

Aus dem Institut für Pathologie der Universität Tübingen

Geschäftsführender Direktor: Professor Dr. B. Bültmann

Abteilung Molekulare Pathologie

Direktor: Professor Dr. R. Kandolf

Untersuchungen zur Interaktion von Coxsackievirus B3

mit dem Zytoskelett permissiver Wirtszellen im

Verlauf der Infektion

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Maike Mirja Leube

aus Stuttgart

2006

Dekan: Herr Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Frau Privatdozentin Dr. K. Klingel

2. Berichterstatter: Herr Privatdozent Dr. C. Sinzger

Für Annika

Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG	S. 1
1.1.	Coxsackieviren und dilatative Kardiomyopathie	S. 1
1.1.1.	Die dilatative Kardiomyopathie (DCM)	S. 1
1.2.	Aufbau des Coxsackievirus B3	S. 3
1.3.	Der Infektionszyklus von CVB3	S. 7
1.4.	Der Zytoskelettaufbau und die Proteinsynthese eukaryontischer Zellen	S. 9
1.4.1.	Das Zytoskelett eukaryontischer Zellen	S. 9
1.4.1.1.	Intermediärfilamente	S.10
1.4.1.2.	Mikrotubuli	S.10
1.4.1.3.	Aktin	S.10
1.4.2.	Die Proteinsynthese in eukaryontischen Zellen	S.12
1.4.2.1.	Freie Polysomen	S.12
1.4.2.2.	Membrangebundene Polysomen	S.12
1.4.2.3.	Zytoskelett-assoziierte Polysomen	S.13
1.5.	Viren und das Zytoskelett der Zielzelle	S.14
1.6.	Einflüsse von Calcium auf das Zytoskelett infizierter Zellen	S.15
1.7.	Virusreplikation und Golgiapparat	S.16
1.8.	Ziel der Arbeit	S.17
2.	MATERIAL UND METHODEN	S.18
2.1.	Material	S.18
2.1.1.	Chemikalien	S.18
2.1.2.	Zellkulturmedien und Zusätze	S.19
2.1.3.	Enzyme	S.19
2.1.4.	Nukleotide und Nukleinsäure	S.20
2.1.5.	Plasmide	S.20
2.1.6.	Bakterienstämme	S.20
2.1.7.	Antikörper	S.20
2.1.8.	Sonstiges	S.21
2.1.9.	Viren	S.21

2.2.	Methoden	S.21
2.2.1.	Herstellung eines Virusstocks	S.21
2.2.2.	Zellkultur	S.22
2.2.2.1.	Allgemeines zur Zellkultur	S.22
2.2.2.2.	Splitten der Zellen	S.22
2.2.2.3.	Anzucht der HeLa-Zellen auf Objektträgern	S.22
2.2.3.	<i>In vitro</i> Infektion mit CVB3	S.23
2.2.3.1.	CVB3-Infektion der auf Objektträgern angezüchteten Zellen	S.23
2.2.3.2.	Fixierung der Zellen	S.23
2.2.4.	Immunhistochemische Färbungen	S.23
2.2.4.1.	Antikörper, Chemikalien und Lösungen	S.23
2.2.4.2.	Protokoll zur immunhistochemischen Darstellung von zellulären und viralen Proteinen	S.24
2.2.5.	Ein-Schritt-Wachstumskurven	S.26
2.2.5.1.	Anzucht, Infektion und Virusgewinnung	S.26
2.2.5.2.	Virustiterbestimmung aus Überstand	S.26
2.2.5.3.	Intrazellulärer Virusgehalt	S.26
2.2.5.4.	Bestimmung des Virustiters im Plaque-Test	S.26
2.2.6.	Nachweis von CVB3 RNA durch <i>in situ</i> Hybridisierung	S.28
2.2.6.1.	Vorbehandlung der Objektträger	S.28
2.2.6.2.	Vorbehandlung der Deckgläschen	S.29
2.2.6.3.	Herstellung der CVB3 RNA-Hybridisierungssonde	S.29
2.2.6.4.	Radioaktive Markierung der RNA-Sonden	S.29
2.2.6.5.	Sephadex [®] G50 Säulenzentrifugation	S.30
2.2.6.6.	Limitierte alkalische Hydrolyse der radioaktiv markierten RNA	S.30
2.2.6.7.	RNA-RNA <i>in situ</i> Hybridisierung	S.31
2.2.6.8.	Permeabilisierung der Zellen	S.31
2.2.6.9.	Hybridisierung der Zellen	S.32
2.2.6.10.	Posthybridisierung	S.33
2.2.6.11.	Autoradiographie	S.33
2.2.6.12.	Entwicklung der Autoradiographien	S.34
2.2.6.13.	Hämatoxilin-Eosin-Färbung	S.34

3.	ERGEBNISSE	S.35
3.1.	Viruspezifische Veränderungen des Zytoskeletts im Verlauf der CVB3-Infektion	S.35
3.1.1.	Immunhistochemische Darstellung von Intermediärfilamenten in uninfizierten und CVB3-infizierten HeLa-Zellen	S.36
3.1.2.	α -Tubulin	S.38
3.1.3.	F-Aktin	S.39
3.2.	Differenzierung zwischen Stress- und Virus-spezifischen Veränderungen des Zytoskeletts im Rahmen der CVB3-Infektion	S.40
3.2.1.	Intermediärfilamente unter osmotischem und thermischem Stress	S.40
3.2.2.	α -Tubulin unter osmotischem und thermischem Stress	S.40
3.2.3.	F-Aktin unter osmotischem und thermischem Stress	S.41
3.3.	Zeitlicher Verlauf der Schädigung des Aktingerüsts im Rahmen der Infektion mit CVB3	S.41
3.3.1.	Darstellung von Aktinfilamenten im Verlauf der Infektion	S.41
3.3.2.	Nachweis viraler RNA in HeLa-Zellen während der frühen Phase der Infektion	S.42
3.4.	Einfluß von CVB3 auf das Zytoskelett von Myozyten	S.43
3.4.1.	Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen an kultivierten Rattenmyozyten	S.43
3.4.2.1.	Untersuchung der Aktinstruktur in Herzmuskelzellen <i>in vivo</i> am Mausmodell der CVB3-Myokarditis	S.45
3.5.	Einfluß des Calciums auf Veränderungen des Aktinskeletts bei der CVB3-Infektion	S.46
3.5.1.	CVB3-Infektion von HeLa-Zellen unter Verapamil	S.47
3.5.2.	CVB3-Infektion von HeLa-Zellen unter calciumfreien Bedingungen	S.47
3.5.3.	CVB3-Infektion von HeLa-Zellen unter Thapsigargin	S.47
3.6.	Untersuchungen zur Abhängigkeit der CVB3-Replikation von einzelnen Zytoskelettkompartimenten	S.48
3.6.1.	CVB3-Infektion von HeLa-Zellen unter Zugabe von Nocodazol	S.48
3.6.1.1.	Immunfluoreszenz zum Nachweis viraler Hüllproteine unter Nocodazol	S.49
3.6.1.2.	Ein-Schritt-Wachstumskurve unter Nocodazol	S.49
3.6.1.3.	<i>In situ</i> Hybridisierung zum Nachweis viraler RNA unter Nocodazol	S.50

3.6.2.	CVB3-Infektion von HeLa-Zellen unter Zugabe von Taxol	S.50
3.6.2.1.	Immunfluoreszenz zum Nachweis viraler Hüllproteine unter Taxol	S.50
3.6.2.2.	Ein-Schritt-Wachstumskurve unter Taxol	S.51
3.6.2.3.	<i>In situ</i> Hybridisierung zum Nachweis viraler RNA unter Taxol	S.51
3.6.3.	CVB3-Infektion von HeLa-Zellen unter Zugabe von Cytochalasin D	S.51
3.6.3.1.	Immunfluoreszenz zum Nachweis viraler Hüllproteine unter Cytochalasin D	S.51
3.6.3.2.	Ein-Schritt-Wachstumskurve unter Cytochalasin D	S.52
3.6.3.3.	<i>In situ</i> Hybridisierung zum Nachweis viraler RNA unter Cytochalasin D	S.53
3.7.1.1.	Untersuchungen zur Abhängigkeit der CVB3-Replikation in HeLa-Zellen vom Calciumeinstrom durch L-Calcium-Kanäle	S.53
3.7.1.	CVB3-Infektion von HeLa-Zellen unter Verapamil	S.53
3.7.1.1.	Immunfluoreszenz zur Darstellung von Aktin und viralen Hüllproteinen unter Verapamil	S.54
3.7.1.2.	Ein-Schritt-Wachstumskurve unter Verapamil	S.54
3.7.1.3.	<i>In situ</i> Hybridisierung zum Nachweis viraler RNA unter Verapamil	S.54
3.8.	Untersuchung der Abhängigkeit der CVB3-Replikation vom Golgiapparat	S.54
3.8.1.	CVB3-Infektion von HeLa-Zellen unter Brefeldin A	S.54
3.8.1.1.	Immunfluoreszenz zum Nachweis viraler Hüllproteine unter Brefeldin A	S.54
3.8.1.2.	Ein-Schritt-Wachstumskurve unter Brefeldin A	S.56
3.8.1.3.	<i>In situ</i> Hybridisierung zum Nachweis viraler RNA unter Brefeldin A	S.56
3.9.	Zusammenfassung der Ergebnisse	S.58
4.	DISKUSSION	S.61
4.1.	Zytoskelettveränderungen bei der Infektion mit CVB3 im Vergleich mit anderen Virusinfektionen	S.61
4.1.1.	Intermediärfilamente	S.61
4.1.2.	α -Tubulin	S.63
4.1.3.	Mikrofilamente	S.64
4.2.	Einfluß von Calcium auf die Zerstörung der Mikrofilamente bei der CVB3-Infektion	S.68

4.3.	Interaktion von CVB3 mit dem Zytoskelett von Myozyten	S.70
4.4.	Die Rolle des Golgiapparates im Rahmen der CVB3-Replikation	S.72
5.	ZUSAMMENFASSUNG	S.74
6.	LITERATURVERZEICHNIS	S.77
	DANKSAGUNG	S.87
	LEBENS LAUF	S.88

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AP	Alkalische Phosphatase
APC	Antigen presenting cell
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	Cluster of differentiation
Cl. difficile	Clostridium difficile
cpm	Counts per minute
CVB3	Coxsackievirus B3
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
depc	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonucleic acid
FCS	Fötales Kälberserum
HCMV	Humanes Cytomegalievirus
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
HPIV3	Humanes Parainfluenzavirus Typ 3
HSV	Herpes simplex Virus
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
LB Medium	Luria Bertani Medium
PCR	Polymerase chain reaction/Polymerasekettenreaktion
pfu	Plaque-forming unit
pi	Post infectionem
PBS	Phosphate-buffered saline
OD	Optische Dichte
RNA	Ribonucleic acid
RNAguard	RNase-Inhibitor
rpm	Rounds per minute
RT	Reverse Transkription
rTth-Polymerase	Reverse Thermus thermophilus DNA-Polymerase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Standard saline citrate
Taq-Polymerase	Thermus aquaticus DNA-Polymerase
TBS	Tris buffered saline
UV	Ultraviolett

1. EINLEITUNG

1.1. Coxsackieviren und dilatative Kardiomyopathie

Coxsackieviren gehören zu den Enteroviren aus der Familie der Picornaviren. Das erste Isolat von Coxsackieviren erfolgte aus dem Stuhl zweier Kinder aus der Stadt Coxsackie im US-amerikanischen Bundesstaat New York (Dalldorf & Sickles, 1948). Sechs Serotypen werden bei den Coxsackieviren der Gruppe B (CVB1-CVB6) unterschieden. Coxsackieviren verursachen eine Vielzahl verschiedener Erkrankungen, deren Spektrum von leichten, grippeähnlichen Erkältungen bis hin zu Meningitis, Paralysen des ZNS und Myokarditis reicht (Melnick, 1996). Das Coxsackievirus B4 (CVB4) wird als Auslöser der juvenilen Diabetes, einer Autoimmunerkrankung, diskutiert (Foulis et al., 1990). Die größte klinische Bedeutung hat aber Coxsackievirus B3 (CVB3), welches als häufiger Erreger viraler Herzerkrankungen, insbesondere der viralen Myokarditis, gefunden wird (Kandolf & Hofschneider, 1989). Vor allem bei Säuglingen ist die akute Virusmyokarditis mit einer sehr hohen Letalitätsrate von über 50% behaftet (Woodruff, 1980). Wird die akute Virusmyokarditis infolge einer CVB3-Infektion überstanden, so besteht dennoch die Möglichkeit eines chronischen Verlaufes der Myokarditis, die mit Viruspersistenz im Myokard einhergeht. Dieser chronische Verlauf kann über bisher nicht vollständig geklärte Mechanismen zum klinischen Bild einer dilatativen Kardiomyopathie (DCM) und einer folgenden Herzinsuffizienz führen.

1.1.1. Die dilatative Kardiomyopathie (DCM)

Die DCM stellt neben der koronaren Herzerkrankung (KHK), der hypertensiven Herzkrankheit und verschiedenen Herzklappenerkrankungen eine der häufigsten Ursachen für Herzinsuffizienz dar. Eine Studie aus England zur Inzidenz und Ätiologie der Herzinsuffizienz zeigte, dass in etwa 17% der Fälle eine DCM als Ursache der Herzinsuffizienz angenommen werden kann (Cowie et al., 1999). Die Kardiomyopathie wird von der WHO als „Erkrankung des Myokards assoziiert mit kardialer Dysfunktion“ definiert (Richardson et al., 1996), wobei die DCM die häufigste Form der Kardiomyopathien darstellt (Codd et al., 1989). Die DCM ist

charakterisiert durch eine Dilatation und eingeschränkte Kontraktilität eines oder beider Ventrikel. Die jährliche Inzidenz variiert in den westlichen Industrieländern zwischen 5 und 8 Fällen pro 100.000 Einwohnern (Bagger et al., 1984; Codd et al., 1989; Gillum, 1986; Williams & Olsen, 1985). Männer sind von der Erkrankung bei einem Verhältnis von fast 3:1 wesentlich häufiger betroffen als Frauen. Klinische Symptome treten erst relativ spät im Verlauf der Erkrankung auf, d.h. häufig erst infolge einer bereits über Monate bis Jahre bestehenden linksventrikulären Dilatation (Codd et al., 1989; Felker et al., 2000; Kasper et al., 1994). Nach dem Auftreten klinischer Symptome einer Herzinsuffizienz ist die Prognose der DCM ernst. Die durchschnittliche 5-Jahres-Mortalität symptomatischer Patienten wird mit 20% angegeben (Sugrue et al., 1992). Die Ursachen für eine DCM sind vielfältig und reichen von der Myokarditis (9%), der KHK (7.4%), der hypertensiven Herzerkrankung (4%), der HIV-Infektion (3.7%) bis hin zu Kardiomyopathien bei Bindegewebserkrankungen, toxischen Kardiomyopathien, wie z.B. der alkoholtoxischen (2.3%), sowie metabolischen Kardiomyopathien (1%). Am häufigsten wird allerdings die Diagnose der sogenannten idiopathischen DCM mit 50.1% gestellt (Felker et al., 2000). Für einen Teil der idiopathischen DCM wird mittlerweile eine erbliche Genese angenommen, die aufgrund epidemiologischer Untersuchungen auf 20-30% geschätzt wird (Grünig et al., 1998; Michels et al., 1992). Einige verantwortliche Gene konnten bereits identifiziert werden. Neben zwei X-chromosomalen Genen, die für die Proteine Dystrophin (Berko & Swift, 1987) und Taffazin (Bione et al., 1996) kodieren, sind bislang 4 autosomale Gene für die Proteine Desmin (Li et al., 1990), Laminin A/C (Kass et al., 1994), δ -Sarkoglykan (Tsubata et al., 2000) und Aktin (Olson et al., 1998) beschrieben. All diese Gene kodieren für Proteine des Zytoskeletts, die für die strukturelle Integrität der Herzmuskelzelle sowie die Kraftübertragung vom Sarkomer auf die extrazelluläre Matrix verantwortlich sind. Diese Formen der DCM können deshalb auch als „Zytoskelettopathien“ bezeichnet werden.

