>2</sub>O hergestellt und die optische Dichte (OD) bei 260 nm gemessen. Die DNA-Konzentration wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{DNA } [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = \frac{\text{OD}_{260\text{nm}} \times 50 \times \text{Verdünnung}}{1000}$$

Als Maß für die Reinheit der RNA wurde der Quotient der Absorption 260<sub>nm</sub>/280<sub>nm</sub> bestimmt (Soll: 1,8-2,0) (Sambrook, 1989). Die Lagerung der DNA erfolgte bei –20 °C.

### 2.5.4 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA

Restriktionsverdau von Plasmiden werden mit Enzymen von MBI Fermentas (St. Leon-Rot) und den jeweils von Fermentas empfohlenen Puffern in 0,5 ml Eppendorf-Gefäßen mit folgenden Reaktionsansätzen durchgeführt:

1 µl Restriktionsenzym  
2 µl (10x) Restriktionspuffer  
0,1 – 1 µg Plasmid-DNA  
ad 20 µl ddH<sub>2</sub>O

Die Inkubation erfolgt bei 37 °C in einem Heraeus-Brutschrank für 1-3 h.

### **2.5.5 DNA-Gelelektrophorese**

Die DNA-Proben (siehe 2.3.4) wurden mit 10x BlueJuice™ Gel-Lade-Puffer (f.c. 1x) gemischt und in die Taschen eines 1%-igen Gels (siehe Kap. 9) in einer Elektrophorese-Kammer (siehe 2.3.6) geladen. Unter Pufferung mit 1x TBE-Puffer wurden die DNA-Fragmente bei 110 V für 90-120 min ihrer Größe entsprechend elektrophoretisch aufgetrennt. Als DNA-Längenstandard wurden 10µl GeneRuler™ DNA Ladder Mix verwendet. Zur Dokumentation wurden die Gele nach Beendigung der Elektrophorese unter UV-Licht fotografiert.

## **2.6 Bestimmung der Spaltungswahrscheinlichkeiten von Proteinen durch coxsackievirale Proteasen 2A und 3C**

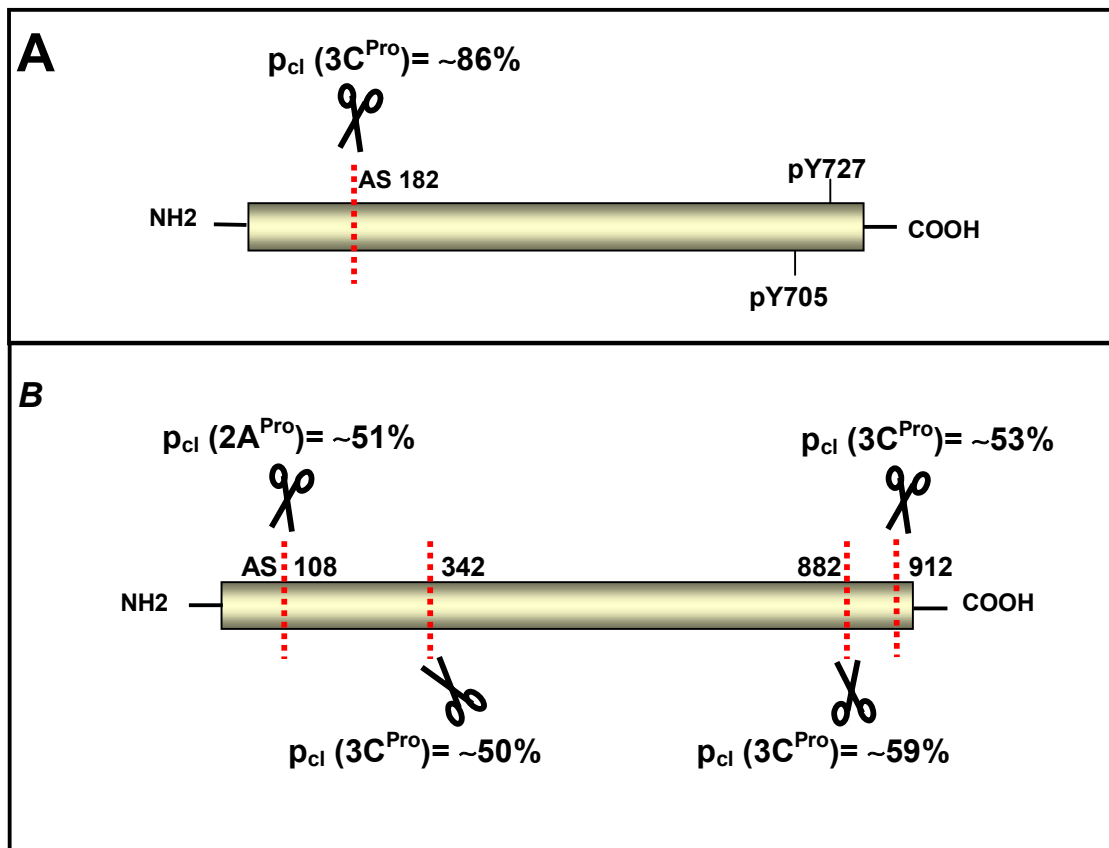
Die Wahrscheinlichkeit, mit der bestimmte Proteine durch enterovirale Proteasen proteolytisch gespalten werden, wurde anhand des NetPicoRNA V1.0 Programmes (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPicoRNA>) untersucht (Blom, 1996). Die jeweiligen Proteinsequenzen wurden den Pubmed-Datenbanken (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed>) entnommen, in das Programm eingefügt und von dem Programm auf die prozentuelle Spaltungswahrscheinlichkeit durch die virale Protease 2A oder 3C der Proteine hin untersucht.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Analyse der Schnittwahrscheinlichkeit von Proteinen durch enterovirale Proteasen 2A und 3C

Durch einen 2-Hybrid-Screen (Fields, 1989, 1994) konnten potenzielle zelluläre Bindungspartner der enteroviralen Proteasen 2A und 3C identifiziert werden. Hierzu gehören neben STAT3 auch gp130. Diese Proteine wurden mittels des NetPicoRNA V1.0 Software-Programms auf die Wahrscheinlichkeit einer Spaltung durch enterovirale Proteasen untersucht. Abbildung 4 zeigt die schematische Darstellung der untersuchten Proteine. Es sind die berechneten prozentualen Schnittwahrscheinlichkeiten durch die jeweilige Protease sowie die entsprechenden prognostizierten Aminosäurepositionen innerhalb des jeweiligen Proteins dargestellt.

Die Wahrscheinlichkeit einer Spaltung von STAT3 durch die enterovirale Protease 3C ist an Aminosäureposition 182 mit 86% am höchsten aller untersuchten Proteine. Für gp130 sind eine Schnittstelle durch die 2A-Protease mit einer Wahrscheinlichkeit von ~51% an Position 108 und drei weitere für die 3C-Protease mit Wahrscheinlichkeiten von 50, 53 und 59% an AS-Position 342, 912, 882 berechnet worden.



**Abb.4** Schematische Darstellung der berechneten Schnittwahrscheinlichkeiten von STAT3 und gp130 durch die enteroviralen Proteasen 2A und 3C.

**A.** STAT3 (771 AS); **B.** gp130 (918 AS).  $p_{cl}$  = Schnittwahrscheinlichkeit. Die Schnittwahrscheinlichkeiten der Proteine durch enterovirale Proteasen wurde mittels des NetPicoRNA-Softwareprogrammes ermittelt.

### 3.2. Untersuchung der prognostizierten Spaltungen von STAT3 gp130 mittels Westernblot

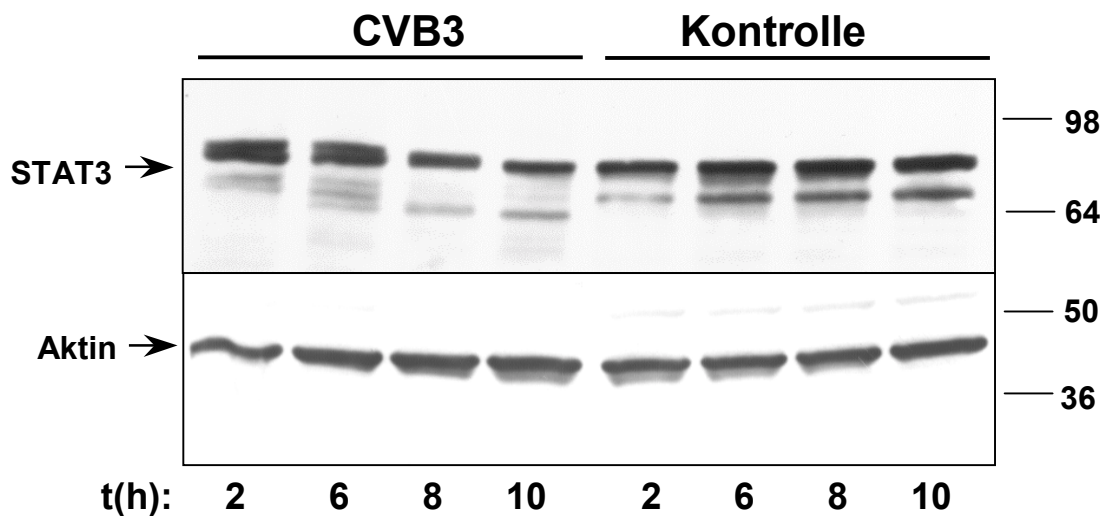
Zur Überprüfung, inwieweit die theoretisch prognostizierten Wahrscheinlichkeiten des Softwareprogrammes zutreffend sind, wurde ein HeLa-Zellkultursystem angewandt.

Um einer zellulären Infektion im Rahmen einer viralen Herzerkrankung nahezukommen, wurden adhärent kultivierte HeLa-Zellen mit Coxsackievirus B3 infiziert. Nach einstündiger Stimulation der HeLa-Zellen mit CT-1 (2 ng/ml) oder

LIF (2 ng/ml), beides potente Induktoren des IL-6-Typ-Signaltransduktionsweges, wurden Proteinlysate zu unterschiedlichen Zeitpunkten hergestellt. Diese wurden mittels Westernblot auf die angegebenen Proteine hin untersucht und kommen in den folgenden Abbildungen zur Darstellung.

### **3.2.1 Spaltung von STAT3 nach coxsackieviraler Infektion**

Abbildung 5 zeigt eine Westernblot-Darstellung des etwa 92 kDa großen Signaltransduktionsmoleküls STAT3, welches Zytokinsignale (z.B. CT-1, LIF, IL-6) u.a. vom IL-6-Rezeptor zum Zellkern vermittelt und so die Transkription bestimmter Zielgene induziert. Verwendet wurde ein 6%-iges Tris-Glycine-Gel, wodurch eine gute Auftrennung in dem dargestellten kDa-Bereich ermöglicht wird. In dieser Abbildung erkennt man eine Abnahme der STAT3-Banden-Intensität CVB3-infizierter Zellen mit zunehmender Infektionsdauer. Zudem tritt bereits ab zwei, deutlich jedoch nach sechs Stunden Infektionsdauer eine Aufteilung der ursprünglichen STAT3-Banden sowie deren Verschiebung („Shift“) nach unten mit gleichzeitigem Verlust der ursprünglichen Bande auf. In den nicht-infizierten Kontrollzellen bleibt STAT3 zu jedem Zeitpunkt nahezu unverändert.

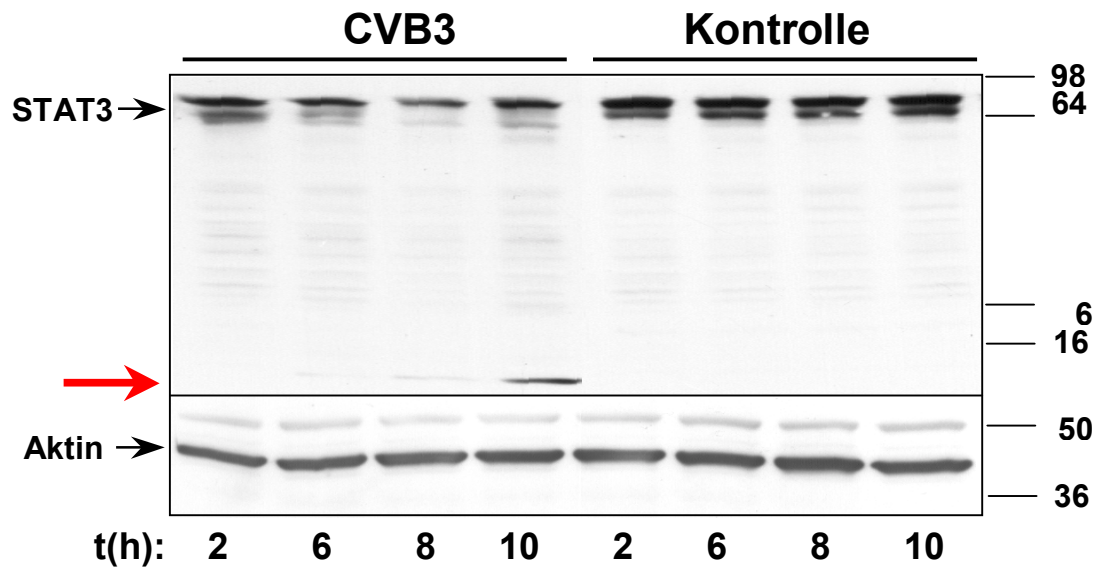


**Abb.5 Spaltung von STAT3 nach CVB3-Infektion in HeLa-Zellen**

Westernblot, STAT3 und Aktin. Shift der STAT3-Bande in den CVB3-infizierten HeLa-Zellen als Hinweis auf eine Spaltung durch CVB3. Aktinlevels bleiben unbeeinflusst. *Linke Hälfte:* STAT3 (oben) und Aktin (unten) CVB3-infizierter HeLa-Zellen (CVB3) nach 2, 6, 8, 10 h. *Rechte Hälfte:* STAT3 (oben) und Aktin (unten) nicht-infizierter HeLa-Zellen (Kontrolle) nach 2, 6, 8, 10 h.

Abbildung 6 zeigt ebenfalls eine Westernblot-Darstellung von STAT3. In diesem Fall wurde ein 18%-iges Tris-Glycine-Gel verwendet, welches eine gute Auftrennung im niederen kDa-Bereich ermöglicht.

Man erkennt auch in dieser Abbildung, dass ein Shift der STAT3-Bande (92kDa) nach unten auftritt, welcher sich mit zunehmender Infektionsdauer verstärkt. In dieser Darstellung wird jedoch zusätzlich im Bereich zwischen 6 und 16 kDa eine neu auftretende Bande, beginnend mit 6 Stunden Infektionsdauer, durch den STAT3-Antikörper detektiert. Diese Bande nimmt im zeitlichen Verlauf sichtbar an Intensität zu. In den nicht-infizierten Kontrollzellen zeigt sich keine Veränderung. Der Shift der STAT3-Bande nach unten und die etwa zeitgleich neu auftretende Bande deuten darauf hin, dass STAT3 im HeLa-Zellkultursystem ursächlich durch das Coxsackievirus B3 proteolytisch gespalten wird.