Neben der idiopathischen und der ischämischen Genese wird die entzündliche Kardiomyopathie als eine der Hauptursachen der DCM angesehen (Codd et al., 1989; Felker et al., 2000). Der Begriff „entzündliche Kardiomyopathie“ beschreibt eine Myokarditis assoziiert mit kardialer Dysfunktion (Richardson et al., 1996). Myokarditiden können durch infektiöse Organismen, durch Toxine oder im Rahmen einer systemischen Erkrankung als Autoimmunerkrankung auftreten (Feldmann &

McNamara, 2000). Die weltweit am häufigsten auftretende Myokarditis ist wohl die in Mittel- und Südamerika endemisch auftretende Chagas-Erkrankung, verursacht durch das Protozoon *Trypanosoma cruzi*. Etwa 20% der Erkrankten entwickeln nach Jahren eine chronische Herzinsuffizienz (Higuchi et al., 1997; Schofield & Dias, 1999). In den Industrieländern wird als häufigste Ursache für eine Myokarditis eine virale Infektion angesehen. Wahrscheinlich können sehr viele humanpathogene Viren eine Myokarditis hervorrufen, die häufigsten sind aber Enteroviren, insbesondere das CVB3. Mittels *in situ* Hybridisierung konnte für Enteroviren im Herzmuskel eine Nachweisrate von 20-30% bei Patienten mit aktiver Myokarditis sowie eine Nachweisrate von 17-30% bei Patienten mit DCM ermittelt werden (Kandolf et al., 1990; Martino et al., 1995). Adenoviren scheinen ebenfalls als kardiotropes infektiöses Agens für die Entstehung einer Myokarditis eine Rolle zu spielen (Grumbach et al., 1999) und auch für das Hepatitis C-Virus gibt es Hinweise für einen Zusammenhang mit der Entstehung einer DCM (Matsumori et al., 1995). Die pathogenetischen Mechanismen, welche den Übergang einer Enterovirus-induzierten entzündlichen Herzmuskelerkrankung in eine DCM erklären, sind noch nicht hinreichend bekannt. Neben direkten zytotoxischen Effekten im Rahmen der Virusreplikation werden auch humorale und zelluläre Immunmechanismen dafür verantwortlich gemacht, dass bei bestimmten Patienten die akute enterovirale Myokarditis nicht ausheilt, sondern in eine chronische Verlaufsform übergeht (Sole & Liu, 1993; Kandolf et al., 1999; Klingel et al., 2000).

1.2. Aufbau des Coxsackievirus B3

Das CVB3 gehört der Familie der Picornaviren an. Zu dieser Gruppe gehören neben den Coxsackieviren noch eine Vielzahl weiterer tier- und humanpathogener Viren, wie z.B. das Maul-und Klauenseuche-Virus, das Poliovirus und das Hepatitis A-Virus. In der folgenden Tabelle (Tabelle 1) wird die neuste Klassifikation der Picornaviridae mit derzeit 9 verschiedenen Genotypen wiedergegeben.

Tabelle 1: Übersicht über wichtige Vertreter der Familie *Picornaviridae*

Klassifikation der Picornaviridae

<u>Genus</u>	<u>Spezies</u>	<u>Anzahl der Serotypen</u>	<u>Bezeichnung der Serotypen</u>
<i>Enterovirus</i>	Poliovirus	3	PV-1-3
	Humanes Enterovirus A	12	CV-A2-8,10,12,14,16 EV 71
	Humanes Enterovirus B	37	CV-B1-6, CV-A9, E-1-7,9,11-21,24-27 29-33, EV-69,73
	Humanes Enterovirus C	11	CV-A1,11,13,15,17-22, 24
	Humanes Enterovirus D	2	EV-68, EV-70
	Bovines Enterovirus	2	BEV-1, BEV-2
	Porzines Enterovirus A	1	PEV-8
	Porzines Enterovirus B	2	PEV-9, PEV-10
<i>Rhinovirus</i>	Humanes Rhinovirus A	74	HRV-1,2,7-13,15,16,18,19 21-25,28-34,36,38-41,43- 47,49-51,53-68,71,73-78,80- 82,85,88-90,94-96,98,100
	Humanes Rhinovirus B	25	HRV-3-6,14,17,26,27,35,37, 42,48,52,69,70,72,79,83,84, 86,91-93,97,99
<i>Cardiovirus</i>	Enzephalomyokarditisvirus	1	EMCV, Mengovirus
	Theilovirus	3	TMEV, VHEV, REV
<i>Aphthovirus</i>	Maul-und Klauenseuche Virus	7	FMDV-O,A,C, Asia 1, SAT1, SAT2, SAT3
	Equines Rhinitis-A Virus	1	ERAV
<i>Hepatovirus</i>	Hepatitis A Virus	1	HAV
	AELV*	1	AEV
<i>Parechovirus</i>	Humanes Parechovirus	2	HpeV-1, HpeV-2
	Ljunganvirus	1	LV
<i>Erbovirus</i>	Equines Rhinitis-B Virus	2	ERBV-1, ERBV-2
<i>Kobuvirus</i>	Aichivirus	1	AiV
<i>Teschovirus</i>	Porzines Teschovirus	11	PTV-1-11

Nach: Stanway et al., 2002 (für *ICVT Picornaviridae Study Group*)

Abkürzungen: AELV, Avian encephalitis-like virus, AEV, Avian encephalitis virus, AiV Aichivirus, BEV, bovines Enterovirus, CVA, Coxsackie-A-Virus, CVB, Coxsackie-B-Virus, EMCV, Enzephalomyokarditis-Virus, ERAV, equines Rhinitis-A-Virus, ERBV, equines Rhinitis-B-Virus, FMDV, Foot-and-mouth disease virus, HEV, humanes Enterovirus, HpeV, humanes Parechovirus, HRV, humanes Rhinovirus, LV, Ljunganvirus, PEV, porzines Enterovirus, PTV, porzines Teschovirus, PV, Poliovirus, SAT, South African Territories, REV, Rattenenzephalomyelitisvirus, TMEV, Theiler murines Enzephalomyelitisvirus, VHEV, Vilyuisk humanes Enzephalomyelitis-Virus.
*Potentielle Spezies des Hepatovirusgenus

Das Spektrum der von Picornaviren verursachten Erkrankungen reicht vom einfachen Schnupfen über die Virusmyokarditis bis hin zur Kinderlähmung oder der für die Landwirtschaft verheerenden Maul- und Klauenseuche (Melnick, 1996). "Pico-RNA-Viren" sind klein und besitzen einen RNA-Strang positiver Polarität als Genom. Die Kapsidraumstruktur der Picornaviren konnte durch Röntgenstrukturanalyse kristallisierter Viruspartikel aufgeklärt werden (Hogle et al., 1985; Rossmann 1989; Luo et al., 1987; Muckelbauer et al., 1995).

Picornaviren bilden ca. 30 nm große, unbehüllte, ikosaedrische Partikel, die sich aus jeweils zwölf Pentameren zusammensetzen. Ein Pentamer besteht wiederum aus fünf Protomeren der vier Strukturproteine VP1, VP2, VP3 und VP4. VP1, VP2 und VP3 bilden die Oberfläche des Virions, während VP4, das kleinste Kapsidprotein, auf der Innenseite des Kapsids lokalisiert ist (Fricks & Hogle, 1990). Um die fünffache Symmetrieachse des Virions liegt eine Vertiefung, der sogenannte Canyon, der maßgeblich an der Virus-Rezeptor-Interaktion beteiligt ist (Muckelbauer et al., 1995).

Aufbau der Coxsackieviren

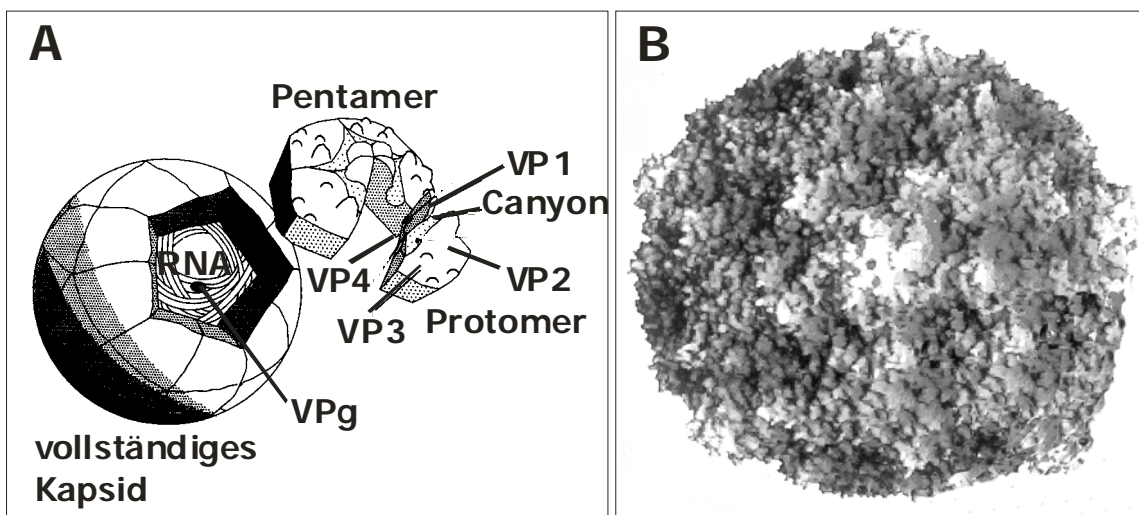


Abb. 1: Schematische Darstellung des Aufbaus von Picornaviren (nach Rueckert, 1996) (A). Kristallographisch ermittelte Oberflächenstruktur von Coxsackievirus B3 (B) (Muckelbauer et al., 1995).

Die genomische RNA des CVB3 ist 7,4 Kilobasen lang (Klump et al., 1990) und liegt als Einzelstrang positiver Polarität vor, welcher am 3'-Ende polyadenyliert ist. Am 5'-Ende der CVB3 RNA ist das kleinste virale Protein, VPg, kovalent über eine Phosphodiesterbindung gebunden (Chatterjee & Nejman, 1985). Die nicht-kodierende 5'-terminale Region von etwa 700 Nukleotiden Länge ist durch eine ausgeprägte hochkomplexe Sekundär- und Tertiärstruktur gekennzeichnet (Hewlett & Florkiewicz, 1980; Klump et al., 1990). Diese Genomregion ist innerhalb der Gruppe der Enteroviren stark konserviert, was auf ihre Bedeutung im Rahmen der enteroviralen Replikation hinweist. Während der viralen Proteinsynthese binden an diese Strukturen sowohl zelluläre als auch virale Kofaktoren, wodurch die Cap-unabhängige Translation des enteroviralen Genoms ermöglicht wird (Pelletier & Sonenberg, 1989; Meerovitch et al., 1989; Harris et al., 1994). Die Translation des 6,8 kb langen offenen Leserahmens ergibt ein 243 kDa großes Polyprotein, das durch Virus-kodierte Proteinasen über mehrere Zwischenstufen in elf virale Einzelproteine gespalten wird. Zu diesen Proteinen zählen vier Strukturproteine (VP 1-4), die Proteinasen 2A^{Pro} und 3C^{Pro}, das VPg-Protein (3B), drei weitere Nichtstrukturproteine (2B, 2C, 3A) und die RNA-abhängige RNA-Polymerase 3D^{Pol}. Einigen Vorläuferproteinen konnten autonome katalytische Funktionen zugeordnet werden.

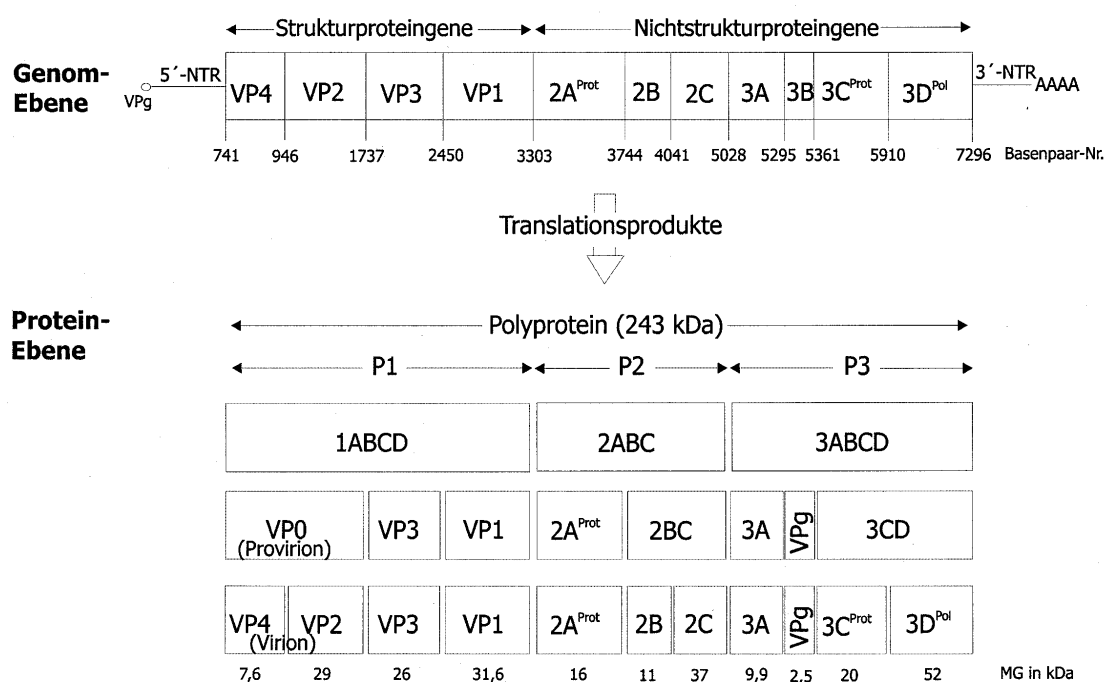


Abb 2: Coxsackievirus B3: Genom und Translationsprodukte.

1.3. Der Infektionszyklus von CVB3

Für seine Replikation benötigt CVB3 eine permissive Zielzelle. Die Synthese neuer viraler Partikel stellt einen hochkomplexen Prozess dar, der sich vereinfachend in folgende Schritte unterteilen lässt:

Adsorption → Penetration → Uncoating (Freisetzung viraler Nukleinsäuren) → Replikation der viralen Nukleinsäure und Synthese von Virusproteinen → Zusammenbau der Viren → Ausschleusung der neugebildeten Viren (siehe Abb. 3)

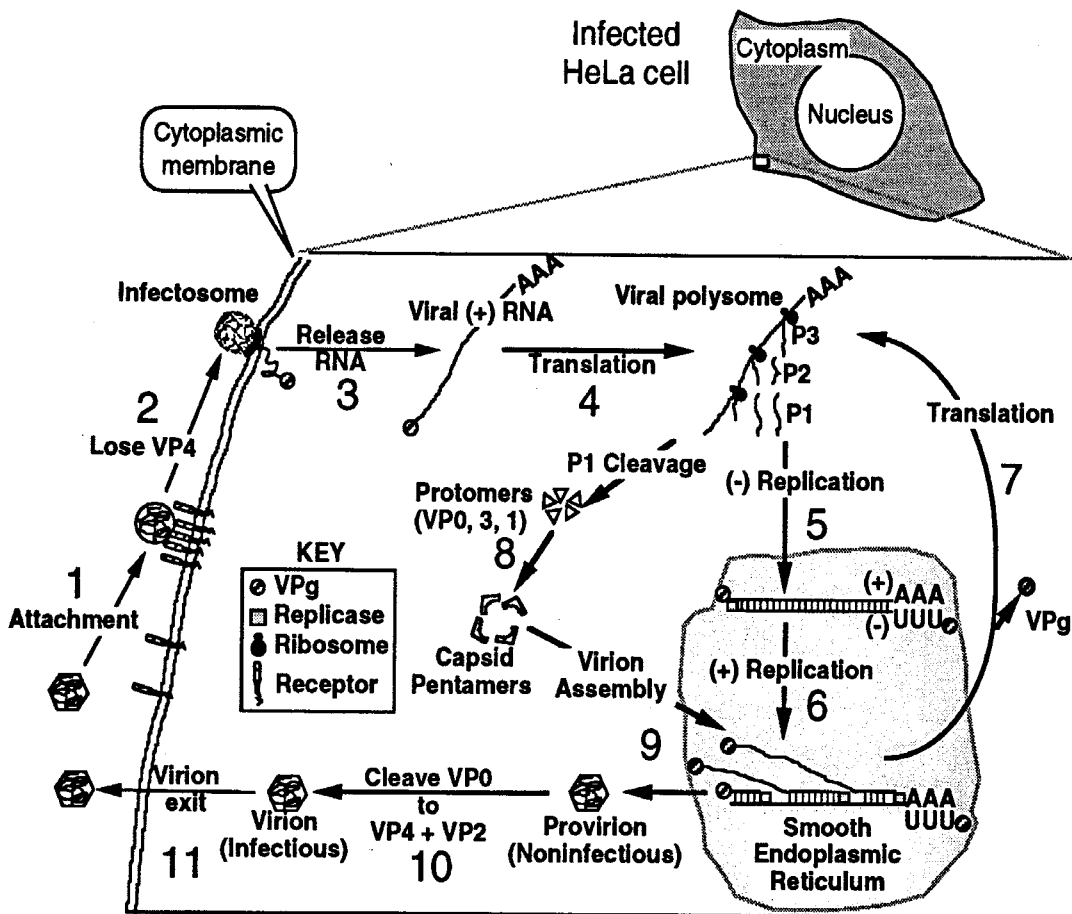


Abb. 3: Schematische Darstellung des picornaviralen Infektions- und Replikationszyklus (Rueckert, 1996).

Bei der Adsorption bindet das Virus an den CAR-Rezeptor (Coxsackie- and Adenovirus-Rezeptor) der Zellmembran der Zielzelle. Die Rezeptorzahl kann je nach Zelllinie variieren (Cohen et al., 2001). Nach der Bindung an den Rezeptor erfolgt die Aufnahme vermutlich durch Rezeptor-vermittelte Endozytose. An der Stelle, an der

sich der Virus-Rezeptor-Komplex befindet, stülpt sich die Zellmembran ein und der entstandene Komplex wird ins Zellinnere aufgenommen. Die Freisetzung der viralen RNA wird durch eine Interaktion zwischen Virushülle und endosomaler Membran vermittelt, wobei die Endosomenmembran auf einen pH-Wert von ca. 5 angesäuert werden muss. Durch die Ansäuerung werden hydrophobe Bereiche exponiert. Diese Veränderung der Oberfläche ermöglicht eine Bindung der viralen RNA an die Lipiddoppelschicht der Membran und die Aufnahme in das Zytoplasma (Fricks & Hogle, 1990). Die nun im Zytoplasma vorliegende Plusstrang-RNA kann unmittelbar als mRNA dienen. Als Translationssignal fungiert die Abspaltung des VPg, ein am 5'-Ende kovalent gebundenens Protein (Rueckert, 1996). Diese Abspaltung geschieht durch ein zelluläres Enzym (Ambros & Baltimore, 1980). Zur Translation binden Ribosomen an die nicht-translatierte 5'-Region (Sonnenberg & Pelletier, 1989). Das erste Translationsprodukt ist ein 243 kD großes Polyprotein, welches enzymatisch in einzelne Proteine gespalten wird. Dies geschieht enzymatisch durch die viralen Proteinasen 2A^{pro}, 3C^{pro} und 3CD^{pro} und stellt eine Prozessierung dar, welche bei Poliovirus sehr gut untersucht wurde (Pallansch et al., 1984, Palmenberg, 1990). Die virale Proteinase 2A^{pro} spaltet das Polyprotein in das Kapsid-Vorläuferprotein P1 und das Nichtstruktur-Vorläuferprotein P2P3. Alle weiteren Spaltungen werden von den Proteinasen 3C^{pro} und 3CD^{pro} durchgeführt. Die Prozessierung der Hüllproteine VP4 und VP2 aus VP0 verläuft autokatalytisch, wahrscheinlich unter Mitwirkung der viralen RNA (Kräusslich et al., 1988).

Die zelluläre Proteinsynthese wird während der viralen Replikation weitgehend gehemmt. Es kommt zum sogenannten "host cell shut off". Sechs Stunden nach der Infektion beträgt die zelluläre Proteinsynthese bei Infektion mit Coxsackieviren nur noch 20% des ursprünglichen Wertes (Chatterjee & Tuchowski, 1981). Wie Untersuchungen bei der Poliovirusinfektion gezeigt haben, spielt die virusinduzierte Inaktivierung des Initiationsfaktors eIF-4 γ eine entscheidende Rolle beim „host cell shut off“ (Etchison et al., 1982). Daneben werden auch die spezifische Inaktivierung von Transkriptionsfaktoren (Rubinstein & Dasgupta, 1989), eine Veränderung intrazellulärer Kationen (Gary et al., 1989), sowie eine Änderung der Membranpermeabilität (Lacal & Carasco, 1982) im Zusammenhang mit dem „host cell shut off“ diskutiert.

Das Genom der Enteroviren kodiert auch für eine RNA-abhängige RNA-Polymerase 3D^{pol}, die eine komplementäre Minusstrang-RNA synthetisiert. Diese Minusstrang-

RNA dient als Matrize für die Synthese neuer Plusstrang-RNA. An einem Komplementärstrang können gleichzeitig mehrere Plusstrang-RNA Moleküle synthetisiert werden, wodurch die Effizienz der Synthese sehr gesteigert wird (Larsen et al., 1980). Die neu synthetisierte Plusstrang-RNA wird entweder in Prokapside eingebaut oder für weitere Replikationsrunden verwendet.

Die detaillierten Schritte der Virusreifung sind noch nicht bekannt. Man geht jedoch nicht von einem spontanen Prozess aus, sondern nimmt an, dass "ordnende Hilfsstrukturen" in diesen Vorgang involviert sind. Der terminale Reifungsschritt besteht in einer autokatalytischen Spaltung des Kapsid-Vorläuferproteins VP0 in die Kapsidproteine VP4 und VP2, wodurch die Virionstruktur geschlossen wird (Kräusslich et al., 1988). Anschließend werden die neugebildeten Viren aus der Zelle ausgeschleust. Pro Zelle werden etwa 100.000 infektiöse Viren gebildet (Rueckert, 1996). Die Freisetzung erfolgt normalerweise im Rahmen der virusinduzierten Zellyse.

1.4. Der Zytoskelettaufbau und die Proteinsynthese eukaryontischer Zellen

1.4.1. Das Zytoskelett eukaryontischer Zellen

Das Zytoskelett ist ein komplexes Geflecht aus Proteinfilamenten, welche mit Plattenstrukturen in der Zellmembran, den Zell-zu-Zell-Verbindungen, in Kontakt stehen können. Es bestimmt die Gestalt sowie die innere Architektur einer eukaryontischen Zelle, wobei es in Vertebratenzellen besonders ausgeprägt ist und weniger in Pflanzen- und Pilzzellen, die von einer festen Zellwand umgeben werden und keine Zell-zu-Zell-Verbindungen aufweisen. Dabei handelt es sich aber nicht um eine statische Struktur, wie der Begriff Skelett nahelegen könnte, vielmehr ist das Zytoskelett eine äußerst dynamische Struktur. Die bislang bekannten Filamentgruppen bestehen aus Proteinen, deren Untereinheiten abgebaut, neu aufgebaut oder auch umgebaut werden können. Dies zeigt sich besonders eindrücklich beim Wachstum, der Zellteilung oder der Zelldifferenzierung.

Das Zytoskelett eukaryontischer Zellen setzt sich aus drei Hauptgruppen von Filamenten zusammen, deren Untergruppen je nach Zelltyp variieren können. Man unterscheidet die Intermediärfilamente, die Mikrotubuli sowie die Mikrofilamente.

1.4.1.1. Intermediärfilamente

Zu den Intermediärfilamenten zählen Keratin, Vimentin, Desmin (v.a. in Muskelzellen), sowie die im ZNS vorkommenden Filamente Peripherin, Gliafilament und die Neurofilamente L, M und H. Im Zellkern gehören zu den Intermediärfilamenten Lamin A und B. Intermediärfilamente haben einen Durchmesser von 7-12 nm. Sie stellen ein weitverzweigtes Netzwerk dar, das den Zellkern umgibt und sich in die Peripherie des Zellplasmas ausbreitet. Dort tritt es mit der Plasmamembran in Kontakt (Osborn et al., 1982). Intermediärfilamente bilden hierbei ein dreidimensionales Netzwerk. Besonders Keratin hat eine Skelettfunktion in der Zelle. Seine Hauptaufgabe ist es, der Zelle Stabilität auch unter mechanischem Stress zu gewährleisten.

1.4.1.2. Mikrotubuli

Mikrotubuli sind röhrenförmige Strukturen mit einem Außendurchmesser von 25 nm und einem Innendurchmesser von 10 nm. Ein einzelner Mikrotubulus besteht aus 13 Protofilamenten, welche eine Röhrenstruktur aufbauen. Nur extrem selten gibt es Abweichungen von dieser Zahl an Protofilamenten. Die einzelnen Protofilamente bestehen aus den Untereinheiten α - und β -Tubulin. Diese globulären Proteine haben jeweils einen Durchmesser von 4nm und eine Molekularmasse von 50 kDa und bilden das α,β -Dimer. Mikrotubuli breiten sich strahlenförmig von der perinukleären Region in die äußeren Bereiche der Zelle aus. Sie übernehmen Transportaufgaben und vermitteln der Zelle eine gewisse Polarität (Osborn & Weber, 1976).

1.4.1.3. Aktin

Aktinhaltige Filamente werden auch Mikrofilamente genannt. Ein Aktinfilament besteht aus zwei helikal angeordneten Reihen globulärer Aktinmoleküle und hat einen Durchmesser von ca. 6 nm. Aktin in Filamentform wird als F-Aktin bezeichnet, die Monomerform wird G-Aktin (globulär) genannt. *In vitro* lassen sich G- und F-Aktin leicht ineinander überführen. F-Aktin bildet sich v.a. unter physiologischen Konzentrationen von Mg^{2+} und K^+ . In Zellen kommt Aktin meist in großen Mengen vor und macht z.B. in der Leberzelle 1-2% des Gesamtproteines aus, in der Muskelzelle

sogar bis 25%. Beim Menschen sind neben 40 Pseudogenen sechs Gene für Aktin beschrieben worden. Die Aktine der Säuger ordnet man in 3 Gruppen (α , β und γ). Von den α -Aktinen kommt eines im Herzmuskel, das andere in Skelettmuskelzellen vor, die beiden β -Aktine sind für glatte Muskelzellen typisch und die γ -Aktine für nicht-Muskelzellen (Alberts et al., 1989). Es gibt eine große Anzahl aktinbindender Proteine, für die spezifische Bindungsstellen vorhanden sein müssen. Quervernetzende Proteine besitzen mindestens zwei Bindungsstellen für F-Aktin und bilden mit den Aktinfilamenten ein dreidimensionales Netzwerk, wodurch die Viskosität des Zytoplasmas erhöht wird. Andere aktinbindende Proteine bilden Brücken zwischen F-Aktin und Membranen oder anderen Strukturen der Zelle oder stehen mit Bewegungsvorgängen in Zusammenhang wie beispielsweise die Myosine. Aktinfilamente spielen eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der Zellform und sind für viele Funktionen bei der Zellmotilität verantwortlich, so auch für die Fortbewegungsfähigkeit, das Zusammenziehen der Zelle und das zytoplasmatische „Streaming“ (Kirkeeide et al., 1993).

Aktinfilamente und Mikrotubuli kommen im Zytoplasma nahezu aller eukaryontischen Zellen vor und weisen einige Gemeinsamkeiten auf:

- sie sind helikale lineare Aggregate (“Polymere”) globulärer Untereinheiten.
- sie weisen eine strukturelle Polarität auf, wodurch die Enden der Filamente unterscheidbar sind.
- für beide Filamente gibt es zahlreiche assoziierte oder bindende Proteine, die ihre Eigenschaften modulieren und u.a. ihre Längen begrenzen.
- beide Filamente können mit Membranen über besondere Proteine in Wechselwirkung treten.

Für das Zytoskelett eukaryontischer Zellen wurden eine Vielzahl an Funktionen beschrieben, wobei die mit dem Zytoskelett verbundenen Proteine meist die Rolle regulierender Faktoren einnehmen. Das Zytoskelett kann von vielen Faktoren modifiziert werden, zu denen auch Hormone, Wachstumsfaktoren, „second messenger“, aktinbindende Proteine und Stoffwechselprodukte gehören (Alberts et al., 1989).

1.4.2. Die Proteinsynthese in eukaryontischen Zellen

Im Zellkern wird die genetische Information der doppelsträngigen DNA auf die einzelsträngige „messenger RNA“ (mRNA) übertragen (Transkription).

Im Zytoplasma der eukaryontischen Zelle findet anschließend die Translation der mRNA, die Proteinsynthese statt.

Bislang wurden drei Hauptorte der Proteinsynthese beschrieben:

- 1) freie Polysomen
- 2) an das endoplasmatische Retikulum gebundene Polysomen =
membrangebundene Polysomen
- 3) mit dem Zytoskelett assoziierte Polysomen (Vedeler et al., 1991a).

1.4.2.1. Freie Polysomen

Den sogenannten freien Polysomen wurde viele Jahre lang die Hauptrolle in der Synthese der meisten zellulären Proteine zugesprochen. In den letzten Jahren ergaben sich aber Hinweise dafür, dass eine Reihe von mRNAs mit Informationen für zelluläre Proteine sich in denjenigen Polysomen befinden, welche mit dem Zytoskelett assoziiert sind (Vedeler et al., 1991). Es wird kontrovers diskutiert, ob es „freie“ Ribosomen überhaupt gibt, oder ob diese nicht mit dem Zytoskelett über feine Trabekulae in Verbindung stehen (Wolosewick & Porter, 1979). Dem widerspricht jedoch, dass sich ein Teil der Polysomen schon durch eine sehr milde Behandlung der Zellen mit lysierenden Stoffen lösen lässt, was gegen einen engen Verbund mit dem Zytoskelett spricht (Vedeler et al., 1991b).