**Abb.6 Spaltung von STAT3 und Auftreten eines Spaltproduktes von STAT3 nach CVB3-Infektion in HeLa-Zellen**

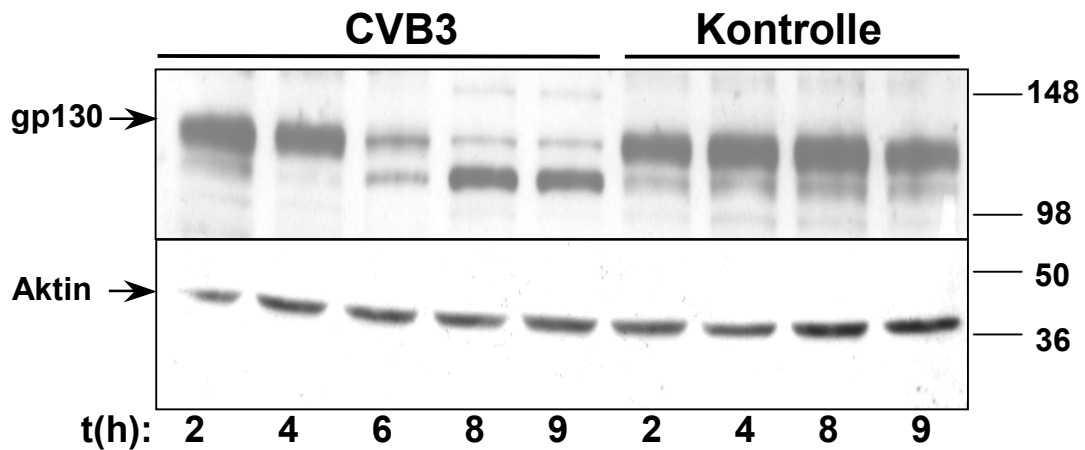
Westernblot, STAT3 und Aktin. Shift der STAT3-Bande in CVB3-infizierten HeLa-Zellen, sowie Auftreten einer zusätzlichen Bande im Bereich zwischen 6 und 16 kDa (siehe roter Pfeil). Aktinlevels bleiben unbeeinflusst. *Linke Hälfte:* STAT3 (oben) und Aktin (unten) CVB3-infizierter HeLa-Zellen (CVB3) nach 2, 6, 8, 10h. *Rechte Hälfte:* STAT3 (oben) und Aktin (unten) nicht-infizierter HeLa-Zellen (Kontrolle) nach 2, 6, 8, 10h.

### 3.2.2 Spaltung von gp130 nach coxsackieviraler Infektion

Abbildung 7 zeigt die proteinschemische Darstellung von gp130, einer Zytokinrezeptoruntereinheit des IL-6-Rezeptors. Die Banden-Intensität des etwa 130 kDa großen Proteins nimmt beginnend mit 6 h CVB3-Infektionsdauer deutlich ab und vermindert sich nach 8 h und 9 h weiter. Es kommt zudem zu einem gleichzeitigem Auftreten einer neuen, tieferliegenden Bande, die mit der Abnahme von gp130 an Intensität gewinnt. In den nicht-infizierten Kontrollzellen bleibt gp130 unverändert.

Dieses Westernblot-Ergebnis belegt die Spaltung von gp130 im HeLa-Zellkultursystem nach CVB3-Infektion.





**Abb.7 Spaltung von gp130 nach CVB3-Infektion in HeLa-Zellen**

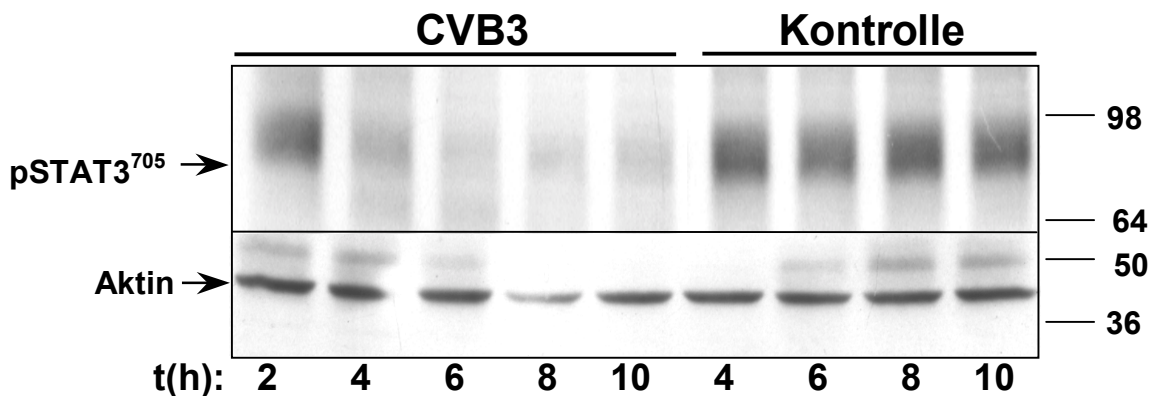
Westernblot, gp130 und Aktin. Shift der gp130-Bande in CVB3-infizierten HeLa-Zellen beginnend mit 6 h Infektionsdauer. Aktinlevels bleiben unbeeinflusst. *Linke Hälfte:* gp130 (oben) und Aktin (unten) CVB3-infizierter HeLa-Zellen (CVB3) nach 2, 4, 6, 8, 9 h. *Rechte Hälfte:* gp130 (oben) und Aktin (unten) nicht-infizierter HeLa-Zellen (Kontrolle) nach 2, 4, 8, 9 h.

### 3.3 Untersuchung der Auswirkung einer Spaltung von gp130 und STAT3 auf downstream gelegene Proteine des IL-6-Signalings

Um zu untersuchen, ob die bei STAT3 und gp130 beobachteten Veränderungen aufgrund einer coxsackieviralen Infektion Auswirkungen auf „downstream“-gelegene Proteine haben, wurden erneut Westernblot-Untersuchungen durchgeführt. Hierbei wurden neben phosphorylierten STATs (pSTAT3<sup>Tyr705</sup>; pSTAT3<sup>Tyr727</sup>) auch die anti-apoptisch wirkenden Proteine Bcl-xL und Mcl-1 untersucht, welche unter transkriptioneller Kontrolle der JAK/STAT-Signalkaskade via gp130, LIFR und STATs stehen.

### 3.3.1 Abnahme von pSTAT3<sup>Tyr705</sup> nach CVB3-Infektion

STAT3 wird nach Zellstimulation mit Zytokinen, wie IL-6, CT-1 oder LIF, zunächst am Tyrosinrest 705 phosphoryliert und somit aktiviert. In Abbildung 8 ist das etwa 92 kDa große Phospho-STAT3<sup>Tyr705</sup> in Abhängigkeit coxsackieviraler Infektion dargestellt. Es zeigt sich, dass an Tyrosinrest 705 phosphoryliertes STAT3 mit zunehmender Infektionsdauer abnimmt und nach sechs Stunden CVB3-Infektion nahezu nicht mehr vom P-STAT3-Antikörper detektiert werden kann. In den nicht-infizierten Kontrollzellen bleibt die Nachweisbarkeit von pSTAT3<sup>Tyr705</sup> unverändert. Dies zeigt, dass aufgrund der gesehenen Alterationen der „upstream“ von pSTAT3<sup>Tyr705</sup> gelegenen Proteine (LIFR, STAT3, gp130) die Phosphorylierung von STAT3, welche vorwiegend an der IL-6-Rezeptoruntereinheit gp130 erfolgt, erheblich attenuiert ist.

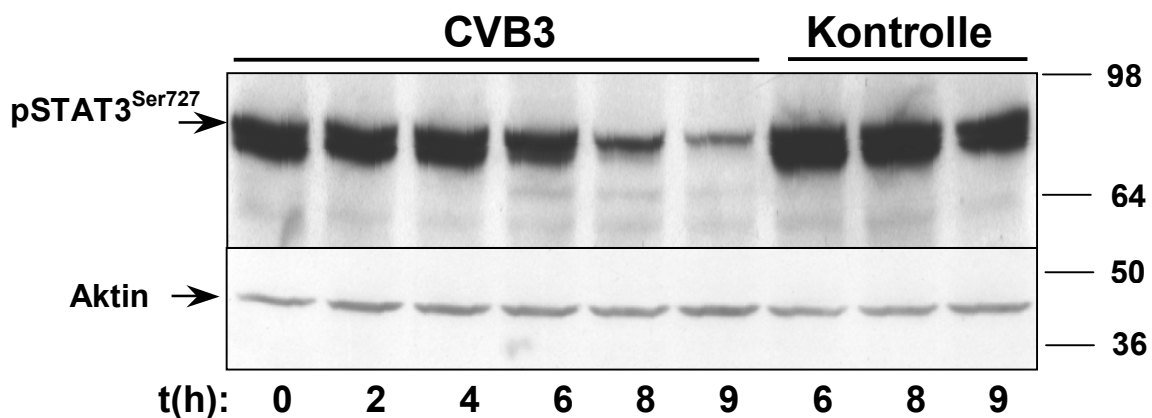


**Abb.8 Abnahme von pSTAT3<sup>Tyr705</sup> nach CVB3-Infektion in HeLa-Zellen**

Westernblot, pSTAT3<sup>Tyr705</sup> und Aktin. Es zeigt sich eine Abnahme von pSTAT3<sup>Tyr705</sup> beginnend mit 4 h CVB3-Infektion. Aktinlevels bleiben unbeeinflusst. *Linke Hälfte:* pSTAT3<sup>Tyr705</sup> (oben) und Aktin (unten) CVB3-infizierter Zellen (CVB3) nach 2, 4, 6, 8, 10 h. *Rechte Hälfte:* pSTAT3 (oben) und Aktin (unten) nicht-infizierter Kontrollzellen (Kontrolle) nach 4, 6, 8, 10 h.

### 3.3.2 Abnahme von pSTAT3<sup>Ser727</sup> nach CVB3-Infektion

pSTAT3<sup>Tyr705</sup> wird im Zellkern von zellulären Serin-Kinasen erneut phosphoryliert (an Aminosäure-Position Serin727) und kann so an bestimmte DNA-Motive binden, um die Transkription STAT-spezifischer Gene zu induzieren. In Abbildung 9 ist dieses pSTAT3<sup>Ser727</sup> dargestellt. Vergleichbar mit pSTAT3<sup>Tyr705</sup> nimmt auch pSTAT3<sup>Ser727</sup> aufgrund der Unterbrechung des IL-6-Signalweges beginnend mit etwa 6 h CVB3-Infektion in HeLa-Zellen zunehmend ab. Dies unterstreicht die Relevanz der Unterbrechung der IL-6-Signalkaskade durch die beschriebene proteolytische Spaltung von gp130 und STAT3. Die Kontrollen bleiben in dieser Darstellung nahezu unverändert.



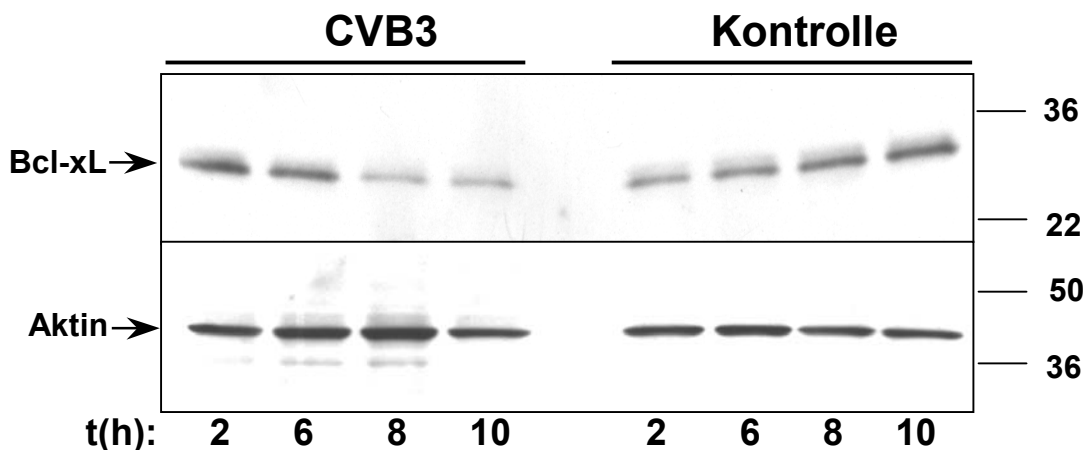
**Abb.9 Abnahme von pSTAT3<sup>Ser727</sup> nach CVB3-Infektion in HeLa-Zellen**

Westernblot, pSTAT3<sup>Ser727</sup> und Aktin. Es zeigt sich eine Abnahme von pSTAT3<sup>Ser727</sup> beginnend mit 6 h CVB3-Infektion. Aktinlevels bleiben unbeeinflusst. *Linke Hälfte:* pSTAT3<sup>Ser727</sup> (oben) und Aktin (unten) CVB3-infizierter Zellen (CVB3) nach 0, 2, 4, 6, 8, 9 h. *Rechte Hälfte:* pSTAT3 (oben) und Aktin (unten) nicht-infizierter Kontrollzellen (Kontrolle) 6, 8, 9 h.

### 3.3.3 Abnahme von Bcl-xL nach CVB3-Infektion

Die Transkription von Bcl-xL, einem anti-apoptotisch wirkendem Protein der Bcl-2-Familie, wird u.a. durch den IL-6-Signalweg via STAT3 reguliert. Unter diesem Aspekt wurde Bcl-xL mittels Westernblot im Zusammenhang mit einer CVB3-Infektion untersucht. Abbildung 10 zeigt, dass Bcl-xL nach 8 h CVB3-Infektion in HeLa-Zellen vermindert wird, jedoch nach 10 h Infektion noch nachweisbar ist. In den Kontrollzellen bleibt Bcl-xL nahezu unverändert.

Dies ist der Beleg dafür, dass vermindertes pSTAT3<sup>Ser727</sup> seine transkriptionelle Aktivität, zumindest zum Teil, einbüßt und somit bestimmte Zielgene, wie Bcl-xL, nur noch auf niedrigerem Level transkribiert werden können.

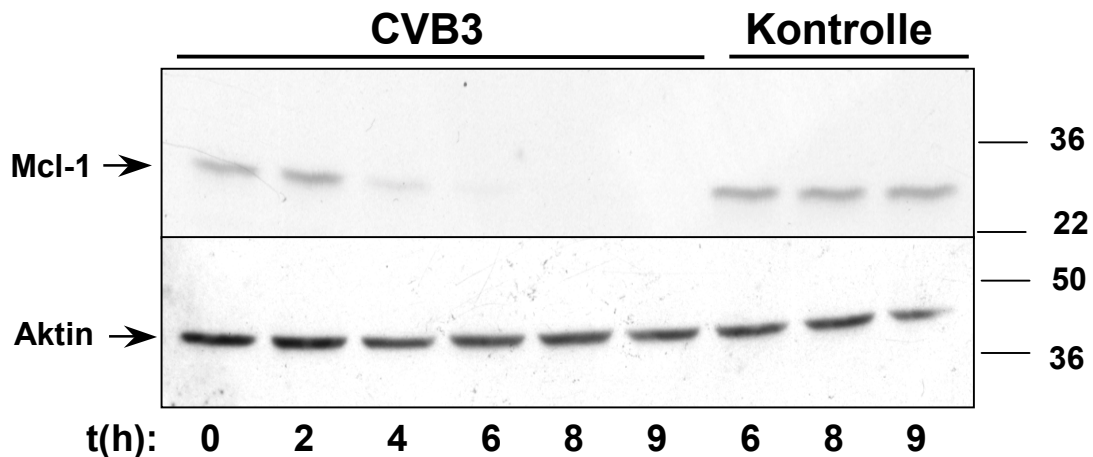


**Abb.10 Abnahme von Bcl-xL nach CVB3-Infektion in HeLa-Zellen**

Westernblot, Bcl-xL und Aktin. Bcl-xL nimmt nach etwa 8 h CVB3-Infektion in HeLa-Zellen ab. Aktinlevels bleiben unbeeinflusst. *Linke Hälfte:* Bcl-xL (oben) und Aktin (unten) CVB3-infizierter HeLa-Zellen (CVB3) nach 2,6,8 und 10 h. *Rechte Hälfte:* Bcl-xL (oben) und Aktin (unten) nicht-infizierter Kontrollzellen (Kontrolle) nach 2,6,8,10 h.

### 3.3.4 Abnahme von Mcl-1 nach CVB3-Infektion

Mcl-1 ist ebenso wie Bcl-xL ein Protein der Bcl-2-Familie und vermittelt anti-apoptotische Signale. In gleicher Weise wie Bcl-xL wird dessen Transkription u.a. durch STAT3 induziert. In Abbildung 11 wird Mcl-1 mittels der Westernblottechnik in Abhängigkeit einer coxsackieviralen Infektion dargestellt. Ähnlich dem Bcl-xL ist auch hier eine Reduktion der Banden-Intensität für Mcl-1 aufgrund der Reduktion von pSTAT3<sup>Ser727</sup> und pSTAT3<sup>Tyr705</sup> erkennbar. Zwei Stunden post-infektionem deutet sich eine Verminderung an, die bereits nach vier Stunden manifest wird. Nach acht Stunden ist Mcl-1 nicht mehr vom Mcl-1-Antikörper detektierbar. In nicht-infizierten HeLa-Zellen bleibt Mcl-1 als Kontrolle unverändert.



**Abb.11 Abnahme von Mcl-1 nach CVB3-Infektion in HeLa-Zellen**

Westernblot Mcl-1 und Aktin. Mcl-1 nimmt nach CVB3-Infektion in HeLa-Zellen beginnend mit 4h Infektionsdauer ab und ist bereits nach 8 h nicht mehr detektierbar. Aktinlevels bleiben unbeeinflusst. *Linke Hälfte:* Mcl-1 (oben) und Aktin (unten) CVB3-infizierter Zellen (CVB3) nach 0, 2, 6, 8 und 9 h. *Rechte Hälfte:* Darstellung von Mcl-1 (oben) und Aktin (unten) nicht-infizierter Kontrollzellen (Kontrolle) nach 6, 8, 9 h.

### 3.4 Immunfluoreszenzfärbungen CVB3-infizierter HeLa-Zellen

Um das zelluläre Verteilungsmuster, bzw. mögliche Veränderungen von Mediatoren des IL-6-Signaltransduktionsweg in der infizierten Zelle sichtbar zu machen, wurden indirekte Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Hierbei wurden in zweikammerigen Plättchen kultivierte HeLa-Zellen mit CVB3 infiziert, jeweils eine Stunde vor der Fixierung mit LIF stimuliert (je 2 ng/ml) und daraufhin Immunfluoreszenzfärbungen für die angegebenen Strukturen durchgeführt.

#### 3.4.1 Verlust der Phosphorylierung von STAT3 an Tyr705 nach CVB3-Infektion in HeLa-Zellen

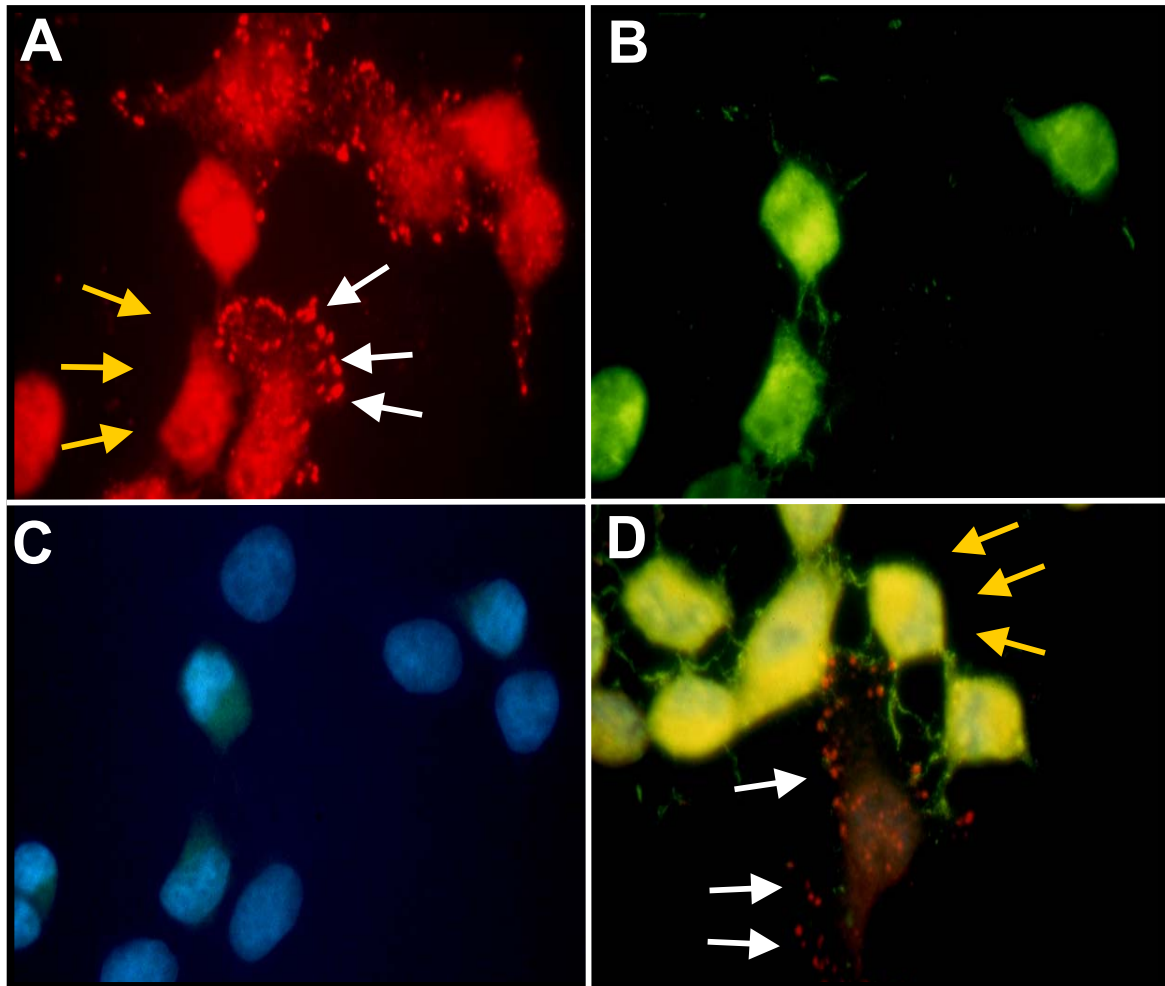
Abbildung 12 zeigt vier Bilder indirekter Immunfluoreszenz-färbungen von CVB3-infizierten und nicht-infizierten HeLa-Zellen.

Bild A zeigt hierbei die Färbung von phosphoryliertem STAT3 an Tyrosinposition 705. Bild B zeigt die Immunfluoreszenzfärbung der Coxsackieviren in infizierten HeLa-Zellen, wobei nicht-infizierte Zellen keine Fluoreszenz zeigen. In Bild C ist die Färbung der HeLa-Zellkerne abgebildet.

Es ist zu erkennen, dass pSTAT3<sup>Tyr705</sup> in nicht-infizierten HeLa-Zellen ein anderes Verteilungsmuster aufweist, als in den infizierten Zellen. So ist, im Unterschied zu CVB3-negativen Zellen, in CVB3-positiven Zellen kein membranständiges pSTAT3<sup>Tyr705</sup> nachweisbar. Dies ist in Bild A deutlich an den fehlenden rotgefärbten Verdichtungen im Bereich der Zellmembran in infizierten Zellen zu erkennen. Dies deutet darauf hin, dass die Rekrutierung von STAT3, aufgrund der Unterbrechung der IL6-Signalkaskade upstream von pSTAT3<sup>Tyr705</sup> nicht mehr stattfindet und hierdurch die Phosphorylierung von STAT3 an Rezeptoruntereinheiten des IL-6-Rezeptors (gp130, u.a.) ausbleibt.

In Bild D sind eine pSTAT3<sup>Tyr705</sup>-Färbung (rot) von HeLa-Zellen und die entsprechende CVB3-Färbung (grün) übereinandergelegt. Hier erkennt man im direkten Vergleich, dass pSTAT3<sup>Tyr705</sup> in nicht-infizierten Zellen an der Zellmembran vorhanden ist, wohingegen es in CVB-infizierten HeLa-Zellen an der Zellmembran vollkommen fehlt. Dies bestärkt die Ergebnisse der Westernblot-

Untersuchungen, mit denen bereits gezeigt werden konnte, dass pSTAT3<sup>Tyr705</sup> mit zunehmender Infektionsdauer an Intensität verliert.



**Abb.12 Verminderung von membranständigem pSTAT3<sup>Tyr705</sup> als Zeichen einer reduzierten Phosphorylierung und Rekrutierung an die Zellmembran**

Indirekte Immunfluoreszenzfärbung in HeLa-Zellen. 6 h Infektionsdauer.

**A.** pSTAT3<sup>Tyr705</sup>-Färbung **B.** CVB3-Färbung **C.** Kernfärbung

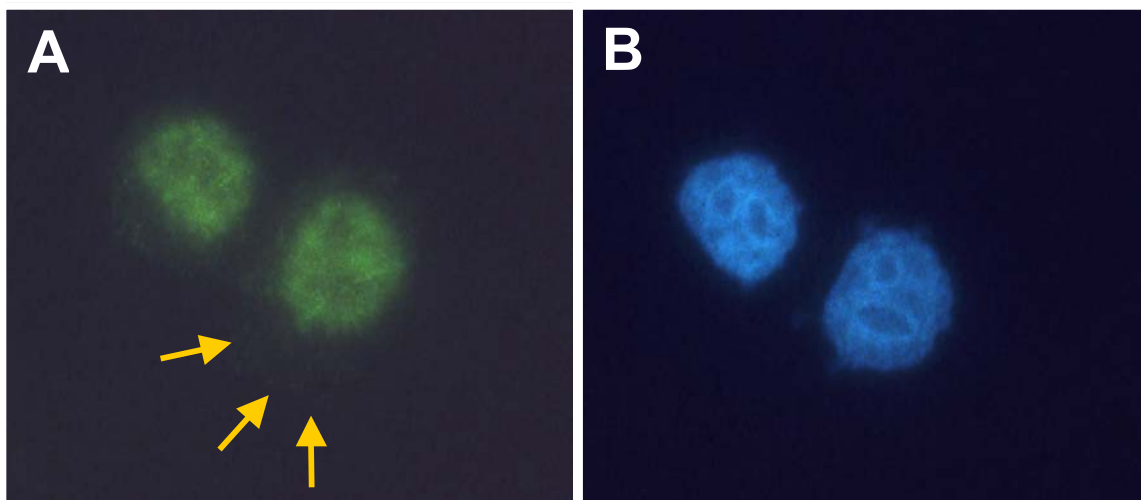
**D.** pSTAT3<sup>Tyr705</sup>-Färbung + CVB3-Färbung (Vergrößerung: 400x). A, B und C zeigen jeweils gleiche Bildausschnitte.

In nicht-infizierten Zellen ist membranständiges pSTAT3<sup>Tyr705</sup> (A, D) als Zeichen für die Phosphorylierung an rezeptorständigen Kinasen erkennbar (weisse Pfeile). Diese Rekrutierung an die Zellmembran fehlt in CVB3-infizierten Zellen durch Unterbrechung des IL-6-Signalings vollständig (orangene Pfeile).

In Abbildung 13 ist eine indirekte Immunfluoreszenzfärbung von HeLa-Zellen dargestellt, welchen 12 h vor der Färbung das Serum entzogen wurde und die nicht wie oben beschrieben mit CT-1 stimuliert wurden. Der IL-6-Signalweg ist infolgedessen mangels Stimuli nicht oder nur sehr gering aktiv.

Hierdurch soll eine Situation dargestellt werden, wie sie während einer Infektion mit CVB3 vorkommt. In CVB3-infizierten Zellen ist der IL-6-Signalweg, wie bereits durch Westernblot Untersuchungen gezeigt werden konnte (s.o.), durch Spaltung von STAT3 sowie der Rezeptoruntereinheit gp130 grösstenteils unterbunden.

Man kann in dieser Abbildung erkennen, dass diese Abbildung vom pSTAT3<sup>Tyr705</sup>-Färbungsmuster der Färbung in CVB3-infizierten Zellen ähnelt. Es ist hier kein membranständiges pSTAT3<sup>Tyr705</sup> erkennbar, was somit auf das Ausbleiben von Phosphorylierungsaktivität hindeutet.



**Abb.13 pSTAT3<sup>Tyr705</sup>-Färbung in quieszenten Zellen**

Indirekte Immunfluoreszenz in HeLa-Zellen. 12 h ohne FCS sowie ohne CT-1-Stimulation.

**A.** pSTAT3<sup>Tyr705</sup>-Färbung **B.** Kernfärbung. (A) und (B) zeigen den gleichen Ausschnitt.

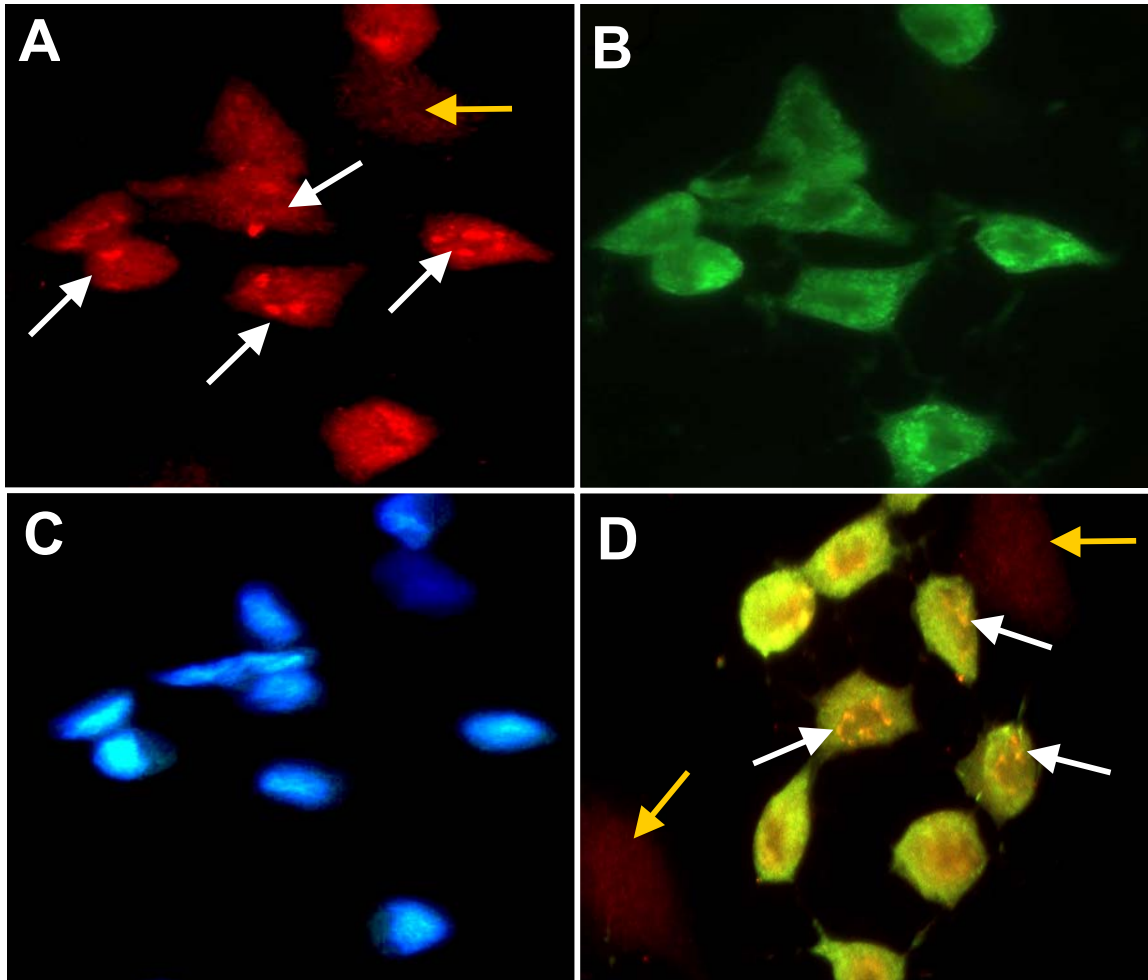
Durch fehlende Stimulierung des IL-6-Signalweges kann rezeptorständiges pSTAT3<sup>Tyr705</sup> als Zeichen für aktive Phosphorylierung nicht nachgewiesen werden. Die orangenen Pfeile in (A) zeigen auf das Niveau der Zellmembran, an der eine pSTAT3<sup>Tyr705</sup>-Anfärbung unter Stimulation zu erwarten wäre. Dies entspricht in etwa der Situation in CVB3-infizierten Zellen (vergl. Abb.12).