1.4.2.2. Membrangebundene Polysomen

Das endoplasmatische Retikulum (ER) ist ein Netzwerk aus miteinander verbundenen Membranvesikeln. Es hat eine Vielzahl an Funktionen und ist insbesondere bedeutsam für die Synthese vieler Membranlipide und Membranproteine. Die Anwesenheit membrangebundener Ribosomen unterscheidet das rauhe vom glatten endoplasmatischen Retikulum. Das rauhe endoplasmatische Retikulum kann in Unterfraktionen unterteilt werden, welche sich durch die Art ihrer Polysomen unterscheiden (Svardal et al., 1981).

Eingeteilt wird das raue ER in „light rough“ (LR), „heavy rough“ (HR) und “nuclear-associated” (NER) endoplasmic reticulum (Svardal & Pryme, 1978).

Zwischen dem endoplasmatischen Retikulum und den Mikrofilamenten wurde eine Vielzahl von Interaktionen beschrieben. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass sich HR in LR umwandeln lässt, wenn die Zellen mit Cytochalasin B, einer Substanz die die Mikrofilamentordnung zerstört, behandelt werden (Fjose & Pryme, 1984).

1.4.2.3. Zytoskelett-assoziierte Polysomen

Erste Hinweise auf eine Verbindung von Zytoskelett und Ribosomen ergaben sich bei morphologischen Untersuchungen mit Hochvolt-Elektronenmikroskopen, bei denen Ribosomen in unmittelbarer Nähe des Zytoskeletts dargestellt werden konnten. Andere Ribosomen konnten in Regionen nachgewiesen werden, an denen sich Filamente kreuzten oder trafen. Dort waren die Ribosomen in regelrechten “Taschen” lokalisiert (Wolosewick & Porter, 1979).

Die Behandlung von kultivierten Zellen mit nicht-ionischen Detergentien bewirkt, dass das Zytoskelett als unlösliche Matrix (Zellmatrix) vorliegt (Osborn & Weber, 1976). Diese Zellmatrix enthält Ribosomen (Lenk et al., 1977). Genauere Untersuchungen hinsichtlich des Zusammenhangs von Zytoskelett und mRNA ermöglichte die Etablierung einer Kombination aus *in situ* Hybridisierung und Elektronenmikroskopie. Mit dieser Technik konnte bewiesen werden, dass bestimmte mRNAs, zB. diejenigen, welche für Aktin, Tubulin und Vimentin kodieren, sich in der Zellmatrix befinden (Singer et al., 1989). Besondere Bedeutung wird hierbei den Mikrotubuli für die räumliche Anordnung und den Mikrofilamenten für die Verankerung der mRNA zugesprochen (Yisraeli, 1990).

Insbesondere Aktin scheint einen unmittelbaren Einfluß auf die Translationsrate von mRNA zu haben. Behandelt man HeLa-Zellen mit Cytochalasin D, welches die Aktinordnung zerstört und mRNA vom Zytoskelett ablöst, lässt sich eine Inhibierung der Proteinsynthese feststellen, die direkt proportional zur Ablösung der mRNA vom Zytoskelett ist (Ornelles et al., 1986).

Vergleichbare Ergebnisse wurden auch an murinen Mammazellen in Zusammenhang mit deren α -Casein-, α -Lactalbumin- und Transferrin-Synthese erhoben. Hierbei wurde das Aktinskelett durch Chemikalien spezifisch zerstört, die mRNA vom

Zytoskelett abgelöst und der Einfluß auf die Proteinsynthese mittels Elektrophorese dargestellt. Die Synthese der Milchproteine wurde durch die Zerstörung der Aktinordnung um 40% inhibiert, wobei die Translationsfähigkeit der vom Zytoskelett abgelösten mRNA erhalten blieb (Seely & Aggeler, 1991).

1.5. Viren und das Zytoskelett der Zielzelle

Viren benötigen für ihre Replikation eine permissive Zielzelle, die letztendlich zur Produktion der neuen Viruspartikel benutzt wird (siehe 1.3).

Viren sind in der Lage, das Zytoskelett für verschiedene Schritte ihres Replikationszyklus zu nutzen. So lässt sich beispielsweise die Aufnahme des murinen ekotropen Leukämie Virus stark inhibieren, wenn vor der Infektion das Aktingerüst zerstört wird. Eine Zerstörung des Aktinskeletts kurz nach Infektion zeigt hingegen keinen deutlichen Effekt auf die Replikationsrate. Diese Befunde sprechen dafür, dass Aktin eine bedeutende Rolle bei der Aufnahme des murinen ekotropen Leukämie Virus in die Zielzelle spielt (Kizhatil & Albritton, 1997).

Das Zytoskelett wird während der Infektion mit verschiedensten Viren in seiner Struktur verändert. Bei der Infektion mit Herpes Simplex Virus werden die Mikrotubuli in zwei Schritten verändert. Zuerst bündeln sich die Mikrotubuli und legen sich wie ein Ring um den Zellkern, um in einer späteren Phase der Infektion amorphe, dichte Ringe zu bilden. Das Herpes Simplex Virus induziert hingegen keine Fragmentation der Mikrofilamente (Avitable et al., 1995). Während der Infektion mit Polioviren kommt es ebenfalls zu grundlegenden Veränderungen des Zytoskeletts in HeLa-Zellen. Diese Strukturveränderungen sind nicht allein auf den zytopathischen Effekt von Poliovirus zurückzuführen, sondern es gibt Hinweise dafür, dass das Zytoskelett während der Infektion modifiziert wird und ein grundlegendes zelluläres Kompartiment der viralen Replikation darstellt (Lenk & Penman, 1979). Die Assoziation von Poliovirus-RNA mit dem Zytoskelett im Rahmen der Virusreplikation wurde durch Bonneau et al. bestätigt (Bonneau et al., 1985).

Eine Assoziation viraler Nukleinsäure mit dem Zytoskelett im Rahmen des Infektionszyklus wurde auch für andere Viren nachgewiesen, wie z.B. für das Vesikuläre Stomatitis Virus (Rigaut et al., 1991) sowie für Reoviren (Mora et al., 1987). Auch bei Adenoviren ist bekannt, dass 70% der im Zytoplasma vorliegenden

adenoviralen mRNA an das Zytoskelett gebunden ist und nur 30% als freie mRNA vorliegt (Mariman et al., 1982).

Interessanterweise scheint das Zytoskelett nicht nur für die Aufnahme in die Wirtszelle, sondern auch für die Virusausschleusung eine entscheidende Bedeutung zu haben. So lässt sich die Ausschleusung des Humanen Immundefizienz Virus (HIV) durch eine Blockierung der Myosin-Leichtketten-Kinase entscheidend senken. Eine Zerstörung des Aktingerüsts senkt ebenfalls die Ausschleusung von HIV, wenn auch in geringerem Umfang (Sasaki et al., 1995). Von HIV ist auch bekannt, dass das Zytoskelett eine große Bedeutung bei der Zell-zu-Zell-Transmission hat (Pearce-Pratt et al., 1994).

Bislang ist unklar, ob ein Zusammenhang zwischen der Replikation von CVB3 und dem Zytoskelett seiner Zielzelle besteht. Auch weiß man bislang nichts über die spezifischen morphologischen Veränderungen der einzelnen Zytoskelettkompartimente einer CVB3-infizierten Zelle.

1.6. Einflüsse von Calcium auf das Zytoskelett infizierter Zellen

Der Einstrom von Calciumionen in die Zelle im Rahmen von Infektionen kann zum zytopathischen Effekt beitragen. Das Toxin B des Bakteriums *Clostridium difficile* induziert den Einstrom von Calciumionen in die Zelle, was wiederum die Zerstörung des Aktingerüsts der infizierten Zelle einleitet (Gilbert et al., 1995). Auch bei viralen Infektionen wurde ein derartiger Zusammenhang zwischen zytopathischen Effekten und Calcium beschrieben. So bleibt der zytopathische Effekt bei einer Rotavirusinfektion aus, wenn unter calciumfreien Bedingungen infiziert wird (Michelangeli et al., 1991).

Bei der Infektion mit Poliovirus kann ein Anstieg der Calciumkonzentration im Zytoplasma der infizierten Wirtszelle ab der zweiten bis dritten Stunde post infectionem (pi) beobachtet werden, der bis auf das 10fache des Ausgangswertes vier Stunden pi ansteigt. Die virale Translation findet sechs Stunden pi somit unter drastisch veränderten Calciumbedingungen statt. Blockiert man die virale RNA-Synthese, so bleibt der Calciumanstieg aus (Irruzun et al., 1995). Blockiert man die L-Ionen-Kanäle für Calcium der Wirtszelle mit Verapamil, einem in der Kardiologie gebräuchlichen Calciumkanalblocker, so lässt sich die Replikation einiger Viren

eindeutig inhibieren, hierzu zählen das Cytomegalievirus (CMV) (Albrecht et al., 1987), das Influenzavirus Typ A (Nugent KM & Shanley JD, 1984), das Masernvirus und das Vacciniavirus (Shainkin-Kestenbaum et al., 1993).

Auch bei der Infektion mit CVB3 wurde ein verstärkter Calciumeinstrom ins Zytoplasma im Rahmen der Virusreplikation gemessen. Der Calciumgehalt der infizierten Zelle steigt nach ca. zwei Stunden pi an und zeigt die höchste Calciumkonzentration zwischen sechs und vierzehn Stunden pi. Dabei zeigen diejenigen Zellen mit den höchsten Calciumkonzentrationen die deutlichsten zytopathischen Effekte. Das virale Protein 2B gilt bei CVB3 als Promotor für den Calciumeinstrom im Rahmen der Infektion und es wird angenommen, dass der Einstrom von Calcium über eine Veränderung der Membranpermeabilität auch die Ausschleusung der neu gebildeten viralen Partikel begünstigt (van Kuppeveld et al., 1997).

1.7. Virusreplikation und Golgiapparat

Der Golgiapparat, welcher in der Zelle zwischen dem endoplasmatischen Retikulum und der Plasmamembran positioniert ist, besteht aus plattenartigen Zisternen (Dictyosomen). Der Golgiapparat ist stark polarisiert, die cis-Seite steht mit dem endoplasmatischen Retikulum in Verbindung, während die trans-Seite zur Plasmamembran hin gerichtet ist. Im endoplasmatischen Retikulum modifizierte Proteine treten auf der cis-Seite in den Golgiapparat ein und werden auf ihrem Weg zur trans-Seite weiter modifiziert und dann freigesetzt (Alberts et al., 1989). Bei der Infektion von Vero-Zellen mit Poliovirus kommt es zu einem vollständigen Zusammenbruch des Golgiapparates der Zielzelle (Sandoval et al., 1997). Wird der Transport viraler Proteine zwischen Golgiapparat und endoplasmatischem Retikulum durch die Substanz Brefeldin A inhibiert, so lässt sich bei Poliovirus die Synthese viraler Partikel inhibieren (Doedens et al., 1994).

1.8. Ziel der Arbeit

Enteroviren, vor allem Coxsackieviren der Gruppe B, können bei bestimmten Patienten nicht nur akute, sondern auch chronische Herzmuskelerkrankungen auslösen, welche letztlich zum Krankheitsbild der dilatativen Kardiomyopathie führen. Bislang ist unklar, über welche Mechanismen eine Schädigung der infizierten kardialen Zellen induziert wird. Insbesondere ist über die Interaktion von Coxsackieviren mit dem Zytoskelett der permissiven Zielzellen bislang nur wenig bekannt.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, einen Beitrag zum Verständnis der Virus-Wirt-Interaktion unter besonderer Berücksichtigung des Zytoskeletts und seiner Schädigung im Rahmen der CVB3-Infektion zu leisten. Hierbei sollen die Auswirkungen der CVB3-Replikation auf die spezifischen Kompartimente des Zytoskeletts untersucht werden. Der Zeitpunkt, das Muster sowie die Spezifität der beobachteten Schädigungen werden hierzu mittels Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht. Die Untersuchungen werden primär an CVB3-infizierten HeLa-Zellen durchgeführt, da sie in der Literatur bereits als Modellsystem gut etabliert sind. Die Ergebnisse sollen dann auf das *in vivo* Mausmodell der CVB3-Myokarditis übertragen werden.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung zur Bedeutung einzelner Zytoskelettbestandteile für die virale Replikation. Hierbei soll die Replikationsrate von CVB3 ermittelt werden, nachdem einzelne Zytoskelettanteile durch verschiedene Substanzen spezifisch zerstört wurden. Ferner soll die Frage geklärt werden, ob CVB3 den Weg der zytoskelettabhängigen Proteinsynthese nutzt.

Weiterhin soll überprüft werden, inwieweit der Calciumeinstrom in die Zelle für den zytopathischen Effekt von CVB3 entscheidend ist und ob durch die Blockierung der Calciumkanäle eine Senkung der viralen Replikationsrate erreicht werden kann.

Ein weiterer Aspekt der Arbeit stellt die Untersuchung der Rolle des Golgi-Apparates bei der Replikation von CVB3 dar. Durch eine gezielte chemische Inhibierung des Golgiapparates soll überprüft werden, ob CVB3 den Golgikomplex der Zielzelle im Rahmen seiner Infektion benutzt.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien

Agarose Seakem	Biozym
Agarose Seaplaque	Biozym
3-Aminopropyltriethoxysilan	Sigma
Ammoniumacetat	Merck
Bacto-Trypton	Difco
Bovines Serumalbumin	Merck
Bovines Serumalbumin, RNase-und DNase frei	Pharmacia
Bromphenolblau	Sigma
Dextransulfat	Sigma
Diethylpyrocarbonat	Sigma
Dithiotreitol	Sigma
Ethanol (EtOH)	Merck
Eosin G	Sigma
Ethidiumbromid	Sigma
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck
Entellan	Merck
Extran MA 01	Merck
Faramount	Dako
Ficoll	Sigma
Formamid	Merck
Hämatoxylin	Shandon
Hefeextrakt	Serva
Kristallviolett	Merck
Maxi-Präp Isolationskit	Qiagen
mRNA Isolationskit	Dynal
Natriumdodecylsulfat	Sigma
Neu Fuchsin-Substratsystem	Dako

OCT compound	TissueTek
Orange-G	Sigma
Paraformaldehyd	Merck
PermaFluor	Immunotech
Polyvinylpyrrolidon	Sigma
Saponin	Sigma
Sephadex G 50 Säulen	Roche
Silikonlösung	Serva
StreptAB/AP-Komplex	Dako
Xylencyanol FF	Sigma

Alle weiteren Chemikalien wurden von Merck bezogen.