### **3.4.2 Zellulärer Phänotyp von gp130 in CVB3-infizierten HeLa-Zellen**

Abbildung 14 zeigt vier Immunfluoreszenz-Darstellungen. Bild A zeigt eine gp130-Färbung. Bild B zeigt die zugehörige CVB3-Färbung, wobei nicht-infizierte Zellen keine Fluoreszenz zeigen. In Bild C ist die immunfluoreszenztechnische Darstellung der HeLa-Zellkerne abgebildet. In Bild D sind eine gp130-Färbung (rot) mit der entsprechenden CVB3-Färbung (grün) übereinandergelegt.

Insgesamt wird deutlich, dass spezifisch in CVB3-infizierten HeLa-Zellen zelluläre Verdichtungen hervortreten (siehe Pfeile in Bild A), die in nicht-infizierten Zellen nicht nachweisbar sind. In Bild D wird dabei besonders deutlich, dass sich diese schollenartigen Veränderungen vorwiegend um den Zellkern gruppieren.



**Abb.14 Zellulärer Phänotyp der Rezeptoruntereinheit gp130 in CVB3-infizierten HeLa-Zellen**

Indirekte Immunfluoreszenzfärbung in HeLa-Zellen. 6 h Infektionsdauer.

**A.** gp130-Färbung **B.** CVB3-Färbung **C.** Kernfärbung **D.** gp130+CVB3-Färbung (Vergrößerung: 400x). A, B und C zeigen jeweils den gleichen Bildausschnitt.

In der gp130-Färbung (A, D) CVB3-infizierter HeLa-Zellen zeigen sich schollenartige Verdichtungen, die sich um den Zellkern gruppieren (weisse Pfeile) als Hinweis auf eine Alteration von gp130 im Rahmen einer Infektion mit CVB3. Dieser Nachweis fehlt in nicht-infizierten Zellen (orangene Pfeile).

## 4. Diskussion

Das Coxsackie-B-Virus (CVB3) ist eines der häufigsten Erreger viraler Herzerkrankungen (Woodruff, 1980). Neben der Induktion einer akuten Herzinsuffizienz im Rahmen einer akuten Myokarditis kann CVB3 bei persistierender Infektion ebenso zu einer dilatativen Kardiomyopathie (DCM) führen.

In den letzten Jahren wurden durch intensive Forschung der pathophysiologischen Grundlagen coxsackieviraler Erkrankungen erhebliche Fortschritte gemacht, die zunehmenden Einblick in die Pathogenese des Coxsackievirus gewähren.

Hierzu gehören mitunter die Erforschung der Mechanismen, welche die Progression einer akuten hin zur chronischen Myokarditis und nachfolgend zur DCM bedingen. In diesem Zusammenhang stand auch besonders die coxsackievirale Fähigkeit zur Persistenz in infizierten Zellen im Mittelpunkt.

Von herausragender Bedeutung war jedoch gleichsam die Entdeckung viraler Proteasen und hierbei deren physiologische und nachfolgend deren pathophysiologische Bedeutung im Hinblick auf zytopathische Effekte in CVB3-infizierten Zellen. So erkannte man erstmals Mitte der neunziger Jahre, dass eine picornvirale Infektion durch Spaltung des eukaronten Translationsfaktors eIF4G mittels der 2A-Protease zur proteolytischen Inhibition der zellulären Translationsmaschinerie führen kann (Lamphear, 1995). Weitere Untersuchungen ergaben zusätzliche Targets picornviraler Proteasen auch innerhalb der zellulären Translations- und Transkriptionsmaschinerie, wie z.B. dem Poly-A-Bindungsprotein (PABP), dem TATA-Bindungsprotein als auch dem Zytoskelettprotein Dystrophin (Joachims, 1999; Kerekatte, 1999; Kuyumku-Martinez, 2002; Badorff, 1999).

Die vorliegende Arbeit greift die Erforschung coxsackieviraler Proteasen und deren zelluläre Bindungspartner und somit die in einer CVB3-Infektion resultierenden pathophysiologischen Korrelate auf.

Durch einen 2-Hybrid-Screen konnten in Vorarbeiten potenzielle Bindungspartner der coxsackieviralen Proteasen 2A und 3C identifiziert werden. Diese ergaben sich vornehmlich in Mediatoren (Rezeptorbestandteile und Transkriptionsfaktoren) des IL-6-Typ-Signaltransduktionsweges und somit in einem für Differenzierung, Proliferation, Genaktivierung und Apoptose bedeutsamen Signalweg (Heinrich, 1998).

Von den ermittelten potentiellen Zielstrukturen coxsackieviraler Proteasen wurde in der vorliegenden Arbeit gp130 (Glykoprotein 130), eine essentielle Rezeptoruntereinheit des IL-6-Rezeptors, als auch STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription), ein zentrales Transkriptionsmolekül des IL-6-Signalings, im Hinblick auf eine proteolytische Interaktion durch virale Proteasen untersucht.

Über die Analyse durch das NetPicoRNA-Softwareprogramm konnte gezeigt werden, dass die Schnittwahrscheinlichkeit von STAT3 durch die 3C-Protease am höchsten lag. Für gp130 ergaben sich mögliche intramolekulare Schnittstellen sowohl durch die 2A, als auch durch die 3C Protease.

In einem HeLa-Zellkultursystem, in welchem adhärent kultivierte HeLa-Zellen mit Coxsackie B3-Viren der kardiotropen Woodruff-Variante infiziert wurden, konnte belegt werden, dass sowohl gp130, als auch STAT3 nach coxsackieviraler Infektion gespalten werden. Hiedurch bestätigten sich die Untersuchungen des 2-Hybrid-Screens auf Basis der theoretischen Berechnungen.

In Westernblot-Untersuchungen „downstream“-gelegener Folgeprodukte von gp130 und STAT3 konnte gezeigt werden, dass die Unterbrechung der Signalkaskade durch Spaltung von gp130 und STAT3 in einer Verminderung bestimmter Zielprodukte resultiert.

Relevanz besitzt in dieser Hinsicht die Reduktion der Phosphorylierung von STAT3 sowohl an Tyrosinposition 705 als auch an Serinposition 727.

Dies wurde durch Immunfluoreszenzfärbungen bekräftigt. Es konnte gezeigt werden, dass in CVB3-infizierten HeLa-Zellen eine Rekrutierung von STAT3 an die Zellmembran mit dem Ziel der Phosphorylierung des Proteins an Tyrosinrest 705 über IL-6-Rezeptoruntereinheiten ausbleibt, bzw. stark attenuiert ist.

Zum Vergleich wurde untersucht, wie sich pSTAT3<sup>Tyr705</sup> in einer Immunfluoreszenzfärbung darstellt, wenn der Zelle keine Faktoren zur Verfügung stehen, welche den IL-6-Typ-Signaltransduktionsweg stimulieren. Hierfür wurden HeLa-Zellen kultiviert, dessen Medium weder FCS noch CT-1 enthielt.

Als Resultat ergab sich erwartungsgemäss ein ähnliches zelluläres Verteilungsmuster für pSTAT3<sup>Tyr705</sup>, wie es in CVB3-infizierten Zellen gezeigt werden konnte. Dies lässt somit Rückschlüsse darauf zu, dass in CVB3-infizierten Zellen das pSTAT3<sup>Tyr705</sup>-Färbungsmuster auf eine Unterbrechung und somit Attenuierung des IL-6-Signalings zurückzuführen ist.

Als Konsequenz der mangelnden Phosphorylierung des zentralen Transkriptionsmoleküls STAT3 aufgrund der Spaltung von gp130 und STAT3 konnte eine Reduktion von Target-Proteinen des IL-6-Signalings (Bcl-xL, Mcl-1) mittels Westernblot festgestellt werden. Dies unterstreicht die Relevanz und die biologische Auswirkung der Unterbrechung der Signalkaskade für die Transkription von Zielgenen.

Eine wichtige pathophysiologische Bedeutung der Unterbrechung des IL-6-Signalings liegt mitunter in der Akzelerierung pro-apoptotischer Signale in CVB3-infizierten Zellen.

Auf zellulärer Ebene besteht unter physiologischen Bedingungen eine Balance zwischen pro-apoptotischen und anti-apoptotischen Signalen (Hunter, 1999). Viren sind durch selektive Mutationen evolutionsbiologischen Veränderungen unterworfen, die ihre Virulenz erhöhen oder sie vor dem zellulären Immunsystem schützen. So haben z.T. Viren das genetische Material für Proteine erworben, welche entweder Apoptose unterdrücken, verzögern oder induzieren können. Dies

wird erreicht, indem sie auf unterschiedlichen Stufen mit apoptotischen Signalwegen interagieren und die physiologische Balance stören (Yuan, 2003).

Als virale Ziele gelten neben der Caspase-Familie auch die Bcl-2-Familie, p53, Fas oder der Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF- $\alpha$ )- TNF-Rezeptor (TNFR)- Signalkomplex (Teodoro, 1997; Rudin, 1997; Roulston, 1999).

Ob ein Virus nun Apoptose induziert oder inhibiert hängt von verschiedenen Faktoren ab und ist für jeden Virustyp individuell verschieden. Prinzipiell gesehen kann es jedoch während der frühen Phase einer Infektion für das Virus durchaus von Vorteil sein, den Tod der Zielzelle zu verhindern oder zumindest hinauszuzögern, um dadurch die Entstehung möglichst vieler, neuer Virusnachkommen zu gewährleisten.

Zu späten Infektionszeitpunkten kann es jedoch für das Virus größere Relevanz besitzen, den Tod der infizierten Zelle zu triggern. Auf diese Weise stellt die Apoptose für das Virus einen effizienten Mechanismus dar, Zelltod zu verursachen und somit durch Freisetzung von Virusnachkommen deren Verbreitung zu gewährleisten.

Da die Apoptose eine rasche Phagozytose der betroffenen Zelle ohne Ausschüttung von pro-inflammatorischen Zytokinen kennzeichnet, bietet dieser Mechanismus des Zelltodes gleichzeitig eine gute Möglichkeit die lokale Immunabwehr während der Verbreitung des Virus zu umgehen (Schwarzman, 1993).

Unter den Picornaviren ist u.a. das Poliovirus dazu fähig, Apoptose in infizierten Zellen zu induzieren (Barco, 2000; Tolskaya, 1995).

Apoptotische Prozesse, die durch eine Coxsackievirus-Infektion initiiert werden, sind bislang jedoch nur rudimentär erforscht (Joo, 2003). Neben apoptotischen Veränderungen, die in HeLa-Zellen und Kardiomyozyten morphologisch nach einer CVB3-Infektion beobachtet werden, ist allerdings bekannt, dass eine CVB3-Infektion zu Caspase-abhängiger Apoptose führen kann (Carthy, 1998; Peng, 2001; Alter, 2001; Joo, 2003; Ahn, 2003; Yuan, 2003). Zudem konnte von Henke et al. (2000) gezeigt werden, dass das coxsackievirale Kapsidprotein VP2 mit dem

pro-apoptotischen Protein Siva interagiert. Die Induktion von Siva lässt einen molekularen Mechanismus zur Induktion von Apoptose während einer Coxsackievirus-Infektion vermuten (Henke, 2000, 2001).

Der IL-6-Signalweg wirkt via gp130 und STAT3 zytoprotektiv. Durch Vermittlung der Transkription anti-apoptotisch wirkender Proteine der Bcl-2-Familie, wie Bcl-xL und Mcl-1, wird die Balance zwischen pro- und anti-apoptotischen Signalen aufrecht erhalten (Fujiio, 1997; Negoro, 2000,2001; Song, 2002; Battle, 2002; Yamauchi-Takahara, 2003).

Bcl-xL, ein Protein mit anti-apoptotischem Potential, ist überwiegend in den Membranen der Mitochondrien, des endoplasmatischen Retikulums sowie des Zellkerns lokalisiert (Bromberg, 1999; Tsujimoto, 2000). Es reguliert zusammen mit Bcl-2 und Mcl-1 die mitochondriale Permeabilität und verhindert die Freisetzung pro-apoptotischer Faktoren wie Cytochrom C (Cyt C) (Liu, 1996; Yang, 1997; Nijahwan, 2003).

Die Ausschüttung von Cytochrom C, einem wichtigen Bestandteil der mitochondrialen Atmungskette, aus dem Intermembranraum der Mitochondrien bedingt im Normalfall die Aktivierung von verschiedenen Mitgliedern der pro-apoptotischen Caspase-Familie durch Bindung an Apaf-1 und Assoziation mit Pro-Caspase 9 (Li, 1997; Kluck, 1997; Gonzales, 1990).

Dass Bcl-xL im Rahmen einer CVB3-Infektion eine Rolle für das Überleben der Zelle spielt, zeigen die Untersuchungen von Carthy et al (2003). Sie konnten bestätigen, dass CVB3-induzierte Apoptose durch die mitochondriale Freisetzung von pro-apoptotischen Faktoren, wie Cyt C, initiiert wird. In weiteren Untersuchungen wurde in Kardiomyozyten gezeigt, dass durch eine Überexpression von Bcl-xL und Bcl-2 die Freisetzung von Cyt C und die somit darauffolgende Aktivierung von pro-apoptotischen Mitgliedern der Caspase-Familie vermindert werden konnten. Hierdurch konnten das Überleben der Zellen nach CVB3-Infektion verlängert und eine geringere Freisetzung von

Virusnachkommen aus infizierten Zellen erzielt werden, obwohl gleichsam die virale Replikation nicht reduziert werden konnte (Carthy, 2003).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Protein-Levels von zwei wichtigen Mitgliedern der anti-apoptotischen Bcl-2-Familie (Bcl-xL und Mcl-1) mit zunehmender CVB3-Infektionsdauer abnehmen. Dies ist auf die gezeigten Spaltungen von STAT3 und gp130 nach CVB3-Infektion zurückzuführen, wodurch die Transkriptionsziele Bcl-xL und Mcl-1 negativ betroffen sind.

In einer kürzlich erschienenen Studie von Amin et al (2004) konnten vergleichbare Effekte gesehen werden. Durch eine selektive Inhibition von STAT3 konnte hierbei caspase-abhängige Apoptose induziert werden. In weiterführenden Westernblot-Untersuchungen wurde eine Down-Regulation diverser Proteine gesehen. So erkannte man, dass die Proteinlevel von Bcl-xL, Bcl-2, Survivin und Mcl-1 (u.a.) vermindert waren. Dies deckt sich mit den Erkenntnissen dieser Arbeit und unterstreicht die Bedeutung des IL-6-Signalweges für das Überleben der Zelle.

Die Unterbrechung des IL-6-Typ-Signalings resultiert in diesem Zusammenhang in einer Dysbalance zwischen pro- und anti-apoptotischer Signale zugunsten vermehrter Apoptose. Dies kann möglicherweise als bedeutender Faktor dazu beitragen, dass dem Virus die Infektion von Nachbarzellen und somit im engeren Sinne die virale Verbreitung ermöglicht und erleichtert wird. Neugebildete Virusnachkommen können so durch Apoptose unter gleichzeitiger Umgehung der lokalen Immunreaktion freigesetzt werden (Hunter, 1999).

Normalerweise werden Enteroviren durch Zerstörung der Zellmembran freigesetzt (Rueckert, 1996). Im Rahmen einer Enterovirusinfektion ist jedoch auch die Spaltung des Zytoskelettproteins Dystrophin durch die 2A-Protease (Badorff, 1999, 2000) als auch die Spaltung von Zytokeratin 8, einem zytoskelettassoziierten Intermediärfilament, durch das Rhinovirus (Serotyp 2) pathophysiologisch bedeutsam (Seipelt, 2000). Es wird hierbei angenommen, dass es durch den Verlust der zytoskelettalen Integrität zu einer Destabilisierung der Wirtszellmembran kommt und somit die Virusfreisetzung erleichtert wird. Dieser Mechanismus, der auch von anderen Virusformen bekannt ist (Adenovirus,



HIV, u.a.), verstärkt somit die virale Verbreitung im infizierten Organismus und kann die Pathogenese der viralen Herzerkrankung fördern (Chen, 1993; Badorff, 1999; Shoeman, 1993).

Überdies wird gegenwärtig diskutiert, welche Bedeutung der Apoptose bei der potenziellen Progression einer akuten/chronischen Myokarditis zur dilatativen Kardiomyopathie (DCM) zukommt. Bekanntermaßen besitzt die Spaltung des Zytoskelettproteins Dystrophin durch die enterovirale Protease 2A pathophysiologische Relevanz bei der Pathogenese einer DCM (Badorff, 1999, 2000). Die Folgen defizienter Dystrophinproteine wurden bereits mehrfach im Rahmen von hereditären Formen einer DCM diskutiert (Beggs, 1997; Berko, 1987; Towbin, 1993).

Möglicherweise vermag auch der Verlust von Kardiomyozyten, vermittelt durch coxsackievirale Triggerung von Apoptose, im Verlauf die Entstehung einer DCM durch Veränderung des kardialen Zellgefüges begünstigen (Saraste, 2003). Die definitive Bestätigung dieser Theorie bleibt jedoch weiteren Untersuchungen vorbehalten.

Unterstützt wird diese These allerdings durch Untersuchungen von Hirota et al. (1999). Aufgrund der frühen embryonalen Letalität von gp130-Knock-Out-Mäusen (Yoshida, 1996) untersuchte diese Arbeitsgruppe die Auswirkung eines konditionierten gp130-Knock-Out-Mausmodell, welches spezifisch ventrikuläres gp130 betraf. In den gp130<sup>-/-</sup>-Mäusen zeigte sich im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren das Auftreten einer massiven Apoptose und ein rasches Fortschreiten zu einer DCM. Dies wurde durch chronische Druckbelastung mittels aortalem Banding, trotz einer normalen histologischen Struktur und Funktion der Kardiomyozyten, hervorgerufen. Die Kontrollmäuse, d.h. Mäuse mit einer intakten IL-6-Rezeptoruntereinheit gp130, entwickelten aufgrund der massiven Zunahme der ventrikulären Druckbelastung hingegen lediglich eine kompensatorische Ventrikel-Hypertrophie.

Hieraus erschließt sich, dass Apoptose in Kardiomyozyten ein entscheidender Faktor beim Fortschreiten einer kompensatorischen Hypertrophie zur Herzinsuffizienz darstellt (Hirota, 1999).

Untersuchungen von Yasukawa et al. (2003) konzentrierten sich auf die Rolle von SOCS-Proteinen als negative Feedback-Inhibitoren des JAK-STAT-Signalweges und der Bedeutung dieses Signalweges bei der Abwehr kardialer Myozyten gegen virale Infektionen.

SOCS sind Proteine, welche physiologischerweise in der Zelle vorkommen, Janus-Kinasen durch Feedback-Inhibition hemmen können und so an der Regulation des JAK-STAT-Signalweges beteiligt sind (Hamanaka, 2001; Yasukawa, 2001; Krebs, 2000).

Es zeigte sich deutlich, dass eine durch Überexpression von SOCS-1 hervorgerufene Inhibition des JAK-STAT-Signalweges eine erhöhte Virusreplikation, vermehrte Myokardschädigung, auftretende linksventrikuläre Dilatation und Dysfunktion sowie eine frühere Letalität im Vergleich zu Kontrollmäusen bewirkte. Es erfolgt somit eine Aggravation der viralen Herzerkrankung durch abgeschwächtes IL-6-Signaling.

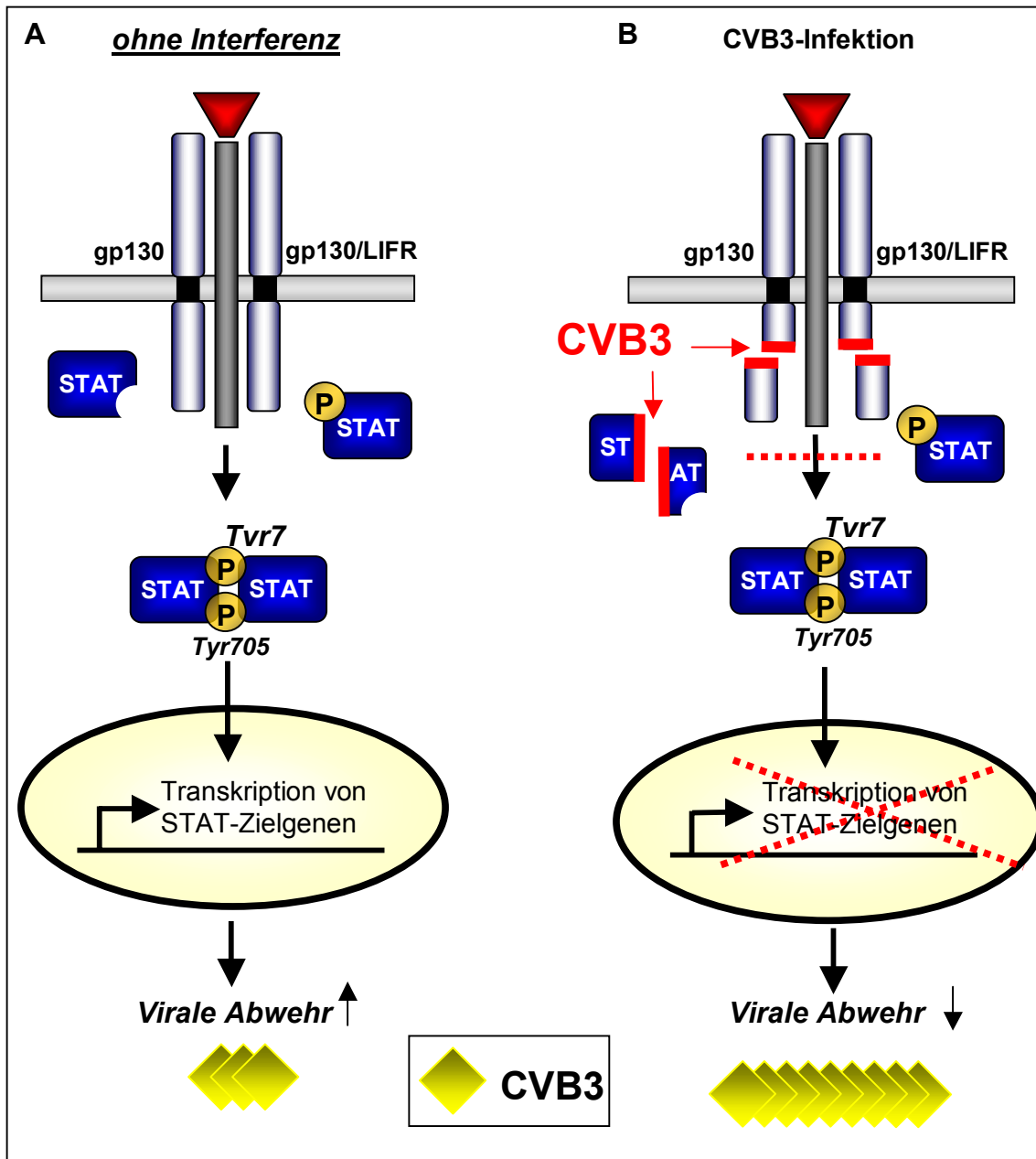
Ferner wurde bestätigt, dass virusvermittelte zytopathische Effekte durch die exogene Gabe von CT-1 oder IL-6, aber auch durch Expression von dn-SOCS-1 (dominant negatives SOCS-1) inhibiert werden können (Yasukawa, 2003; Kanda, 1996).

Die Ergebnisse dieser Studie belegen, dass dem über gp130 und STAT3 signalisierende Zytokinweg eine wichtige Bedeutung hinsichtlich der Abwehr (coxsackie-) viraler Erreger in Kardiomyozyten zukommt und ein intaktes Signaling für das Überleben der Zelle von herausragender Bedeutung ist (s. Abb 15).

Vor diesem Hintergrund kann die Inhibition dieses Signalweges, wie bereits beschrieben, durchaus zum Zelltod durch Induktion von Apoptose führen (Epling-Burnette, 2001; Aoki, 2003; Liu, 2003). Das bei Hirota et al. (1999) und Yasukawa et al. (2003) durch gp130-Knock-Out und Verstärkung der Negativen-Feedback-Hemmung abgeschwächte IL-6-Typ-Signaling lässt den Schluss auf eine mögliche

pathophysiologische Bedeutung bei der Pathogenese einer DCM, wie bereits zuvor beschrieben, zu.

Diese Erkenntnisse werden ebenso durch Untersuchungen von Podewski et al. (2003) gestützt. Sie zeigen, dass im Rahmen einer idiopathischen DCM die Protein-Levels einzelner Mediatoren des IL-6-Typ-Signalweges (pSTAT3, LIFR und IL-6, u.a.) reduziert sind und somit ursächlich zur Pathogenese beitragen können (Podewski, 2003).



**Abb.15 Hypothese der Auswirkung einer Interaktion von CVB3 mit dem IL-6-Typ-Signaling.**

**A.** Virus-Infektion des Myokards stimuliert u.a. den IL-6-Typ-Signalweg und führt über Transkription von STAT-Zielgenen konsekutiv zu einer Aktivierung der kardialen Immunabwehr.

—> Die virale Infektion wird eingedämmt und myokardiale Schädigung vermindert.

**B.** Coxsackievirus Infektion führt durch proteolytische Interaktion mit gp130 und STAT3 zu einer Reduktion des IL-6-Signalings und so zu einer Verminderung der Transkription von STAT-Zielgenen.

—> Die kardiale antivirale Potenz wird geschwächt und es kommt potentiell zu vermehrter Apoptose und Schädigung von Myozyten.

(nach Yasukawa et al., JCI, 2003)

## Limitationen der Arbeit

Trotz der präsentierten Ergebnisse, die eindeutig eine Spaltung von STAT3 und gp130 zeigen, sollen an dieser Stelle mögliche Einschränkungen der gezeigten Daten nicht unerwähnt bleiben.

Zum einen ist von Bedeutung, dass das Coxsackievirus B3 durch die 2A-Protease den eukaryonten Translationsfaktor eIF4G proteolytisch spaltet. Des weiteren ist bekannt, dass der Transkriptionsfaktor TATA-bindendes-Protein durch die 3C-Protease und das Poly- (A) Bindungsprotein durch die 2A- und die 3C-Protease geschnitten wird. Somit kann es in enterovirus-infizierten Zellen zu einem sogenannten virus-host shutoff führen. Dies bedeutet, dass es zu einer Abnahme der zellulären cap-abhängigen Translation kommen kann, welche den Großteil der zellulären Proteinsynthese ausmacht. Da das Virus die Translationsinitiation cap-unabhängig mittels der IRES-Struktur vermittelt, stellt das Virus hierdurch die Produktion der eigenen Virusnachkommen, trotz host shutoff, sicher.

Aus diesen Gründen besteht die Möglichkeit, dass die Verminderung der Folgeprodukte von gp130 und STAT3 auf diesen virus-host shutoff zurückzuführen ist und keinen coxsackievirus-spezifischen Effekt darstellt. Dieses Argument wurde durch parallele Untersuchung eines nicht an der IL-6-Signalkaskade beteiligten Proteins zu entkräften versucht. Es sind diesbezüglich zu allen Westernblot-Abbildungen die zugehörigen Aktinfärbungen dargestellt. Hierbei zeigte sich, dass sich die jeweiligen Aktinlevel durch die CVB3-Infektion nicht verändern.

Hinzu kommt, dass sowohl in den gp130- als auch in den STAT3-Abbildungen CVB3-infizierter Zelllysate jeweils eine eindeutig sichtbare Spaltung der Proteine erkennbar wird. Es zeigte sich in diesem Zusammenhang ein Shift der jeweiligen Protein-Bande von STAT3 und gp130, welcher spezifisch nur in infizierten Zellen auftritt. Zudem gelang zumindest für STAT3 im Rahmen einer CVB3-Infektion der Nachweis eines Spaltproduktes, welches im Laufe der Infektion zunimmt und in direkter Verbindung damit steht. Die so gesehenen Effekte sind demzufolge auf die proteolytische Interaktion coxsackieviraler Proteasen mit STAT3 und gp130 zurückzuführen.

## Ausblick

Um das Thema der Interaktion coxsackieviraler Proteasen mit dem kardioprotektiven IL-6-Typ-Signaling in seiner Vollständigkeit zu erfassen, werden zukünftig noch weitere Untersuchungen notwendig werden.

Diese beinhalten zum einen die Identifizierung der für die gesehenen Spaltungen verantwortlichen Proteasen (2A oder/und 3C?). Ferner erscheint es sinnvoll, die exakten Aminosäurepositionen der Schnittstellen innerhalb der Proteine genau zu detektieren und die *in vitro*-Daten *in vivo* am Mausmodell, bzw. an explantiertem, CVB3-infiziertem humanen Myokardgewebe zu reproduzieren und zu validieren. Nicht zuletzt wird genauer untersucht werden müssen, welche pathophysiologische Relevanz die Attenuierung des IL-6-Typ-Signaltransduktionsweges auf weitere Targetproteine hat und durch welche Massnahmen die CVB3-Effekte auf das IL-6-Typ-Signaling beeinflusst werden können.