2.1.2. Zellkulturmedien und Zusätze

DMEM (suppl. mit Glucose, Glutamin und NaHCO ₃)	Gibco
Foetales Rinderserum	Gibco
Hepes	Gibco
Penicillin-Streptomycin	Gibco
Quadripermschalen	Heraeus

2.1.3. Enzyme

DNase I, RNase frei	Roche
Proteinase K	Merck
Restriktionsenzyme	Roche
RNAguard	Pharmacia
SP6-und T7-RNA-Polymerasen	Roche
RNase A, DNase-frei	Roche

2.1.4. Nukleotide und Nucleinsäuren

Desoxyribonukleotide	Perkin-Elmer
Ribonukleotide	Pharmacia
³⁵ S-UTP	NEN-Dupont
Rabbit Liver t-RNA	Sigma
Salmon Sperm DNA	Pharmacia
Low range RNA-Marker	peqlab
φx / HaeIII	MBI Fermentas
λ/ Eco RI - HindIII	MBI Fermentas

2.1.5. Plasmide

pCVB3-R1	C. Hohenadl, MPI für Biochemie, Martinsried
pSPT 18-Neo	Roche

2.1.6. Bakterienstämme

Escherichia coli DH5α	Stratagene
-----------------------	------------

2.1.7. Antikörper

Anti-Zytokeratin (Klon KL1)	Immunotech
Anti-Vimentin (Klon 3B ₄)	Amersham
Anti-α-Tubulin	Amersham
Anti-CVB3 VP1 vom Kaninchen	K. Klingel, Tübingen
Anti-CVB3 VP423 vom Kaninchen	K. Klingel, Tübingen
Anti CVB3-Polymerase vom Kaninchen	K. Klingel, Tübingen
Cy3-konjugierter anti-Maus IgG-Antikörper aus der Ziege	Amersham
Biotinylierter anti-Kaninchen-Antikörper	Amersham

Cy2-konjugiertes Streptavidin
Rhodamin-konjugiertes Phalloidin

Amersham
Sigma

2.1.8. Sonstiges

Blotting paper	Whatman
Bottle-Top Filter	Falcon
DAKO-Pen	Dako
Deckgläschen	Langenbrinck
Entwickler D19	Kodak
Fixogum Klebstoff	Marabou
Filmemulsion NBT-2	Kodak
Fixierer	Kodak
Objektträger	Langenbrinck
Röntgenfilme	NEN Dupont

2.1.9. Viren

cDNA generiertes CVB3 (Nancy strain),
3x herzpassagiert

R. Kandolf, Tübingen

2.2. Methoden

2.2.1. Herstellung eines Virusstocks

Zur Herstellung eines Virusstocks wurden HeLa-Zellen in Kulturflaschen mit 1 plaque forming unit (pfu) CVB3 infiziert und bis zur Zellyse belassen. Anschließend wurden die Kulturen 3x bei -20°C eingefroren und aufgetaut, um eine vollständige Lyse der Zellen zu erreichen und die Viruspartikel freizusetzen. Durch Zentrifugation bei 2500 U/min in einem Sorvall® RT 6000 D Rotor wurden Zelltrümmer vom virushaltigen Überstand abgetrennt, welcher bei -20°C eingefroren wurde. Der Titer des virushaltigen Überstandes wurde im Plaque-Test (s.u.) bestimmt.

2.2.2. Zellkultur

2.2.2.1. Allgemeines zur Zellkultur

Es wurden zwei Zelllinien in dieser Arbeit verwendet: Die HeLa-Zelllinie ist eine in der Virusforschung sehr häufig verwendete Zelllinie. Es handelt sich hierbei um kultivierte humane Cervixcarcinom-Zellen. Bei Vero-Zellen, ebenfalls eine in der Wissenschaft sehr gebräuchliche Linie, handelt es sich um kultivierte Affennierenzellen. Beide Zelllinien sind CVB3-permissiv.

HeLa- sowie Vero-Zellen wurden in Dulbeccos[®] MEM (DMEM) mit 10% Fötalem Kälberserum, das mit Penicillin-Streptomycin versetzt war, gehalten und zweimal pro Woche 1:7 (HeLa) bzw. 1:5 (Vero) gesplittet. Der Brutschrank hatte eine Temperatur von 37°C, einen CO₂-Gehalt von 5% und eine relative Luftfeuchtigkeit von 90%.

2.2.2.2. Splitten der Zellen

Das Splitten der Zellen fand unter einer sterilen Werkbank statt. Zum Splitten wurden die Zellen nach dem Waschen mit 1xPBS mit einer 0,25% Trypsin / 0,01% EDTA-Lösung bei 37°C für 2 Minuten (min) von der Oberfläche der Kulturflasche abgelöst und in 10 ml 1xPBS aufgenommen. Die Zellen wurden 5 min bei 1000 U/min abzentrifugiert, der Überstand abgegossen und die Zellen je nach Verdünnung in 7-9 ml DMEM[®] aufgenommen. 1 ml dieser Suspension wurde in eine neue Kulturflasche gegeben, die 10-12 ml frisches Medium enthielt.

2.2.2.3. Anzucht der HeLa-Zellen auf Objektträgern

Zur Anzucht der HeLa-Zellen auf Objektträgern wurden sterile, silanisierte Objektträger (s.u.) verwendet, auf die 35 µl der 1:7 gesplitteten Zellen aufpipettiert wurden. Die Zellen wurden 20-30 min zum Absetzen im Brutschrank inkubiert, anschließend wurde Medium in die Quadriperm[®]-Schalen gegeben (5 ml pro Objektträger) und die Zellen über Nacht im Brutschrank inkubiert.

2.2.3. In vitro Infektion mit CVB3

2.2.3.1. CVB3-Infektion der auf Objektträgern angezüchteten Zellen

Am nächsten Morgen wurde der Zellspot mit einem DAKO®-Pen umrandet und 250µl Viruslösung mit einem Titer von 10⁷ Viren/ml aufpipettiert, was einer Infektion mit 30 pfu entspricht. Die Viruslösung wurde 1 h zur Absorption auf den Zellen belassen (Brutschrank), anschließend wurden pro Objektträger 5 ml Medium (10% FCS, kein Antibiotikum) dazugegeben und wiederum im Brutschrank inkubiert. Die Zeitangaben post infectionem (pi) beziehen sich jeweils auf den Beginn der Inkubation mit Virus.

2.2.3.2. Fixierung der Zellen

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Objektträger aus den Quadriperm®-Schalen genommen und in Küvetten 3x5 min in 1xPBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Fixierung je nach Verwendungszweck mit:

- Aceton bei -20°C für 4 min oder
- Methanol bei -20°C für 5 min oder
- 2% Paraformaldehyd in PBS bei 4°C für 15 min, anschließend kurzes Eintauchen in destilliertes Wasser.

Die fixierten Zellen wurden luftgetrocknet und bei -20°C aufbewahrt.

2.2.4. Immunhistochemische Färbungen

2.2.4.1. Antikörper, Chemikalien und Lösungen

Folgende Antikörper, Chemikalien und Lösungen fanden bei der Darstellung durch Immunfluoreszenzmikroskopie Verwendung:

1) Primärantikörper

a) monoklonale Antikörper gegen Zytoskelettstrukturen:

- anti-Zytokeratin (Klon KL1, Immunotech®)
- anti-Vimentin (Klon 3B₄, Amersham®)
- anti-α-Tubulin (Amersham®)

b) polyklonale Antikörper gegen CVB3-Hüllproteine (VP1, VP432)

- anti-CVB3 VP1 vom Kaninchen (K. Klingel, Tübingen)
- anti-CVB3 VP423 vom Kaninchen (K. Klingel, Tübingen)
- c) polyklonale Antikörper gegen CVB3-Polymerase
- anti-CVB3-Polymerase vom Kaninchen (K. Klingel, Tübingen)

2) Sekundärantikörper:

- a) Cy3-konjugierter anti-Maus IgG-Antikörper aus der Ziege (Amersham[®])
- b) biotinylierter anti-Kaninchen-Antikörper (Amersham[®])

3) Cy2-konjugiertes Streptavidin (Amersham[®])

zur Detektion der biotinylierten Antikörper (CVB3 Proteindarstellung)

4) Rhodamin-konjugiertes Phalloidin (Sigma[®])

zur F-Aktin-Darstellung, Fixierung der Zellen mit Aceton

5) Saponin (Sigma[®])

zur Permeabilisierung der Zellen

6) TBS (Tris-buffered Saline) Puffer

50 mM Tris/HCl, pH 7,6
150 mM NaCl

2.2.4.2. Protokoll zur immunhistochemischen Darstellung von zellulären und viralen Proteinen

a) Die Färbung zum Nachweis der Zytoskelettproteine Keratin, Vimentin und α -Tubulin sowie viraler Hüllproteine im Doppelmarkierungsverfahren wurde folgendermaßen durchgeführt:

1. Nach dem Auftauen der Zellen 5 minütige Rehydratation mit TBS
 2. Vorinkubation (20 min) in TBS mit 2% bovinem Serumalbumin, 0,1% Saponin und 3% normalem Ziegen Serum
 3. Verdünnung und zeitgleiche Inkubation der Primärantikörper in TBS mit 2% bovinem Serumalbumin und 0,1% Saponin
 - anti-Zytokeratin 1:300 (Fixierung Aceton, Inkubationszeit 1h) oder
 - anti-Vimentin 1:200 (Fixierung Aceton, Inkubationszeit 1h) oder
 - anti- α -Tubulin 1:200 (Fixierung Methanol, Inkubationszeit 1h)
- sowie
- anti-CVB3-VP1 oder anti-CVB3-VP423 (jeweils 1:400, Fixierung Aceton oder Methanol, Inkubationszeit 1h)

4. 3x waschen jeweils 5 min in TBS mit 0,1% Saponin
5. Verdünnung der Sekundärantikörper (Cy3-konjugierter anti-Maus IgG Antikörper aus der Ziege, 1:400 zur Darstellung der Zytoskelettproteine; biotinylierter anti-Kaninchen-Antikörper, 1:200 zur Darstellung viraler Hüllproteine) in TBS und 2% bovinem Serumalbumin und 0,1% Saponin
6. Inkubation der Sekundärantikörper, Inkubationszeit 1h.
7. 3x waschen jeweils 5 min in TBS mit 0,1% Saponin
8. Biotin-Detektion mit Cy2-konjugiertem Streptavidin 1:100 verdünnt in TBS mit 2% BSA und 0,1% Saponin, Inkubationszeit 30 min
9. 2x waschen jeweils 5 min in TBS mit 0,1% Saponin
10. Einbetten der Zellen mit PermaFluor®

b) Protokoll der Darstellung des F-Aktingerüsts mit Rhodamin-Phalloidin:

1. Nach dem Auftauen der Zellen 5 minütige Rehydratation mit TBS.
2. Vorinkubation (20 min) in TBS mit 2% bovinem Serumalbumin, 0,1% Saponin und 3% normalem Ziegenserum
3. Verdünnung und Inkubation des Rhodamin-Phalloidin in TBS mit 2% bovinem Serumalbumin und 0,1% Saponin 1:1200 (Fixierung in Aceton, 20 min)
4. 2 x waschen jeweils 5 min in TBS mit 0,1% Saponin
5. Einbetten der Zellen mit PermaFluor®

Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Primär- und Sekundärantikörper

	Primärantikörper	Sekundärantikörper	Tertiärmarkierung
Keratin	Anti-Zytokeratin	Cy3-Anti-Maus-IgG	
Vimentin	Anti-Vimentin	Cy3-Anti-Maus-IgG	
α-Tubulin	Anti-α-Tubulin	Cy3-Anti-Maus-IgG	
F-Aktin	Rhodamin-Phalloidin		
CVB3-Proteine	Anti-CVB3-VP1/VP423 bzw. anti-CVB3-Polymerase	Biotinyliertes anti-Kaninchen-IgG	Cy2-konjugiertes Streptavidin

2.2.5. Ein-Schritt-Wachstumskurven

2.2.5.1. Anzucht, Infektion und Virusgewinnung

Zur Erstellung der Ein-Schritt-Wachstumskurven wurden HeLa-Zellen in 24-well Kulturschalen über Nacht angezüchtet. Nach Abnahme des Mediums und einmaligem Waschen mit PBS wurden 50 µl der Viruslösung (20 pfu) auf die Zellen gegeben und 1 h zur Absorption bei Raumtemperatur unter sanftem Schwenken auf dem Zellrasen belassen. Anschließend wurde die Viruslösung abgenommen, 1x mit PBS gewaschen, 300 µl Medium dazugegeben und im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

2.2.5.2. Virustiterbestimmung aus Überstand

Nach definierten Zeitpunkten wurde Medium abgenommen und durch kurzes Zentrifugieren von Zelltrümmern befreit. Aus diesem Medium wurde mittels Plaque-Test (s.u.) die Virusfreisetzung bestimmt.

2.2.5.3. Intrazellulärer Virusgehalt

Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen, von der Kulturschale abgeschabt und anschließend in 200 µl PBS aufgenommen. Nach Abzentrifugieren der Zellen wurde das PBS abpipettiert und die Zellen in Medium resuspendiert. Um das intrazelluläre Virus freizusetzen wurden die Suspension dreimal bei -20°C gefroren und aufgetaut, die Zelltrümmer abzentrifugiert und der intrazelluläre Virusgehalt aus dem Überstand durch Plaque-Test (s.u.) bestimmt.

2.2.5.4. Bestimmung des Virustiters im Plaque-Test

Mit dem Plaque-Test (Kandolf et al., 1985) läßt sich der Virustiter in einer Lösung bestimmen. Hierzu wurden Vero-Zellen in 6er Kulturschalen ausgesät und bei 80-90% Konfluenz für den Plaque-Test verwendet. Die Viruslösung wurde in 1x DMEM® in den Verdünnungsstufen 10^{-1} bis 10^{-8} verdünnt.

Die Zellen wurden mit 1x PBS gewaschen und die Zellrasen mit je 200 µl einer

Verdünnungsstufe der zu titrierenden Viruslösung überschichtet. Nach 45 min Inkubationszeit unter sanftem Schwenken wurden die Zellrasen mit 2 ml Plaque-Assay-Medium DMEM[®]/1% low melting Sea-Plaque-Agarose überschichtet.

Plaque-Test-Medium

Mischung 1:1 aus

2x DMEM [®] 37°C	und	2% Sea-Plaque-Agarose [®] (low melting)
10% FCS		30 mM MgCl ₂
		autoklaviert und auf 55°C vorgewärmt

Nach 48h Inkubation im Brutschrank bei 37°C wurden die Zellen durch Zugabe von 2ml eiskalter 5% Trichloressigsäure für 1h bei 4°C fixiert.

Nach dem Fixieren wurde die Agaroseschicht mit Wasser ausgespült und die Zellen mit Kristallviolett gefärbt. Da Kristallviolett nur lebende Zellen anfärbt, sind die Bereiche mit den durch die Virusinfektion abgetöteten Zellen als klare Plaques auf dem violetten Zellrasen zu erkennen (siehe Abb. 3). Jeder Plaque ist auf ein infektiöses Partikel zurückzuführen und die Konzentration der Viruslösung kann nun durch Multiplikation der Plaqueanzahl mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor errechnet werden. Da man nur 200 µl der Virusverdünnung auf die Zellrasen pipettiert hatte, muß das Ergebnis noch mit dem Faktor 5 multipliziert werden, um die Einheit pfu/ml zu erhalten (pfu = plaque forming unit).