Untersuchungen der Art, wie sie im Rahmen dieser Arbeit vorgestellt wurden, haben primär zum Ziel, grundlegende und zum Teil sicherlich sehr spezielle Zusammenhänge und Mechanismen genauer zu erforschen. Bei aller Fokussierung auf molekulare Zusammenhänge darf jedoch der Zweck und das Ziel der meisten medizinischen klinischen und experimentellen Untersuchungen nicht aus den Augen verloren werden, nämlich die Therapie bzw. Prävention von Krankheit als solche.

Die in dieser Arbeit gezeigten proteolytischen Spaltungen und die daraus resultierenden pathophysiologischen Konsequenzen für die infizierte Zelle (siehe Abb. 15) sowie für das betroffene Organ und den Patienten besitzen vor diesem Hintergrund möglicherweise therapeutischen Implikationen.

Abgesehen von vielversprechenden klinischen Studien mit Interferon- $\beta$  (Kühl, 2003), gibt es bis dato keine spezifische therapeutische Massnahme gegen die akute virale Herzerkrankung und ihre chronischen Korrelate. So könnten in Zukunft eventuell Protease-Inhibitoren, wie sie seit einigen Jahren bei der HIV-

Infektion mit gutem Erfolg angewandt werden, nicht nur im Hinblick auf diese Arbeit von grossem Interesse und Bedeutung sein. Spezifische Inhibitoren sind allerdings bei enteroviralen Infektionen bislang nicht in der Klinik etabliert und bleiben weiteren klinischen Untersuchungen vorbehalten (Molla, 1993; Hellen, 1993).

## 5. Zusammenfassung

Coxsackievirus B3 (CVB3) ist einer der häufigsten Erreger viraler Herzerkrankungen. Neben der Induktion einer akuten Herzinsuffizienz im Rahmen einer akuten Myokarditis kann CVB3 bei persistierender Infektion ebenso zu einer dilatativen Kardiomyopathie (DCM) führen.

Als Mitglied der Picornavirenfamilie besitzt das Coxsackievirus B3 spezifische Proteasen (2A<sup>Pro</sup>, 3C<sup>Pro</sup> u.a.), welche durch Spaltung des viralen Polyproteins für die Virusmaturation essentiell sind. Diese Proteasen können bekanntermassen durch Interaktion mit wirtsspezifischen, eukaryonten Proteinen zytopathische Effekte induzieren.

In Vorarbeiten konnten durch einen 2-Hybrid-Assay potentielle Bindungspartner für die coxsackievirale 2A- und 3C-Protease innerhalb des IL-6-Typ-Zytokin-Signaltransduktionsweges identifiziert werden. Aus softwarebasierten Berechnungen der Spaltungswahrscheinlichkeiten ergaben sich relevante Schnittstellen sowohl innerhalb der IL-6-Rezeptoruntereinheit gp130 (Glykoprotein 130) als auch innerhalb des Signaltransduktionsmoleküls STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription).

In dieser Arbeit gelingt der wissenschaftliche Nachweis einer Interaktion von CVB3 mit dem kardioprotektiven IL-6-Typ-Signaltransduktionsweg. In Westernblot-Untersuchungen können Spaltungen von STAT3 und gp130 nach CVB3-Infektion gezeigt werden, welche durch Immunfluoreszenzfärbungen bekräftigt werden.

Resultierend ergibt sich nach CVB3-Infektion eine konsekutive Verminderung der phosphorylierten Folgeprodukte pSTAT3<sup>Tyr705</sup> und pSTAT3<sup>Ser727</sup> sowie eine verminderte Expression IL-6-vermittelter kardiomyoprotektiver Gene der Bcl-2-Familie (Mcl-1, Bcl-xL), welche anti-apoptotische Potenz besitzen.

Da das IL-6-Signaling für die Immunantwort und das Überleben der Zelle grosse Relevanz besitzt, stellt es ein attraktives Ziel coxsackieviraler Proteasen dar, wodurch sich für das Virus entscheidende Vorteile hinsichtlich Infektion, Ausbreitung und Persistenz ergeben.



## 6. Bibliographie

1. Ahn J, Joo C-H, Seo I, Kim DH, Hong HN, Kim YK, Lee H. Characteristics of apoptotic cell death induced by coxsackievirus B in permissive Vero cells. *Intervirology*. 2003; 46: 245-251.
2. Alonzi T, Maritano D, Gorgoni B, Rizzuto G, Libert C, Poli V. Essential Role of STAT3 in the Control of the Acute-Phase Response as revealed by inducible Gene Activation in the Liver. *Mol.Cell.Biol*. 2001; 21: 1621-1632.
3. Alter P, Jobmann M, Meyer E, Pankuweit S, Maisch B. Apoptosis in myocarditis and dilated cardiomyopathy: Does enterovirus genome persistence protect from apoptosis? An endomyocardial biopsy study. *Cardiovasc. Pathol*. 2001; 10: 229-234.
4. Aoki Y, Feldman GM, Tosato G. Inhibition of STAT3 signaling induces apoptosis and decreases survivin expression in primary effusion lymphoma. *Blood*. 2003; 101: 1535-1542.
5. Amin HM, McDonnell TJ, Ma Y, Lin Q, Fujio Y, KunisadaK, Leventaki V, Rassidakis GZ, Cutler C, Medeiros L, Lai R. Selective inhibition of STAT3 induces apoptosis and G(1) cell cycle arrest in ALK-positive anaplastic large cell lymphoma. *Oncogene*. 2004; 23(32): 5426-5434.
6. Archard LC, Bowles NE, Cunningham L et al. Molecular probes for detection of enterovirus infection of human heart and their prognostic value. *Eur Heart J*. 1991. 12: 56-59.
7. Baboonian C, Treasure T. Meta-analysis of the association of enteroviruses with human heart disease. *Heart*. 1997a; 78: 539-543.
8. Badorff C, Lee GH, Lamphear BJ, Martone ME, Campbell KP, Rhoads RE, Knowlton K U. Enteroviral protease 2A cleaves dystrophin: Evidence of cytoskeletal disruption in an acquired cardiomyopathy. *Nature Medicine*. 1999; 5: 320-326.
9. Badorff C, Lee GH, Knowlton K. Enteroviral cardiomyopathy: bad news for the dystrophin-glycoprotein complex. *Herz*. 2000; 25: 227-232.
10. Barco A, Feduchi E, Carrasco L. Poliovirus protease 3C(pro) kills cells by apoptosis. *Virology*. 2000; 266: 352-360.

11. Beggs AH. Dystrophinopathy, the expanding phenotype. Dystrophin abnormalities in X-linked dilated cardiomyopathy. *Circulation*. 1997; 95: 2344-2347.
12. Berko BA, Swift M. X-linked dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med*. 1987; 316: 1186-1191.
13. Blom N, Hansen J, Blaas D, Brunak S. Cleavage site analysis in picornviral polyproteins: Discovering cellular targets by neural networks. *Protein Science*. 1996; 555: 2203-2216.
14. Bowles NE, Richardson PJ, Olsen EG. Detection of Coxsackie-B-virus-specific RNA sequences in myocardial biopsy samples from patients with myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Lancet*. 1986; 1: 1120-1223.
15. Böcker W, Denk H, Heitz Ph.U. Pathologie. *Urban&Fischer*. München, Jena. 2.Aufl. 2000; 458-461.
16. Bromberg JF, Wrzeszczynska MH, Devgan G, Zhao Y, Pestell RG, Albanese C, Darnell JE Jr. STAT3 as an oncogene. *Cell*. 1999; 98: 295-303.
17. Carthy CM, Granville DJ, Watson KA, Anderson DR, Wilson JE, Yang D, Hunt DW, McManus BM. Caspase activation and specific cleavage of substrates after coxsackievirus B3-induced cytopathic effect in HeLa cells. *J. Virol*. 1998; 72: 7669-7675.
18. Carthy CM, Yanagawa B, Luo H, Granville DJ, Yang D, Cheung P, Esfandiarei M; Rudin CM, Thompson CB, Hunt DWC, McManus BM. Bcl-2 and Bcl-xL overexpression inhibits cytochrome c release, activation of multiple caspases, and virus release following coxsackievirus B3 infection. *Virology*. 2003; 313: 147-157.
19. Chen PH, Ornelles DA, Shenk T. The Adenovirus L3 23-kilodalton proteinase cleaves the amino-terminal head domain from cytokeratin 18 and disrupts the cytokeratin network of HeLa cells. *J. Virol*. 1993; 67: 3507-3514.
20. Chung CD, Liao J, Liu B, Rao X, Jay P, Berta P, Shuai K. Specific Inhibition of STAT3 Signal Transduction by PIAS3. *Science*. 1997; 278: 1803-1805.

21. Clark ME, Liebermann PM, Berk AJ, Dasgupta A. Direct cleavage of human TATA-binding protein by poliovirus protease 3C in vivo and in vitro. *Mol. Cell. Biol.* 1993; 13: 1232-1237.
22. Dalldorf G, Sickles GM. An unidentified filterable agent isolated from feces of children with paralysis. *Science.* 1948; 108: 61-62.
23. Das S, Dasgupta A. Identification of the cleavage site and determinants required for poliovirus 3C<sup>pro</sup>-catalysed cleavage of human TATA-binding transcription factor TBP. *J. Virol.* 1993; 67: 3326-3331.
24. Davis S, Aldrich TH, Stahl N, Pan L, Taga T, Kishimoto T, Ip NY, Yancopoulos GD. LIFR beta and gp130 as heterodimerizing signal transducers of the tripartite CNTF receptor. *Science.* 1993; 260: 1805-1808.
25. Easton AJ, Elgin RP. The detection of coxsackievirus RNA in cardiac tissue by *in situ* hybridisation. *J Gen Virol.* 1988; 69: 285-291.
26. Epling-Burnette PK, Liu JH, Catlett-Falcone R, Turkson J, Oshiro M, Kothapalli R, Li Y, Wang JM, Yang-Yen HF, Karras J, Jove R, Loughran TP, Jr. Inhibition of STAT3 signaling leads to apoptosis of leukemic large granular lymphocytes and decreased Mcl-1 expression. *J. Clin. Invest.* 2001; 107: 351-362.
27. Etchison D, Milburn SC, Edery N, Sonenberg N und Hershey JWB. Inhibition of HeLa cell protein synthesis following poliovirus infection correlates with the proteolysis of a 220,000-dalton polypeptide associated with eukaryotic initiation factor 3 and a cap binding protein complex. *J. Biol. Chem.* 1982; 257: 14806-14810.
28. Faris M, Kokot N, Stahl N, Nel AE. Involvement of Stat3 in interleukin-6-induced IgM production in a human B-cell-line. *Immunol.* 1997; 90: 350-357.
29. Feldman AM, McNamara D. Medical progress: Myocarditis. *N Engl J Med.* 2000; 343: 1388-1398.
30. Fields S, Song O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature.* 1989; 340: 245-246.
31. Fields S, Sternglanz R. The two-hybrid system: an assay for protein-protein interactions. *Trends Genet.* 1994; 10: 286-291.

32. Fletcher E, Brennan CF. Cardiac complications of coxsackie virus. *Lancet*. 1957; 272: 913-915.
33. Fujio Y, Kunisada K, Hirota H, Yamauchi-Takahira K, Kishimoto K. Signals Through gp130 Upregulate Bcl-x Gene Expression Via STAT1-binding cis-Element in Cardiac Myocytes. *J.Clin.Invest*. 1997; 99: 2898-2905.
34. Fukada T, Hibi M, Yamanaka Y, Takahashi-Tezuka M, Fujitani Y, Yamaguchi T, Nakajima K, Hirano T. Two Signals Are Necessary for Cell Proliferation Induced by a Cytokine Receptor gp130: Involvement of STAT3 in Anti-Apoptosis. *Immunity*. 1996; 5: 449-460.
35. Garcin D, Curran J, Itho M, Kolakofsky D. Longer and shorter forms of Sendai virus C proteins play different roles in modulating the cellular antiviral response. *J. Virol*. 2001, 75: 6800-6807.
36. Gearing DP, Comeau MR, Friend DJ, Gimpel SD, Thut CJ, McGourty J, Brasher KK, King JA, Gillis S, Mosely B, Ziegler SF, Cosman D. The IL-6 signal transducer, gp130: an oncostatin M receptor and affinity converter for the LIF receptor. *Science*. 1992; 255: 1434-1437.
37. Gerhartz C, Heesel B, Sasse J, Hemmann U, Landgraf C, Schneider.Mergener J, Horn F, Heinrich PC, Graeve L. Differential activation of acute phase response factor/STAT3 and STAT1 via the cytoplasmic domain of the interleukin-6 signal transducer gp130. 1. Definition of a novel phosphotyrosine motif mediating STAT1 activation. *J Biol Chem*. 1996; 271: 12991-12998.
38. Hamanaka I, Saito Y, Yasukawa H, Kishimoto I, Kuwahara K, Miyamoto Y, Harada M, Ogawa E, Kajiyama N, Takahashi N, Izumi T, Kawakami R, Masuda I, Yoshimura A, Nakao K. Induction of JAB/SOCS-1/SSI-1 and CIS3/SOCS-3/SSI-3 is involved in gp130 resistance in cardiovascular system in rat treated with cardiotrophin-1 in vivo. *Circ. Res*. 2001; 88: 727-732.
39. Heim A, Canu A, Kirschner P et al. Synergistic interaction of interferon-beta and interferon-gamma in coxsackievirus B3-infected carrier cultures on human myocardial fibroblasts. *J. Infect. Dis*. 1992; 166: 958-965.

40. Heinrich PC, Behrmann I, Müller-Newen G, Schaper F und Graeve L. Interleukin-6-type signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem. J.* 1998; 334: 297-314.
41. Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Müller-Newen G, Schaper F. Principles of interleukin (IL-)6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem. J.* 2003; 374: 1-20. *Review.*
42. Helin M, Savola J, Lapinleimu K. Cardiac manifestations during a Cocksackie B5 epidemic. *Br Med J.* 1968; 3: 97-99.
43. Hellen C, Wimmer E. Viral proteases as targets for chemotherapeutic intervention. *Curr. Opin. Biotechnol.* 1992; 3:643-649.
44. Henke A, Launhardt H, Klement K, Stelzner A, Zell Roland, Munder T. Apoptosis in coxsackie B3-caused diseases: Interaction between the capsid protein VP2 and the proapoptotic protein Siva. *J Virol.* 2000; 74: 4284-4290.
45. Henke A, Nestler M, Strunze S, Saluz H-P, Hortschansky P, Menzel B, Martin U, Zell R, Stelzner A, Munder T. The apoptotic capability of coxsackievirus B3 is influenced by the interaction between the capsid protein VP2 and the proapoptotic protein Siva. *Virology.* 2001, 289: 15-22.
46. Hirano T, Yasukawa K, Harada H et al. Complementary DNA for a novel interleukin (BSF-2) that induces B Lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature.* 1986; 324: 73-76.
47. Hirota H, Betz UA, Rajewski K, Gu Y, Ross J Jr., Müller W, Chien KR. Loss of a gp130 cardiac muscle cell survival pathway is a critical event in the onset of heart failure during biomechanical stress. *Cell.* 1999; 97: 189–198.
48. Hiscott J. Introduction - cytokine receptors, signaling pathways and viruses. *Cytokine and Growth Factor Rev.* 2001. 12: 129-131.
49. Horvath CM. STAT proteins and transcriptional responses to extracellular signals. *TIBS.* 2000; 25: 496-502.
50. Hufnagel G, Pankuweit S, Maisch B. Therapy of dilated cardiomyopathies with and without inflammation. *Med Klin.* 1998; 93: 240-251.
51. Hunter JJ, Chien, KR. Signaling Pathways For Cardiac Hypertrophy And Failure. *NEJM.* 1999; 341: 1276-1283.

52. Jackson R, Howell M, Kaminski A. The novel mechanism of initiation of picornaviral RNA translation. *Trends Biochem. Sci.* 1990; 15: 477-483.
53. Jang SK, Davies MV, Kaufman RJ, Wimmer E. Initiation of protein synthesis by internal entry of ribosomes into the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA in vivo. *J Virol.* 1989; 63:1651-60.
54. Jang SK, Pestova TV, Hellen CUT, Witherell GW, Wimmer E. Cap-independent translation of picornavirus RNAs: structure and function of the internal ribosomal entry site. *Enzyme.* 1990; 40: 292-309.
55. Javett SN, Heymann S, Mundel B, Pepler WJ, Lurie HI, Gear HJ, Maesroch V, Kirsch Z. Myocarditis in the newborn infant: a study of an outbreak associated with coxsackie group B virus infection in a maternity home in Johannesburg. *J. Pediatr.* 1956; 48: 1-22.
56. Jin O, Sole MJ, Butany JW et al. Detection of enteroviral RNA in myocardial biopsies from patients with myocarditis and cardiomyopathy using gene amplification by polymerase chain reaction. *Circulation.* 1990; 82: 8-16.
57. Joachims M, Harris KS, Etchison D. Poliovirus protease 3C mediates cleavage of microtubule-associated protein 4. *Virology.* 1995; 211: 451-461.
58. Joachims M, Van Breugel PC, Lloyd RE. Cleavage of poly(A)-binding protein by enterovirus proteases concurrent with inhibition of translation in vitro. *J. Virol.* 1999; 73: 718-727.
59. Joo CH, Hong HN, Kim EO, Im JO, Yoong SY, Ye JS, Moon MS, Kim D, Lee H, Kim YK. Coxsackievirus B3 Induces Apoptosis in the Early Phase of Murine Myocarditis: A Comparative Analysis of Cardiovirulent and Noncardiovirulent Strains. *Intervirology.* 2003; 46: 135-140.
60. Juilliere Y, Danchin N, Brinancon S, et al. Dilated cardiomyopathy: long-term follow-up and predictors of survival. *Int. J. Cardiol.* 1988. 21: 269-277.
61. Kanda T, Wilson Mc Manus JE, Nagai R, Imai S, Suzuki T, Yang D, McManus BM, Kobayashi I. Modification of Viral Myocarditis in Mice by Interleukin-6. *Circ.Res.* 1996; 78: 848-856.
62. Kandolf R, Klingel K, Zell R, Selinka HC, Schneider-Brachert W, Bultmann B. Molecular pathogenesis of enterovirus-induced myocarditis: virus persistence and chronic inflammation. *Intervirology.* 1993; 35: 140-151.

63. Kandolf R. The molecular pathogenesis of enterovirus myocarditis. Virus persistence and chronic inflammation. *Internist*. 1995;36: 430-438.
64. Kandolf R. Myokarditis und Kardiomyopathie. *Verh. Dtsch. Ges. Path.* 1996, 80: 127-138.
65. Kandolf, R. Enterovirale Myoarditis und dilatative Kardiomyopathie. *Med Klinik*. 1998; 93: 215-222.
66. Kandolf R, Sauter M, Aepinus C, SchnorrJJ, Selinka CC, Klingel K. Mechanism and consequences of enteroviral persistence in cardiac myocytes and cells of the immune system. *Vir. Res.* 1999; 62: 149-158.
67. Kaptein A, Paillard V, Saunders M. Dominant negative stat3 mutant inhibits interleukin-6-induced Jak-STAT signal transduction. *J. Biol. Chem.* 1996; 271: 5961-5964.
68. Kerekatte V, Keiper BD, Badorff C, Cai A, Knowlton KU und Rhoads RE. Cleavage of poly(A)-binding protein by coxsackievirus 2A protease in vitro and in vivo: another mechanism for host protein shutoff? *J. Virol.* 1999; 73: 709-717.
69. Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD. The Release of Cytochrome C from Mitochondria: A Primary Site for Bcl-2 Regulation of Apoptosis. *Science*. 1997; 275: 1132-1136.
70. Korant BD, Towatari T, Ivanoff L, Petteway S Jr, Brzin J, Lenarcic B, Turk V. Viral therapy: prospects for protease inhibitors. *J. Cell. Biochem.* 1986; 32:91-95.
71. Krebs DL, Hilton DJ. Commentary. SOCS: physiological suppressors of cytokine signaling. *J.Cell.Science*. 2000; 113: 2813-2819.
72. Kühl U, Pauschinger M, Schwimmbeck PL, Seeberg B, Lober C, Noutsias M, Poller W, Schultheiss HP. Interferon- $\beta$  Treatment Eliminates Cardiotropic Viruses and Improves Left Ventricular Function in Patients With Myocardial Persistence of Viral Genomes and Left Ventricular Dysfunction. *Circulation*. 2003; 107: 2793-2798.

73. Kuyumku-Martinez NM, Joachims M, Lloyd RE. Efficient cleavage of Ribosome-Associated Poy(A)-Binding Protein by Enetrovirus 3C Protease. *J. Virol.* 2002; 76: 2062-2074.
74. Lamphear BJ, Yan R, Yang F, Waters D, Liebig H-D, Klump H, Kuechler E, Skern T und Rhoads RE. Mapping the cleavage site in protein synthesis initiation factor eIF4G of the 2A proteases from the human coxsackeivirus and rhinovirus. *J. Biol. Chem.* 1993; 268: 19200-19203.
75. Lamphear BJ, Kirchweger R, Skern T und Rhoads, RE. Mapping of Functional Domains in Eukaryotic Protein Synthesis Initiation Factor 4G (eIF4G) with Picornaviral Proteases. *J. Biol. Chem.* 1995; 270: 21975-21983.
76. Lawrence C, Thatch R. Identification of a viral protein involved in post-translational maturation of the encephalomyocarditis virus capsid precursor. *J. Virol.* 1975; 15: 918-928.
77. Lerner AM. An experimental approach to virus myocarditis. *Prog Med Virol.* 1965; 7: 97-115.
78. Levy DE, Garcia-Sastre A. The virus battles: IFN induction of the antiviral state and mechanisms of viral evasion. *Cytokine and Growth Factor Rev.* 2001; 12: 129-131.
79. Li P, Nijhawan D, Budhihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell.* 1997; 91: 479-489.
80. Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. Induction of Apoptotic Program in Cell-Free Extracts: Requirement for dATP and Cytochrome C. *Cell.* 1996; 86: 147-157.
81. Liu H, Ma Y, Cole SM, Zander C, Chen K-H, Karras J, Pope RM. Serine Phosphorylation of STAT3 is essential for Mcl-1 expression and macrophage survival. *Blood.* 2003; 102: 344-352.
82. Lowry O, Rosebrough N, Farr A, Randall R. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; 193: 265-275.
83. Luttkicken C, Wegenka UM, Yuan J, Buschmann J, Schindler C, Ziemiecki A, Harpur AG, Wilks AF, Yasukawa K, Taga T, et al. Association of



- transcription factor APRF and protein kinase Jak1 with the interleukin-6 signal transducer gp130. *Science*. 1994; 263: 89-92.
84. Luticken C, Coffey P, Yuang J, Schwartz C, Caldenhoven E, Schindler C, Kruijer W, Heinrich PC, Horn F. Interleukin-6-induced serine phosphorylation of transcription factor APRF: evidence for a role in interleukin-6 target gene induction. *FEBS Lett*. 1995; 360: 137-143.
  85. Lutton CW, Gauntt CJ. Ameliorating effect of IFN beta and anti-IFN beta on coxsackievirus B3 induced myocarditis in mice. *J. Interferon Res*. 1985; 5: 137-146.
  86. Lüllmann H, Mohr, K. Pharmakologie und Toxikologie. *Georg Thieme Verlag*. Stuttgart, New York. 14.Auflage. 1999; 441-451.
  87. MacArthur CGC, Tarin D, Goodwin JF, Hallidie-Smith KA. The relationship of myocarditis to dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J*. 1984; 5: 1023-1035.
  88. Maisch B. Prognostische Determinanten bei Myokarditis und Perimyokarditis. *Dtsch Ärzteblatt*. 1990; 87: 251-256.
  89. Maisch B, Schönian U, Hufnagel G, Pankuweit S. Enteroviral persistence in myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J*. 1997; 18: 593.
  90. Mall G. Morphologie der Myokarditis. *Internist*. 1995; 36: 425-429.
  91. Martino TA, Liu P, Sole MJ. Viral infection and the pathogenesis of dilated cardiomyopathy. *Circ Res*. 1994; 74: 182-188.
  92. Mason JW, O'Connell JB, Herskowitz A, Rose NR, McManus BM, Billingham ME, Moon TE. A Clinical Trial Of Immunosuppressive Therapy For Myokarditis. *N. Engl. J. Med*. 1995; 333: 269-275.
  93. Matsumori A, Tomioka N, Kawai C. Protective effect of recombinant alpha interferon on Coxsackievirus B3 myocarditis in mice. *Am. Heart J*. 1988; 115: 1229-1232.
  94. Miller DM, Rahill BM, Boss JM, Lairmore MD, Durbin JE, Waldman, WJ. Human cytomegalievirus inhibits Major Histocompatibility Complex Class II Expression by Disruption of the Jak/STAT Pathway. *J. Exp. Med*. 1998; 187: 675-683.
  95. Miyashita K, Okunishi J, Tagiri S, Hotta K, Komano T, Tamura T, Satoh N. Cleavage specificity of coxsackievirus 3C proteinase for peptide substrate

- (2): Importance of the P2 and P4 residues. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1996; 60: 1528-1529.
96. Modrow S und Falke D. Molekulare Virologie. *Spektrum Lehrbuch.* Spektrum Akademischer Verlag. Heidelberg-Berlin. 1998; 113-142.
97. Molla A, Hellen CU, Wimmer E. Inhibition of proteolytic activity of poliovirus and rhinovirus 2A proteinases by elastase-specific inhibitors. *J. Virol.* 1993; 67: 4688-4695.
98. Müller U, Steinhoff U, Reis LF, et al. Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science.* 1994; 259: 1742-1745.
99. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalysed chain reaction. *Methods Enzymol.* 1987; 155: 325-350.
100. Muraguchi A, Hirano T, Tang B, Matsuda T, Horii Y, Nakajima K, Kishimoto T. The essential role of B cell stimulatory factor 2 (BSF-2/IL-6) for the terminal differentiation of B cells. *J. Exp. Med.* 1988; 167: 332-44.
101. Murakami M, Hibi M, Nakagawa N, Nakagawa T, Yusukawa K, Yamanishi K, Taga T, Kishimoto T. Il-6-induced homodimerisation of gp130 and associated activation of tyrosine kinase. *Science.* 1993; 260: 1808-1810.
102. Negoro S, Kunisada K, Tone E, Funamoto M, Oh H, Kishimoto T, Yamauchi-Takahira K. Activation of JAK/STAT pathway transduces cytoprotective signal in rat acute myocardial infarction. *Cardiovasc.Res.* 2000; 47: 797-805.
103. Negoro S, Kunisada K, Fujio Y, Funamoto M, Darville MI, Eizirik DL, Osugi T, Izumi M, Osihma Y, Nakaoka Y, Hirota H, Kishimoto T, Yamauchi-Takahira K. Activation of signal transducer and activator of transcription 3 protects cardiomyocytes from hypoxia/reoxygenation-induced oxidative stress through the upregulation of the manganese superoxid dismutase. *Circulation.* 2001; 104: 189-191.
104. Nijhawan D, Fang M, Traer E, Zhong Q, Gao W, Du F, Wang X. Elimination of Mcl-1 is required for the initiation of apoptosis following ultraviolet irradiation. *Genes & Development.* 2003; 17: 1475-1486.
105. Parisien JP, Lau JF, Rodriguez JJ, Sullivan BM, Moscona A, Parks GD, Lamb RA, Horvath CM. The V protein of human parainfluenza virus 2

- antagonizes type I interferon responses by destabilizing signal transducer and activator of transcription 2. *Virology*. 2001; 283: 230-239.
106. Parisien JP, Lau JF, Rodriguez JJ, Ulane CM, Horvath CM. Selective STAT protein degradation induced by paramyxoviruses requires both STAT1 and STAT2 but is independent of  $\alpha/\beta$  interferon signal transduction. *J.Virol*. 2002; 76: 4190-4198.
  107. Pelletier J, Sonenberg N. Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature*. 1988; 334: 320-325.
  108. Peng T, Sadusky T, Li Y, Coulton GR, Zhang H, Archard LC. Altered expression of Bag-1 in Coxsackievirus B3 infected mouse heart. *Cardiovasc. Res*. 2001; 50: 46-55.
  109. Pennica D, King KK, Shaw KJ, Luis E, Rullamas J, Luoh S-M, Darbonne WC, Kutzon DS, Yen R, Chien KR, Beker JB, Wood WI. et al. Expression cloning of cardiotrophin 1, a cytokine that induces cardiac myocyte hypertrophy. *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A*. 1995; 92: 1142-1146.
  110. Podewski EK, Hilfiker-Kleiner D, Hilfiker A, Morawietz H, Lichtenberg A, Wollert KC, Drexler H. Alterations in Janus Kinase (JAK)-Signal Transducers and Activators of Transcription (STAT) Signaling in Patients With End-Stage Dilated Cardiomyopathy. *Circulation*. 2003. 107: 798-802.
  111. Remes J, Helin M, Vaino P, Rautio P. Clinical outcome and left ventricular function 23 years after acute coxsackie virus myopericarditis. *Eur Heart J*. 1990; 11: 182-184.
  112. Richardson P. Report of the 1995 World health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of Cardiomyopathies. *Circulation*. 1996; 93: 841-842.
  113. Rincon M, Anguita J, Nakamura T, Fikrig E, Flavell RA. Interleukin (IL)-6 directs the differentiation of IL-4-producing CD4+ T cells. *J Exp Med*. 1997; 185: 461-469.
  114. Roulston A, Marcellus RC, Branton PE. Viruses and Apoptosis. *Annu. Rev. Microbiol*. 1999; 53: 577-628.

115. Rudin CM, Thompson CB. Apoptosis and disease: regulation and clinical relevance of programmed cell death. *Annu. Rev. Med.* 1997; 48: 267-281.
116. Rueckert RR, Picornaviridae: The Viruses and Their Replication. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, eds. *Fundamental Virology*. New York: Raven; 1996: 477-522.
117. Sakakibara S, Konno S. Endomyocardial biopsy. *Jpn Heart J.* 1962; 3: 537-543.
118. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning - A laboratory manual*. 2<sup>nd</sup> edition. Cold Spring Harbor Press. 1989.
119. Saraste A, Arola A, Vuorinen T, Kytö V, Kallajoki M, Pulkki K, Voipio-Pulkki L-M, Hyypiä T. Cardiomyocyte apoptosis in experimental coxsackievirus B3 myocarditis. *Cardiovasc. Pathol.* 2003; 12: 255-262.
120. Schultheiß HP, Pauschinger M, Kühl U. Pathogenese der entzündlichen Kardiomyopathie. *Med. Klinik.* 1998; 93: 229-235.
121. Schwartzman RA, Cidlowski JA. Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocr. Rev.* 1993; 14: 133-151.
122. Schwinger R.H.G. Virale Herzerkrankungen. *Klinische Kardiologie*, Springer 2000; 5.Auflage, pp.1017-1040.
123. Seipelt J, Guarné A, Bergmann E, James M, Sommergruber W, Fita I, Skern, T. The structures of picornaviral proteinases. *Virus research.* 1999; 62: 159-168.
124. Sen GC. Viruses and interferons. *Annu Rev Microbiol.* 2001, 55: 255-281.
125. Shoeman RL et al. Cleavage of human and mouse cytoskeletal and sarcomeric proteins by human immunodeficiency virus type 1 protease. Actin, desmin, myosin and tropomyosin. *Am.J.Pathol.* 1993; 142: 221-230.
126. Shuai K, Horvath CM, Huang LH, Qureshi SA, Cowburn D, Darnell JE Jr. Interferone activation of the transcription factor STAT91 involves dimerization through SH2-phosphotyrosyl peptide interactions. *Cell.* 1994; 76: 821-828.
127. Sigusch HH, Reinhardt D, Figulla HR. Klinisches Bild und Differentialdiagnose von Kardiomyopathie und Myokarditis. *Med. Klinik.* 1998; 93: 236-239.