Kristallviolettlösung

1. 5 g Kristallviolett werden in 100 ml Formalin und 200 ml Ethanol gelöst
 2. Dazugegeben werden 700 ml dH₂O
35 ml 2M Tris-Base
10 g CaCl₂
 3. Die Lösung wird mit dH₂O auf 2000 ml aufgefüllt.
-

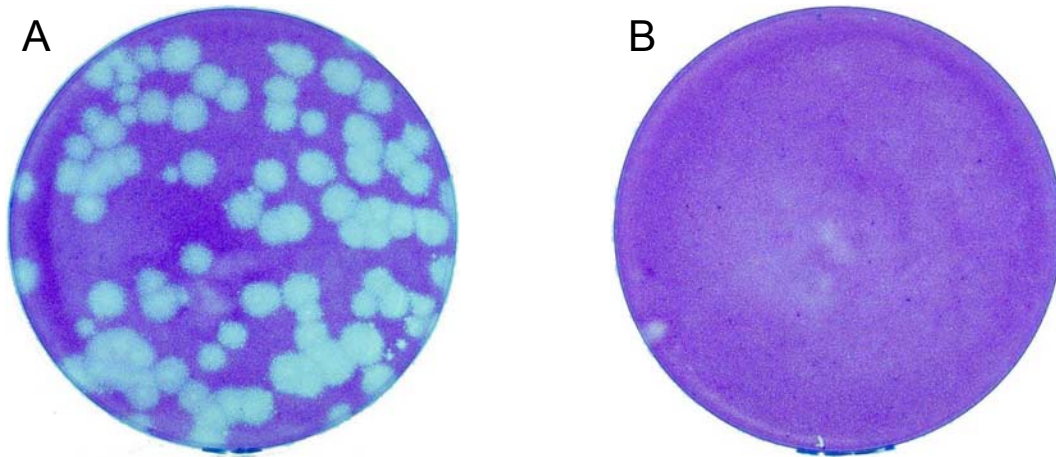


Abb. 3: Plaque-Test: Dargestellt ist die Plaquemorphologie der cDNA-generierten, 3xherzpassagierten CVB3-Variante auf Vero-Zellen (A), Negativkontrolle (B).

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

2.2.6.1. Vorbehandlung der Objektträger

Glasobjektträger wurden 24 h in 10% wässriger Extran[®] MA 01-Lösung belassen und anschließend mit destilliertem Wasser gespült bis keine Schaumbildung mehr erfolgte. Danach wurden die Objektträger einmal in bidestilliertes, autoklaviertes Wasser getaucht und 8 h bei einer Temperatur von 180°C gebacken. Nach dem vollständigen Abkühlen wurden die Objektträger für 10 Sekunden (sec) in 2%ige, wässrige 3-Aminopropyltriethoxysilanlösung getaucht. Das überschüssige Silan wurde anschließend durch zweimaliges Waschen mit Aceton entfernt, daran schloss sich ein letztes Spülen mit bidestilliertem, autoklaviertem Wasser an. Die silanisierten Objektträger wurden bei 40°C getrocknet und anschließend staubfrei aufbewahrt.

2.2.6.2. Vorbehandlung der Deckgläschen

Nach 30minütigem Waschen in 2%iger Essigsäure wurden die Deckgläschen mit bidestilliertem, autoklaviertem Wasser gespült, kurz in 100%igem Ethanol geschwenkt und dann auf einem Filterpapier ausgelegt. Nach dem Trocknen folgte das Eintauchen in eine Silikonlösung und das Auslegen in einer großen, mit gebackener Alufolie ausgelegten Glasschale. In dieser wurde das Silikon bei 100°C

1h lang eingebrannt. Die Deckgläschen wurden trocken und staubfrei aufbewahrt.

2.2.6.3. Herstellung der CVB3-RNA-Hybridierungs-sonde

Zum Nachweis viraler Plusstrang-RNA von CVB3 mittels *in situ* Hybridisierung wurde eine strangspezifische CVB3-RNA-Sonde verwendet. Hergestellt wurde diese durch *in vitro* Transkription mit SP6 RNA Polymerase des mit SmaI linearisierten Plasmides pCVB 3-R1, welches 7128 Nukleotide des CVB3 Genomes enthält, was 98% des Gesamtgenomes entspricht (Hohenadl et al., 1991). Zum Nachweis unspezifischer Bindungen wurde als Kontrollsonde das mit SmaI linearisierte Plasmid pSPT 18-Neo, dessen 760 bp umfassendes Insert für die Neomycin-Resistenz kodiert, mit SP6 RNA-Polymerase transkribiert. Hierdurch erhält man 760 Nukleotide umfassende Minusstrang-Transkripte des Neomycin-Resistenzgens, welche, als Kontrollsonde eingesetzt, keine spezifischen Bindungen eingehen.

2.2.6.4. Radioaktive Markierung der RNA-Sonden

Um radioaktiv markierte CVB3-Minusstrang-Transkripte zum Nachweis von CVB3-Plusstrang-RNA zu erhalten, wurden für die Transkription jeweils 250 μCi ^{35}S -UTP mit einer Aktivität von 1300 Ci/mmol in einer Vakuumzentrifuge eingedampft. Das Pellet wurde in 10 μl Transkriptionslösung aufgenommen. Nach Zugabe von 1 μg linearisierter Plasmid DNA und 20 Einheiten SP6 RNA-Polymerase wurde alles gemischt und der Ansatz bei 37°C 90 min inkubiert.

Transkriptionsansatz (Endkonzentrationen)

40 mM Tris-HCl, pH 8,0

10 mM DTT

6 mM MgCl_2

2 mM Spermidin

100 mg/ml BSA (RNase- und DNase-frei)

500 μM ATP

500 μM CTP

500 μM GTP

25 μM ^{35}S -UTP

1 U RNAGuard

Nach Inkubation wurde der Ansatz mit Diethylpyrocarbonat behandeltem, bidestilliertem Wasser (depc-Wasser) auf 50 μl aufgefüllt und die Plasmid-DNA mit 20 Einheiten DNase I bei 37°C 20 Min verdaut. Anschließend wurden die nicht eingebauten Nukleotide durch Sephadex[®] G50 Säulenzentrifugation abgetrennt und eine Phenolextraktion durchgeführt, um Proteinverunreinigungen zu entfernen (s.u.). Nach Fällung der RNA mit 1/10 Volumen 8mM LiCl und 3 Volumen absolutem Ethanol folgte eine alkalische Hydrolyse der RNA (s.u.). Anschließend wurde die RNA in depc-Wasser gelöst, dem 10mM DTT als Oxidationsschutz zugegeben wurde. Die Aktivität der Proben wurde in einem Szintillationszähler (Packard Tri-Carb 1600 TR[®]) bestimmt. Die Länge der RNA-Fragmente wurde durch Agarosegelelektrophorese und anschließender Autoradiographie bestimmt.

2.2.6.5. Sephadex[®] G50 Säulenzentrifugation

Nicht eingebaute Nukleotide können aus einem *in vitro* Transkriptionsansatz mit Hilfe von „Sephadex[®] G50 Quick spin columns[®]“ von Boehringer entfernt werden. Die Säulen wurden unten und oben geöffnet, so dass der Puffer, in dem das Sephadex[®] aufgenommen ist, ablaufen kann. Es folgte eine zweiminütige Zentrifugation mit 3200 rpm in einem Sorvall[®] H1000B-Rotor. Anschließend wurden die Proben auf die Säule aufgetragen und 4 min bei 3200 rpm zentrifugiert. Das Eluat wurde phenolisiert, die Säule mit den nicht eingebauten Nukleotiden verworfen.

2.2.6.6. Limitierte alkalische Hydrolyse der radioaktiv markierten RNA

RNA kann durch Inkubation in alkalischen Lösungen partiell hydrolysiert werden. Hierzu erfolgte eine Inkubation in 40 mM NaHCO₃ (pH 10,2) bei 60°C. Dadurch wurde die in nahezu voller Länge transkribierte CVB3-antisense-RNA (7128 bp) in 100-500 Nukleotide umfassende Fragmente zerlegt. Nach einer Inkubationszeit von 20 Min wurde der Ansatz durch Zugabe von 1/10 Volumen 3M Natriumacetat pH 4,9 neutralisiert und mit 3 Volumen absolutem Ethanol gefällt. Nach zweimaligem Waschen des RNA-Pellets mit 70%igem Ethanol und dem Trocknen in einer

Vakuumentrifuge wurde die RNA in 50µl depc-Wasser mit 10mM DTT als Oxidationsschutz aufgenommen.

2.2.6.7. RNA-RNA *in situ* Hybridisierung

Die *in situ* Hybridisierung ermöglicht es, virale RNA in einem Gewebeschnitt oder einer kultivierten Zelle zu markieren und somit nicht nur nachzuweisen, sondern auch zu lokalisieren. Die Hybridisierung muß unter RNase-freien Bedingungen stattfinden. Alle Lösungen, die bei der *in situ* Hybridisierung verwendet wurden, waren deshalb mit RNase-freien Chemikalien unter Verwendung von bidestilliertem, autoklaviertem Wasser hergestellt worden. Ebenso wurden sämtliche Gläser zuvor bei 180°C 8h lang gebacken. Bei allen Vorbereitungsarbeiten wie auch während der Hybridisierung mussten puderfreie Handschuhe getragen werden, um eine Kontamination mit RNAsen zu verhindern.

Puffer und Lösungen:

20 x SSC: 3 M NaCl
 0,35 M tri-Natriumcitrat

Puffer für den

Proteinase K Verdau: 20 mM Tris-HCl, pH 7,4
 2 mM CaCl₂

Puffer für den

RNase A Verdau: 0,5 M NaCl
 10 mM Tris-HCl, pH 8,0

2.2.6.8. Permeabilisierung der Zellen

Die Zellen wurden einer enzymatischen und chemischen Denaturierung unterzogen. Damit sollte der Eintritt der radioaktiv markierten RNA-Sonden ins Gewebe erleichtert werden.

Zur Permeabilisierung werden die Zellen folgendermaßen behandelt:

20 sec bidestilliertes, autoklaviertes Wasser

20 min 0,2 N Salzsäure

20 sec bidestilliertes autoklaviertes Wasser

30 min 2 x SSC bei 70°C

20 sec bidestilliertes, autoklaviertes Wasser

15 min Puffer für den Proteinase K Verdau mit 1µg Proteinase K/ml bei 37°C

2 x 20 sec bidestilliertes autoklaviertes Wasser

2 x 3 min 70% Ethanol

5 min 100% Ethanol

Nach dieser Behandlung wurden die Zellen bei 37°C ca. 30 min getrocknet.

2.2.6.9. Hybridisierung der Zellen

Die permeabilisierten Zellen wurden nach dem Trocknen mit 14 µl Hybridisierungslösung überschichtet und anschließend mit einem Deckgläschen abgedeckt. Die Deckgläschen wurden mit Fixogum[®] abgedichtet und bei 42°C 18 h im Dunkeln inkubiert.

Hybridisierungslösung

3 x 10⁵ cpm/Zellspot in vitro transkribierte, hydrolysierte CVB3-³⁵S-RNA-Sonde

oder

3 x 10⁵ cpm/Zellspot in vitro transkribierte ³⁵S -Kontroll-RNA

50% deionisiertes Formamid

10 mM Tris-HCl, pH 7,4

1 mM EDTA, pH 7,2

200 µg sonifizierte Salmon Sperm DNA/ml

100 µg t-RNA (Kaninchenleber)/ml

Es erfolgte eine gründliche Mischung der Bestandteile, anschließend wurde das Gemisch 5 Min auf 100°C erhitzt und sofort für 10 min auf Eis gestellt. Hiernach wurden folgende Bestandteile zugegeben und erneut gründlich gemischt:

600 mM NaCl

10% Dextransulfat

0,05% bovinen Serumalbumin, RNase- und DNasefrei

0,02% Ficoll

0,02% Polyvinylpyrrolidon

0,02% Dithiotreitol

0,1% Natriumdodecylsulfat

2.2.6.10. Posthybridisierung

Nach der 18stündigen Inkubationszeit wurden die Deckgläschen durch Abziehen des Fixogums® vorsichtig abgelöst. Die Reste der Hybridisierungslösung wurden durch folgende Waschschriffe von den Zellen entfernt:

2 x 10 Min SSC

30 Min 2 x SSC/50% Formamid bei 42°C

30 Min RNase Verdau Puffer mit 20 µg/ml RNase A bei 37°C

30 Min RNase Verdau Puffer ohne RNase A bei 37°C

30 Min 2 x SSC/50% Formamid bei 50°C

60 Min 2 x SSC bei 55°C

3 Min 70% Ethanol/300mM Ammoniumacetat

3 Min 90% Ethanol/300mM Ammoniumacetat

Nach diesen Waschschriffen wurden die Zellen erneut bei 37°C getrocknet.

2.2.6.11. Autoradiographie

Mittels Autoradiographie erfolgte der Nachweis der ³⁵S-markierten Hybride bestehend aus viraler RNA und RNA-Sonde. Da diese Arbeiten mit Filmemulsion durchgeführt werden, mussten sie in der Dunkelkammer erfolgen.

Die Filmemulsion wurde vor Gebrauch in einem Wasserbad bei 43°C verflüssigt, dann mit Ammoniumacetat (300mM) in einem Verhältnis von 3:1 gemischt und durch einen Gazestreifen filtriert. Die Objektträger wurden durch Eintauchen in die

Filmemulsion befilmt und anschließend in einen Objektträgerkasten eingeordnet, die zur Aufnahme von Restfeuchtigkeit je ein Säckchen Silikatgel enthielten. Die Objektträgerkästen wurden lichtdicht verpackt und die Zellen zwei Tage bei Raumtemperatur exponiert und anschließend 4 Wochen bei 4°C aufbewahrt.

2.2.6.12. Entwicklung der Autoradiographien

Die Entwicklung fand in der Dunkelkammer unter Rotlichtbeleuchtung statt. Hierzu wurden die Objektträger in Objektträgerständer umsortiert und wie folgt behandelt:

4 min Entwicklerlösung (Kodak® D19, 8g/100ml) bei 18°C

20 sec destilliertes Wasser

5 min Fixierlösung (Kodak® Fixer, 18g/100ml)

5 min destilliertes Wasser

2.2.6.13. Hämatoxin-Eosin-Färbung

Zur lichtmikroskopischen Auswertung wurden die entwickelten Präparate mit Hämatoxin und Eosin G unter Verwendung des folgenden Protokolls angefärbt:

2 min destilliertes Wasser

4 min Hämatoxinlösung

10 sec destilliertes Wasser

4 min fließendes Leitungswasser

10 sec destilliertes Wasser

30 sec 1%ige, wässrige Eosin G-Lösung

3 x 15 sec destilliertes Wasser

2 x 15 sec 70% Ethanol

2 x 15 sec 90% Ethanol 2 x 15 sec 100% Ethanol

3 x 5 min Xylol

Nach der Färbung wurden die Zellen mit Entellan® eingedeckt.

3. ERGEBNISSE

3.1. Virusspezifische Veränderungen des Zytoskeletts im Verlauf der CVB3-Infektion

Wie elektronenmikroskopische Untersuchungen gezeigt haben, geht die Replikation von CVB3 im Herzmuskel infizierter Mäuse einher mit einer schweren Schädigung des kontraktilen Apparates der Myozyten (Klingel et al. 1998). Im Verlauf der Infektion kommt es in Herzmuskelzellen zu einer ausgeprägten Rarefizierung des kontraktilen Apparates, welche vermutlich entscheidend ist für die hämodynamische Dysregulation bei der enteroviralen Myokarditis.

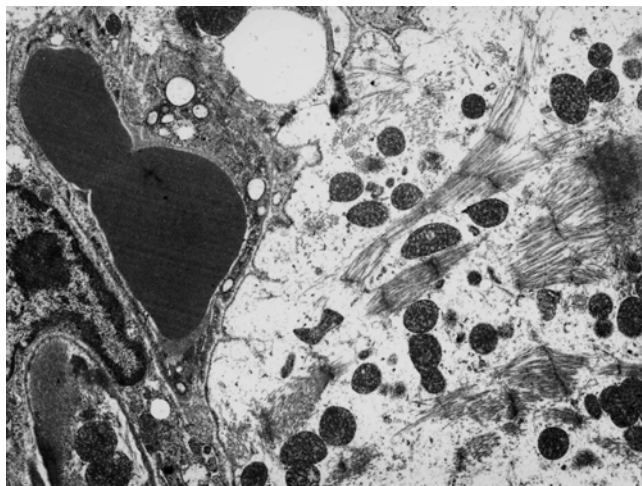


Abb. 4: CVB3-infizierte murine Myozyten weisen einen ausgedehnten Verlust an Myofibrillen auf wie elektronenmikroskopisch gezeigt (K. Klingel, nicht publiziert).

Auch andere CVB3-permissive Zellen wie z.B. HeLa-Zellen oder Vero-Zellen zeigen eine für die Enterovirusinfektion typische Änderung der Morphologie, welche in kultivierten Zellen mikroskopisch durch Abrundung gekennzeichnet ist (= zytopathischer Effekt, CPE) (Cordell-Stewart & Tylor, 1971). Zur Identifikation derjenigen Kompartimente des Zytoskeletts, welche mit der Replikation von CVB3 interferieren, wurden zunächst CVB3-infizierte HeLa-Zellen mittels immunhistochemischen Doppelmarkierungsverfahren untersucht, wobei jeweils ein Zytoskelettbestandteil und parallel hierzu virale Proteine markiert wurden. Dargestellt wurden die Intermediärfilamente Keratin und Vimentin, α -Tubulin als Bestandteil der Mikrotubuli sowie F-Aktin als Bestandteil der Mikrofilamente.

3.1.1. Immunhistochemische Darstellung von Intermediärfilamenten in uninfizierten und CVB3-infizierten HeLa-Zellen

a) Keratin

Nicht-infizierte HeLa-Zellen erscheinen in der Immunfluoreszenzmikroskopie nach Anfärbung des Keratins als teils rautenförmige, teils vieleckige, flach anmutende Zellen. Die Keratinfilamente stellen sich als feine Fäden dar, welche die ganze Zelle durchziehen und ein komplexes Geflecht bilden, das sich teilweise in der Zellmitte etwas zu verdichten scheint (Abb. 5). Die infizierten Zellen hingegen zeigen nicht mehr die klassische HeLa-Zellform, sondern imponieren als deutlich kleineres, kugelförmiges Gebilde (Abb. 6). Zwar sind die Keratinfilamente noch zu erkennen, sie scheinen jedoch nicht mehr so geordnet und gegenüber der uninfizierten HeLa-Zelle in ihrer Struktur verdichtet zu sein. Auf der rechten Seite von Abb. 6 sind die viralen Hüllproteine (CVB3 VP423) im Doppelmarkierungsverfahren dargestellt.

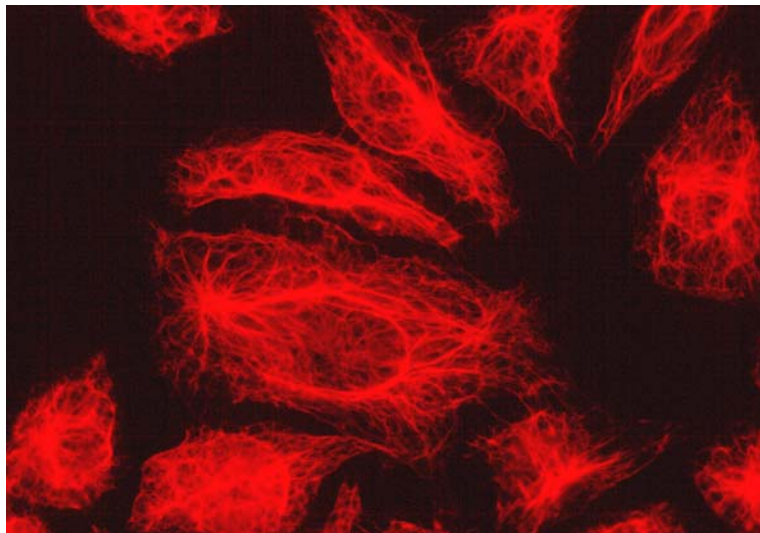


Abb. 5: Keratingerüst nicht-infizierter HeLa-Zellen.

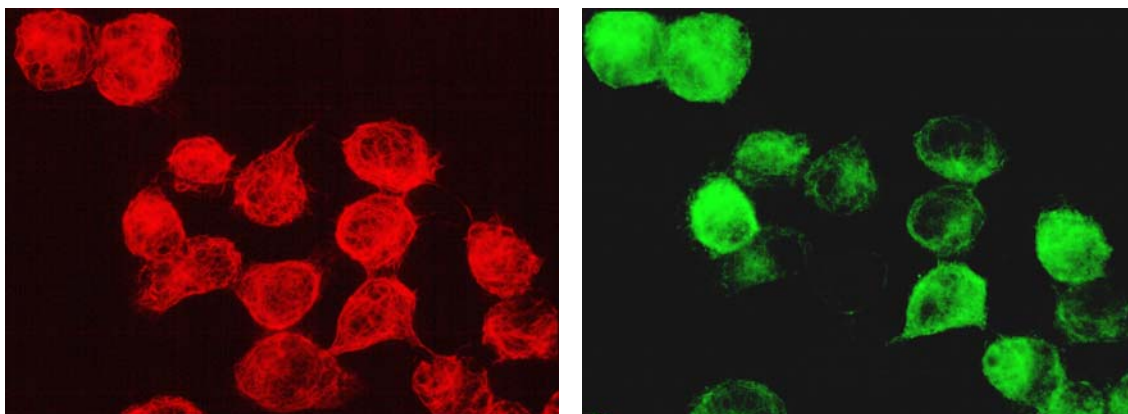


Abb. 6: Darstellung des Keratingerüsts (linke Abb.) und simultaner Nachweis von CVB3-Hüllproteinen (VP432) (rechte Abb.) in HeLa-Zellen 5 h pi.

b) Vimentin

Auch bei der Darstellung des Vimentingerüsts uninfizierter HeLa-Zellen fällt zunächst die für diese Zelllinie typische Form auf. Das Vimentingerüst selbst erscheint in der immunhistochemischen Darstellung nicht so klar strukturiert wie z.B. das Keratingerüst. Einzelne Filamente sind nicht deutlich voneinander abzugrenzen, eine eindeutige Anordnung des Vimentingerüsts lässt sich nicht klar erkennen (Abb. 7). Nach Infektion mit CVB3 zeigt sich auch in der Anfärbung der Vimentinfilamente eine deutliche Abrundung und eine scheinbare Verkleinerung der HeLa-Zellen, die mit einer ungerichteten Verdichtung des Vimentins im Vergleich zu den uninfizierten Zellen einhergeht (Abb. 8).

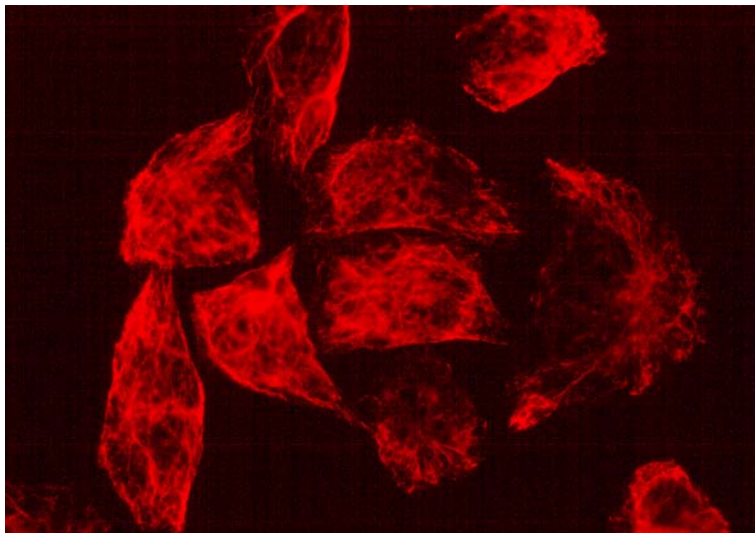


Abb. 7: Vimentingerüst nicht-infizierter HeLa-Zellen.

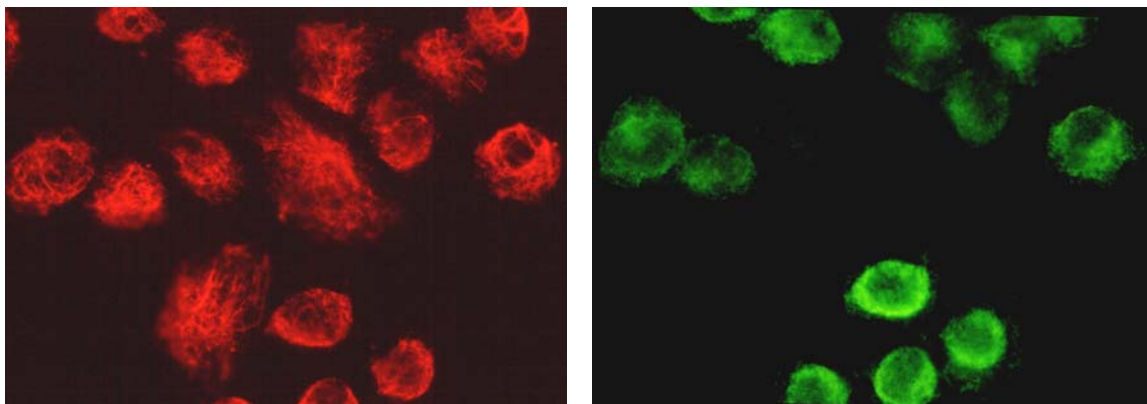


Abb. 8: Darstellung des Vimentingerüsts (linke Abb.) und Nachweis von CVB3-Hüllproteinen (VP432) (rechte Abb.) in HeLa-Zellen 5 h pi.

3.1.2. α -Tubulin

Das Gerüst bestehend aus α -Tubulin stellt sich in den uninfizierten HeLa-Zellen als äußerst feines Geflecht aus Filamenten dar, welches die typische Rautenform der HeLa-Zelle exzellent zum Vorschein bringt. Im Bereich des Zellkernes findet sich eine deutliche Aussparung der Filamente (Abb. 9).

Die CVB3-infizierten Zellen zeigen wiederum eine deutliche Abrundung. Die feine Struktur des α -Tubulins verdichtet sich zu einer fast homogenen Masse. Auch die Aussparung des Zellkernes ist nicht mehr so deutlich wie bei uninfizierten Zellen zu erkennen (Abb. 10).

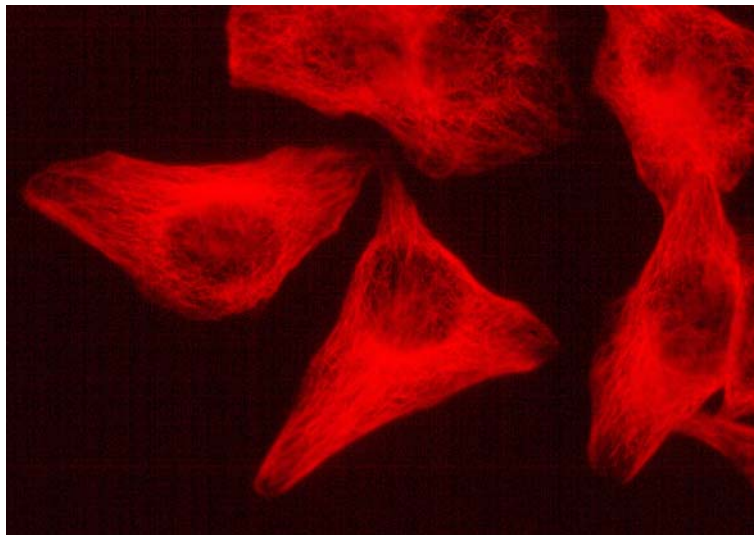


Abb. 9: Das α -Tubulingerüst nicht-infizierter HeLa-Zellen.

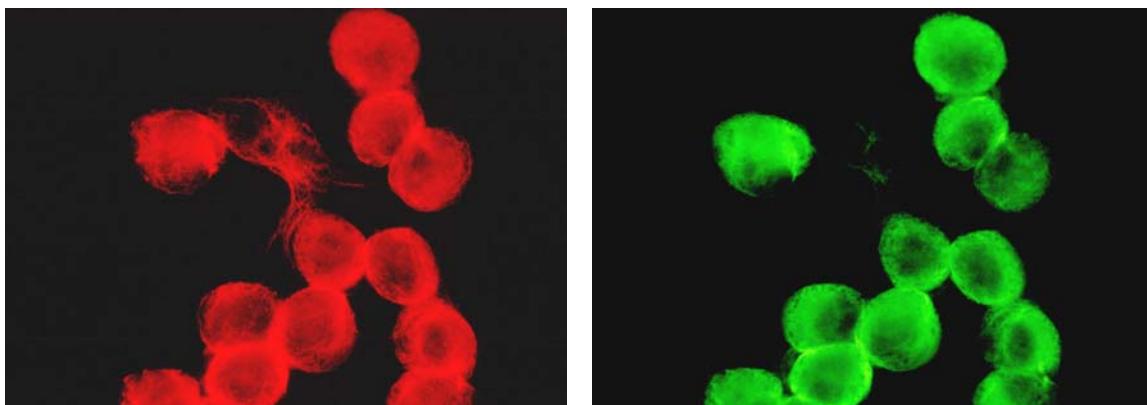


Abb. 10: Darstellung des α -Tubulingerüsts (linke Abb.) und Nachweis von CVB3-Hüllproteinen (VP432) (rechte Abb.) in HeLa-Zellen 5 h pi.

3.1.3. F-Aktin

Das F-Aktingerüst reflektiert die Darstellung der Mikrofilamente der uninfizierten HeLa-Zelle. Einzelne F-Aktinfilamente lassen sich deutlich voneinander abgrenzen und das F-Aktin erscheint relativ strukturiert über die ganze Zelle verteilt (Abb. 11). Ein gänzlich anderes Bild findet sich bei CVB3-infizierten Zellen. Das Zellinnere wirkt ausgehöhlt, das Aktingerüst scheint vollkommen zusammengebrochen zu sein. Die wenigen F-Aktinfilamente finden sich verklumpt am Zellrand, eine deutliche Form der Zelle ist nicht mehr zu erkennen; aus den anderen Zytoskelettdarstellungen wissen wir aber, dass sie zu diesem Zeitpunkt eine Kugelform angenommen hat (Abb. 12).