128. Smith WG. Adult heart disease due to coxsackievirus group B. *Brit heart J*. 1966; 28: 204-220.
129. Song L, Li Y, Sun YX, Yu M, Shen BF. IL-6 inhibits apoptosis of human myeloma cell line XG-7 through activation of JAK/STAT Pathway and up-regulation of Mcl-1. *Ai Zheng*. 2002; 21: 113-116.
130. Stahl N, Farruggella TJ, Boulton TG, Zhong Z, Darnell JE Jr., Yancopoulos GD. Choice of STATs and other substrates specified by modular tyrosine-based motifs in cytokine receptors. *Science*. 1995; 267: 1349-1353.
131. Strauer BE. Consensus-Konferenz Myocarditis-dilatative Kardiomyopathie. *Internist*. 1995. 36; 484-502.
132. Takeda K, Kaisho T, Yoshida N, Takeda J, Kishimoto T, Akira S. STAT3 Activation Is Responsible for IL-6-Dependent T Cell Proliferation Through Preventing Apoptosis: Generation and Characterization of T-Cell-Specific STAT3-Deficient Mice. *J. Immunol*. 1998; 161: 4652-4660.
133. Takeda K, Akira S. STAT family of transcription factors in cytokine-mediated biological responses. *Cytokine and Growth Factor Reviews*. 2000; 11: 199-207.
134. Teodoro JG, Branton PE. Regulation of apoptosis by viral gene products. *J. Virol*. 1997; 71: 1739-1746.
135. Tolskaya EA, Romanova LI, Kolesnikova MS, Ivannikova TA, Smirnova EA, Raikhlin NT, Agol VI. Apoptosis-inducing and apoptosis-preventing functions of poliovirus. *J. Virol*. 1995; 69: 1181-1189.
136. Towbin JA et al. X-linked dilated cardiomyopathy. Molecular genetic evidence of linkage to the Duchenne muscular dystrophy locus. *Circulation*. 1993; 87: 1854-1865.
137. Toyoda H, Nicklin MJH, Murray MG, Anderson CW, Dunn JJ, Studier FAW. A second virus-encoded proteinase involved in proteolytic processing of poliovirus polyprotein. *Cell*. 1986; 45: 761-770.
138. Tsujimoto Y, Shimizu S. Bcl-2 family: life-or death switch. *FEBS Lett*. 2000; 466: 6-10.
139. Tsukiyama-Kohara K, Iizuka N, Kohara M, Nomoto A. Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *J Virol*. 1992; 66: 1476-83.

140. Ulane CM, Rodriguez JJ, Parisien J-P, Horath CM. STAT3 Ubiquitylation and Degradation by Mumps Virus Suppress Cytokine and Oncogene Signaling. *J. Virol.* 2003; 77: 6385-6893.
141. Uozumi H, Hiroi Y, Zou Y, Takimoto E, Toko H, Niu P, Shimoyama M, Yazai Y, Negai R, Komuro I. Gp130 Plays a Critical Role in Pressure Overload-induced Cardiac Hypertrophy. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 23115-23119.
142. Van Creveld S, DeJager H. Myocarditis in new-bornes caused by Coxsackie virus. Clinical and pathological data. *Ann Pediatr.* 1956; 187: 100-112.
143. Wessely R, Klingel K, Santana LF, Minoru H, Dalton N, Ross J Jr., Lederer J, Kandolf R und Knowlton KU. Transgenic expression of replication deficient enteroviral genomes in heart muscle induces defective excitation-contraction coupling and dilated cardiomyopathy. *J. Clin. Invest.* 1998a; 102: 1444-1453.
144. Wessely R, Henke A, Zell R, Kandolf R und Knowlton KU. Low-level expression of a coxsackieviral cDNA induces a myocytopathic effect in culture: an approach to the study of enteroviral persistence in cardiac myocytes. *Circulation.* 1998b; 98: 450-457.
145. Wessely R, Klingel K, Knowlton KU, Kandolf R. Cardiospecific infection with coxsackievirus B3 requires intact type I interferon signaling: implications for mortality and early viral replication. *Circulation.* 2001; 103: 756-761.
146. Wimmer E. Genome-linked proteins of viruses. *Cell.* 1982; 28: 199-201.
147. Why H, Meany T, Richardson P, et al. Clinical and prognostic significance of detection of enteroviral RNA in the myocardium of patients with myocarditis or dilated cardiomyopathy. *Circulation.* 1994. 89: 2582-2589.
148. Woodruff JF. Viral Myocarditis. A review. *Am J Path.* 1980; 101: 425-484.
149. Wollert KC, Drexler H. The role of interleukin-6 in failing heart. *Heart Fail Rev.* 2001; 6: 95-103.
150. Yalmanchili P, datta U, Dasgupta A. Inhibition of host cell transcription by poliovirus: cleavage of transcription factor CREB by poliovirus-encoded protease 3C<sup>pro</sup>. *J. Virol.* 1997a; 71: 1220-1226.

151. Yalmanchili P, Weidman K, Dasgupta A. Cleavage of transcriptional activator Oct-1 by poliovirus encoded protease 3Cpro. *Virology*. 1997b; 239: 176-185.
152. Yamauchi-Takahara K. Gp130-mediated pathway and left ventricular remodeling. *J.Cardiac.Fail.* 2003; 8: 374-378.
153. Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AN, Cai J, Peng TI, Jones DP, Wang X. Prevention of Apoptosis by Bcl-2: Release of Cytochrome C from Mitochondria Blocked. *Science*. 1997. 275; 1129-1132.
154. Yasukawa H, Hoshijima M, Gu Y, Nakamura T, Praderwand S, Hanada T, Hanakawa Y, Yoshimura A, Ross J Jr., Chien KR. Suppressor of cytokine signaling-3 is a biochemical stress-inducible gene that suppresses gp130-mediated cardiac myocyte hypertrophy and survival pathways. *J.Clin.Invest.* 2001; 108: 1459-1467.
155. Yasukawa H, Yajima T, Duplain H, Iwatate M, Kido M, Hoshijima M, Weitzman MD, Nakamura T, Woodard S, Xiong D, Yoshimura A, Chien KR, Kowlton KU. The suppressor of cytokine signaling is a novel therapeutic target for enterovirus-induced cardiac injury. *J.Clin.Invest.* 2003; 111: 469-478.
156. Yeh TC, Pellegrini S. The Janus kinase family of protein tyrosine kinases and their role in signaling. *Cell Mol. Life Sci.* 1999; 55: 1523-1534.
157. Yin T, Taga T, Tsang ML, Yasukawa K, Kishimoto T, Yang YC. Involvement of IL-6 signal transducer gp130 in IL-11-mediated signal transduction. *J.Immunol.* 1993; 151: 2555-2561.
158. Yoshida K, Taga T, Saito M, Suematsu S, Kumanogoh A, Tanaka T, Fujiwara H, Hirata M, Yamagami T, Nakahata T et al. Targeted Disruption of gp130, a common signal transducer for the interleukin 6 family of cytokines, leads to myocardial and hematological disorders. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996; 93: 407-411.
159. Yuan JP, Zhao W, Wang HT, Wu KY, Li T, Guo XK, Tong SQ. Coxsackievirus B3-induced apoptosis and Caspase-3. *Cell.* 2003; 12: 203-209.

160. Zhang X, Blenis J, Li HC, Schindler C, Chen-Kiang S. Requirement of serine phosphorylation for formation of STAT-promoter complexes: *Science*. 1995; 267: 1990-1994.
161. Zolk O, Ng LL, O'Brian RJ, Weyand M, Eschenhagen T. Augmented expression of cardiotrophin-1 in failing human hearts is accompanied by diminished glycoprotein 130 receptor protein abundance. *Circulation*. 2002; 106: 1442-1446.



## 7. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1 Schematische Darstellung der Organisation des enteroviralen Genoms und der Polyproteinprozessierung durch enterovirale Proteasen
- Abbildung 2 Schematische Darstellung der IL-6-Typ-Signaltransduktion
- Abbildung 3 „Gel-Sandwich“ für den Western-Transfer
- Abbildung 4 Schematische Darstellung der berechneten Schnittwahrscheinlichkeiten von STAT3 und gp130 durch die enteroviralen Proteasen 2A und 3C
- Abbildung 5 Spaltung von STAT3 nach CVB3-Infektion in HeLa-Zellen
- Abbildung 6 Spaltung von STAT3 und Auftreten eines Spaltproduktes von STAT3 nach CVB3-Infektion in HeLa-Zellen
- Abbildung 7 Spaltung von gp130 nach CVB3-Infektion in HeLa-Zellen
- Abbildung 8 Abnahme von pSTAT3<sup>Tyr705</sup> nach CVB3-Infektion in HeLa-Zellen
- Abbildung 9 Abnahme von pSTAT3<sup>Ser727</sup> nach CVB3-Infektion in HeLa-Zellen
- Abbildung 10 Abnahme von Bcl-xL nach CVB3-Infektion in HeLa-Zellen
- Abbildung 11 Abnahme von Mcl-1 nach CVB3-Infektion in HeLa-Zellen
- Abbildung 12 Verminderung von membranständigem pSTAT3<sup>Tyr705</sup> als Zeichen einer reduzierten Phosphorylierung
- Abbildung 13 pSTAT3<sup>Tyr705</sup>-Färbung in nicht-stimulierten Zellen
- Abbildung 14 Zellulärer Phänotyp der Rezeptoruntereinheit gp130 in CVB3-infizierten HeLa-Zellen
- Abbildung 15 Hypothese der Auswirkung einer Interaktion von CVB3 mit dem IL-6-Typ Signaling

## 8. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Amp <sup>R</sup>	Ampicillin Resistenz
Apaf-1	Apoptotic protease-activating factor 1
AS	Aminosäure
ATCC	American Type Culture Collection
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
ca.	circa
cDNA	Copy DNA
CT	Cardiotrophin
CVA	Coxsackievirus A
CVB	Coxsackievirus B
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
E.Coli	Escherichia Coli
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
f.c.	final concentration
FCS	Fetales Kälberserum
gp	Glykoprotein
h	Stunde
IFN	Interferon
IL	Interleukin
Ig	Immunglobulin
IRES	Internal Ribosomal Entry Site
Jak	Janus Kinase
kDa	Kilo-Dalton
KO	Knock Out

L	Liter
LB	Luria-Bertani-Medium
LIF	Leukemia inhibitory factor
LIFR	Leukemia inhibitory factor Rezeptor
MC	Myokarditis
min	Minute
ml	Milliliter
MOI	Multiplicity of infection
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NaCl	Natriumchlorid
NP40	Nonidet Phosphat 40
NTE	Natrium tris EDTA
OD	Optische Dichte
p	pico
PBS	Phosphat buffered solution
PCR	Polymerase chain reation
PFA	Paraformaldehyd
PFU	Plaque forming unit
PIAS	Protein inhibitors of activated STATs
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SOCS	Supressor of Cytokine Signaling
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
TBE	tris-borate-EDTA
TBS	Tris buffered solution
TBS-T	Tris buffered solution, Tween 20
TE	Tris EDTA
Tris	Tris(hydroxy)aminomethan
UV	ultraviolett
V	Volt
w/v	weight/volume

## 9. Puffer und Lösungen

NTE	100mM NaCl 10mM Tris Base, pH7,4 (Sigma, Taufkirchen, #T-1503)
Zell-Lysepuffer	1ml NTE 100µl NP40 10% (v/v) 10µl Protease-Inhibitorcocktail (Sigma, Taufkirchen, #P-8340) 1mM Natriumorthovanadat (Sigma, Taufkirchen, #S-6508)
1x Westernblot-Lauf-Puffer	100ml 10x TrisGlycine SDS Lauf-Puffer (Novex, Frankfurt, #LC2675) ad 1l ddH <sub>2</sub> O
1x Westernblot-Transfer-Puffer	40ml 25xTrisGlycine Transfer-Puffer (Novex, Frankfurt, #LC3675) 200ml Methanol (Merck, Darmstadt,#8045) ad 1l ddH <sub>2</sub> O
TBS-T	150mM NaCl (Merck, Darmstadt, #1.06404.1000) 20mM Tris-HCl, pH7,5 0,05% (v/v) Tween20 (Sigma, Taufkirchen, #P-1379)
Luria Bertani-Medium (LB)	10g/l NaCl 5g/l Bacto Yeast Extract (BD, Heidelberg, #212730) 10g Bacto Tryptone (BD, Heidelberg, #211705) pH 7,0 → autoklavieren.

LB-Agar (Amp<sup>Res</sup>)

LB-Medium

15g/l Bacto™ Agar (BD, Heidelberg, #214010)

→ autoklavieren.

100µg/ml Ampicillin

1% Gel zur DNA-Analyse

100ml 1x TBE-Puffer

+1g Seakem® LE-Agarose

→ kochen, bis auf 60°C abkühlen lassen

+ 5µl Ethidiumbromid (Roth, Karlsruhe, #22181)

2xDMEM (500ml)

13,38g DMEM (Gibco, Karlsruhe, #52100-039)

3,7g NaHCO<sub>3</sub> 7,5% (Gibco BRL, Eggenstein,  
#25080-060)

10ml NaPyruvat (Gibco BRL, Eggenstein,  
#11360-039)

20ml FCS

10ml Penicillin/Streptomycin

→ pH auf 7,4 einstellen, sterilfiltrieren.

## 10. Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Allen voran gilt mein Dank Herrn PD Dr. Rainer Wessely. Neben seiner hervorragenden Einarbeitung in wissenschaftliche Arbeitsweisen bedanke ich mich für die vorbildliche Betreuung, sein persönliches Engagement und die konstruktiven Laborbesprechungen. Sein unerschütterlicher Glaube an mich und grosses Verständnis in einer schwierigen Zeit waren eine grosse Hilfe.

Desweiteren möchte ich mich bei sämtlichen Mitgliedern der Arbeitsgruppe bedanken, auf deren Unterstützung und positiven Zuspruch ich immer vertrauen konnte. Neben Sabine Merl, Conny Michaelis und Marc Vorpahl bin ich vor allem Birgit Jaschke für ihr Bemühen bei meiner Einarbeitung in das wissenschaftliche Arbeiten und Denken sowie für die herausragende Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft zu Dank verpflichtet.

Herrn Prof. Dr. Albert Schömig danke ich für die Benutzung der Laboratorien und die wissenschaftliche Weiterbildung im Rahmen der Wissenschaftsbesprechungen.

Ausserdem bedanke ich mich bei Cornelia Rieck für ihre grosse Geduld.