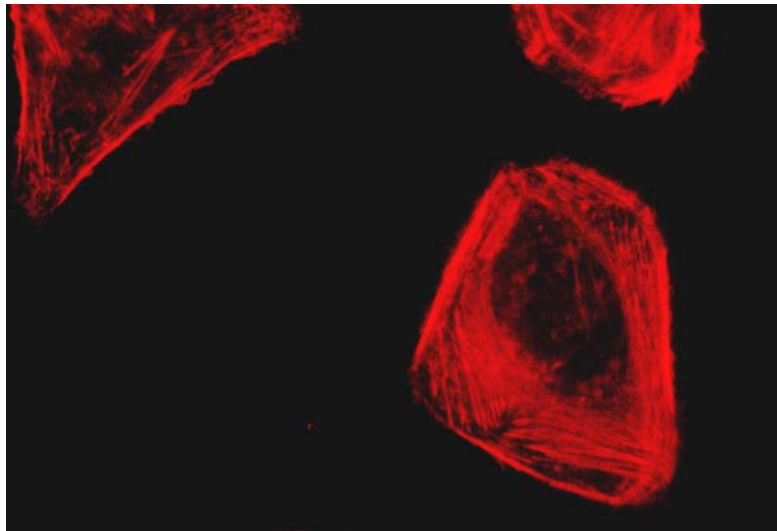


Abb. 11: Das F-Aktingerüst uninfizierter HeLa-Zellen.

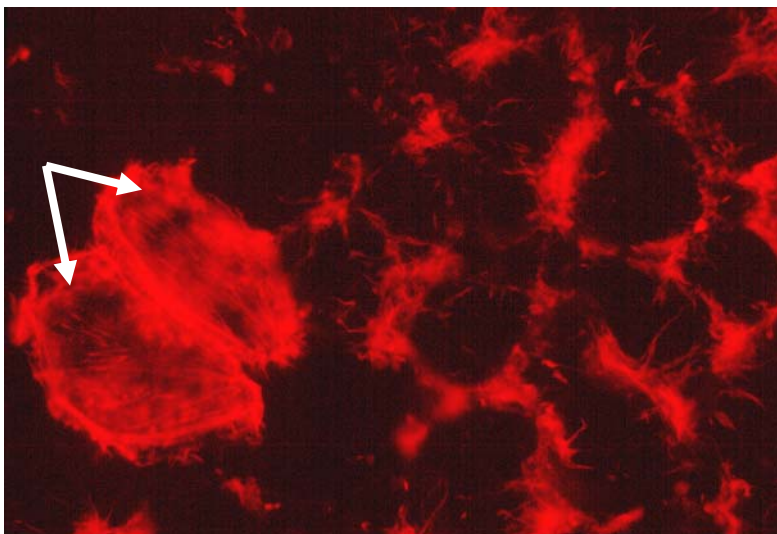


Abb. 12: Das F-Aktingerüst infizierter HeLa-Zellen 5 h pi (Zellen rechts). Die Pfeile deuten auf zwei nicht-infizierte HeLa-Zellen mit erhaltener Struktur.

3.2. Differenzierung zwischen Stress- und Virus-spezifischen Veränderungen des Zytoskeletts im Rahmen der CVB3-Infektion

Um bei den in 3.1. beschriebenen Veränderungen des Zytoskeletts zwischen unspezifischen zellulären „Stressreaktionen“ und Veränderungen im Rahmen der viralen Replikation unterscheiden zu können, wurden uninfizierte HeLa-Zellen osmotischen und thermischen Stressbedingungen ausgesetzt.

Zur Erzeugung einer osmotischen Stressreaktion wurden die Zellen für 45 min in 10xPBS inkubiert. 10xPBS hat eine deutlich höhere Ionenkonzentration im Vergleich zu normalem Inkubationsmedium und wirkt somit stark osmotisch. Nach der 45minütigen Inkubation wurden die Zellen fixiert.

Der thermische Stress wurde bei 42°C im Wasserbad (45 min) erzeugt. Normalerweise erfolgte die Inkubation der Zellen bei 37°C, somit ergibt sich eine Temperaturdifferenz von 5°C, wobei die Temperatur von 42°C der für humane Zellen kritischen Temperatur entspricht.

3.2.1. Intermediärfilamente unter osmotischem und thermischem Stress

Sowohl in der Darstellung von Keratin als auch von Vimentin ließ sich unter osmotischem und thermischem Stress die beschriebene Abrundung der Zellen sowie eine Verdichtung der Filamente beobachten, die mikroskopisch derjenigen bei der CVB3-Infektion entsprach (vgl. Abb. 6 und 8). Die Veränderungen des Keratin- und des Vimentingerüsts der HeLa-Zellen reflektieren somit keine virusspezifische Reaktion, sondern stellen vielmehr zellspezifische Reaktionen auf Stressoren verschiedener Genese dar.

3.2.2. α -Tubulin unter osmotischem und thermischem Stress

Auch das Tubulingerüst zeigte unter osmotischem und thermischem Stress die schon bei der Infektion beobachtete Abrundung der Zelle und eine primär perinukleäre Verdichtung der Filamente (vgl. Abb. 10). Somit deuten auch die Veränderungen im α -Tubulingerüst eher auf eine zellspezifische Stressreaktion als auf eine virusspezifische Reaktion hin.

3.2.3. F-Aktin unter osmotischem und thermischem Stress

Das Aktingerüst zeigte unter osmotischem und thermischem Stress zwar eine leichte Formveränderung der Zelle (Abb. 13), die bei der Infektion mit CVB3 beobachtete Aushöhlung der Zellen, der vollständige Zusammenbruch des Aktingerüsts sowie die Verklumpung der Filamente an den Zellrändern blieb jedoch aus (vgl. Abb. 12).

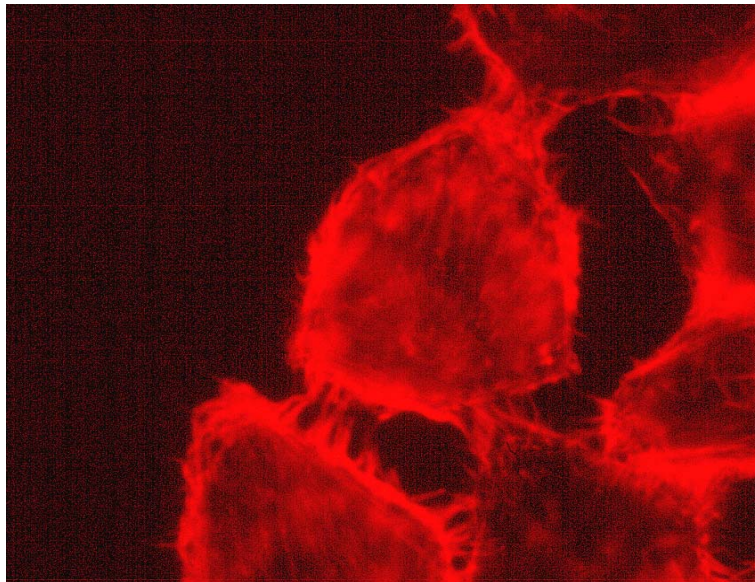


Abb. 13: Darstellung der Aktinfilamente nach thermischem Stress. Die HeLa-Zellen wurden vor der Fixation 45 min lang bei 42°C inkubiert.

Auch entsprachen die sichtbaren strukturellen Veränderungen des Aktingerüsts nach Inkubation mit aktinschädigenden Substanzen wie Cytochalasin D den in Abb. 13 gezeigten und nicht denjenigen, wie sie im Rahmen der CVB3-Infektion gesehen wurden. Die unter 3.1.3. dargestellten Veränderungen im Aktingerüst scheinen demzufolge einen Befund zu repräsentieren, der spezifisch im Rahmen der Virusreplikation auftritt.

3.3. Zeitlicher Verlauf der Schädigung des Aktingerüsts im Rahmen der Infektion mit CVB3

3.3.1. Darstellung von Aktinfilamenten im Verlauf der Infektion

Um den zeitlichen Verlauf der zellulären Aktinschädigung durch CVB3 darstellen zu können, wurden Präparate im stündlichen Abstand nach CVB3-Inkubation

angefertigt. Im Zeitraum zwischen 2 und 4 h pi wurden zusätzlich nach jeder weiteren halben Stunde Präparate angefertigt.

Während 1.5 h pi noch keine und auch 2.5 h pi noch keine deutliche Änderung des Aktingerüsts zu erkennen ist, lassen sich 3 h pi bereits ausgeprägte strukturelle Veränderungen darstellen, welche sich in der Fragmentierung der Aktinfilamente präsentieren (Abb. 14). Diese Veränderungen schreiten weiter fort und resultieren letztlich in einer völligen Verklumpung der Filamente an den Zellrändern (5 h pi). Es ist also davon auszugehen, dass die Aktinschädigung zwischen 2 und 3 h pi beginnt, wobei dieser Zeitraum mit der Synthese der viralen Proteine im Rahmen des Replikationszyklus korreliert (Rueckert, 1996).

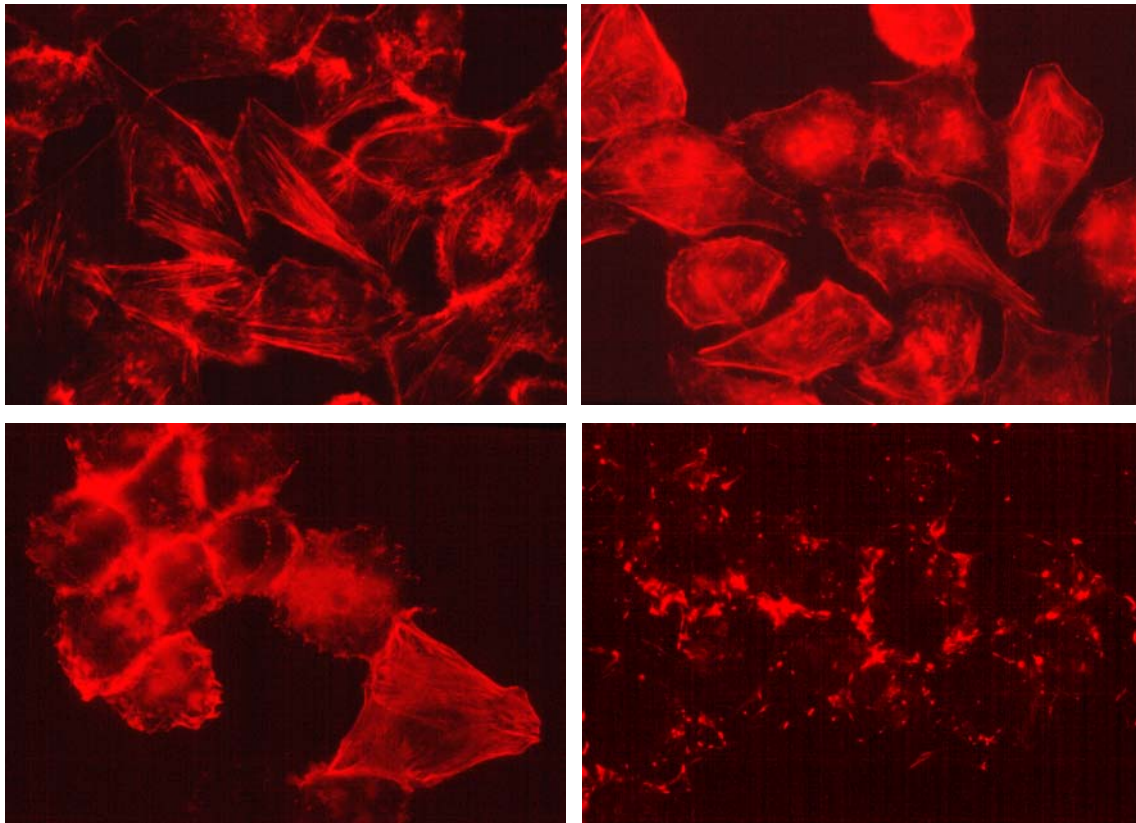


Abb. 14: Das Aktingerüst von CVB3-infizierter HeLa-Zellen 1.5 h (links oben), 2.5 h pi (rechts oben), 3 h pi (links unten) und 5 h pi (rechts unten).

3.3.2. Nachweis viraler RNA in HeLa-Zellen während der frühen Phase der Infektion

Mittels *in situ* Hybridisierung lässt sich bereits 2 h pi intrazelluläre virale RNA nachweisen, die 3 h pi noch deutlich zunimmt (Abb. 15). Da zu diesem Zeitpunkt noch keine Schädigung des Aktingerüsts sichtbar wird, kann man davon ausgehen, dass das Aktingerüst weder bei der Virusaufnahme noch während der frühen Phase

der RNA Synthese zerstört wird, sondern erst später während der Synthese viraler Proteine (3 h pi).

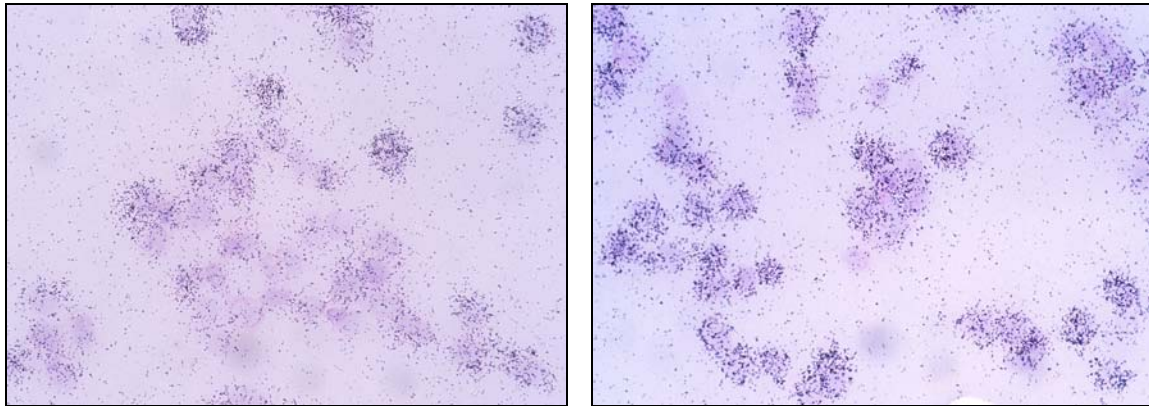


Abb. 15: Nachweis viraler RNA 2 h pi (linke Abb.) und 3 h pi (rechte Abb.) mittels radioaktiver *in situ* Hybridisierung.

3.4. Einfluß von CVB3 auf das Zytoskelett von Myozyten

Um einen möglichen Zusammenhang der von uns in CVB3-infizierten HeLa-Zellen gezeigten spezifischen Veränderungen des Aktingerüsts mit der durch Enteroviren induzierten Kardiomyopathie aufzuzeigen, gingen wir der Frage nach, ob CVB3-infizierte Myozyten ebenfalls einen Zusammenbruch des Aktingerüsts zeigen.

3.4.1. Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen an kultivierten Rattenmyozyten

Rattenmyozyten zeigen im uninfizierten Zustand in der Darstellung mittels Phalloidin eine deutliche und gerichtete Aktinstruktur (Abb. 16).

Nach einer 12-stündigen Infektion mit CVB3 lassen sich folgende Veränderungen im Aktingerüst feststellen:

- die gerichtete Aktinstruktur ist nicht mehr erkennbar, einzelne Filamente lassen sich in ihrem Verlauf nicht mehr verfolgen.
- das Aktingerüst erscheint fraktioniert.
- die einzelnen Filamente des Aktingerüsts scheinen sich stellenweise zu verklumpen (Abb. 17).

Somit lassen sich die in HeLa-Zellen beobachteten Veränderungen des Aktingerüsts auf kultivierte Rattenmyozyten übertragen, auch in Myozyten finden sich die für eine Infektion mit CVB3-spezifischen strukturellen Schädigungen des Aktingerüsts.

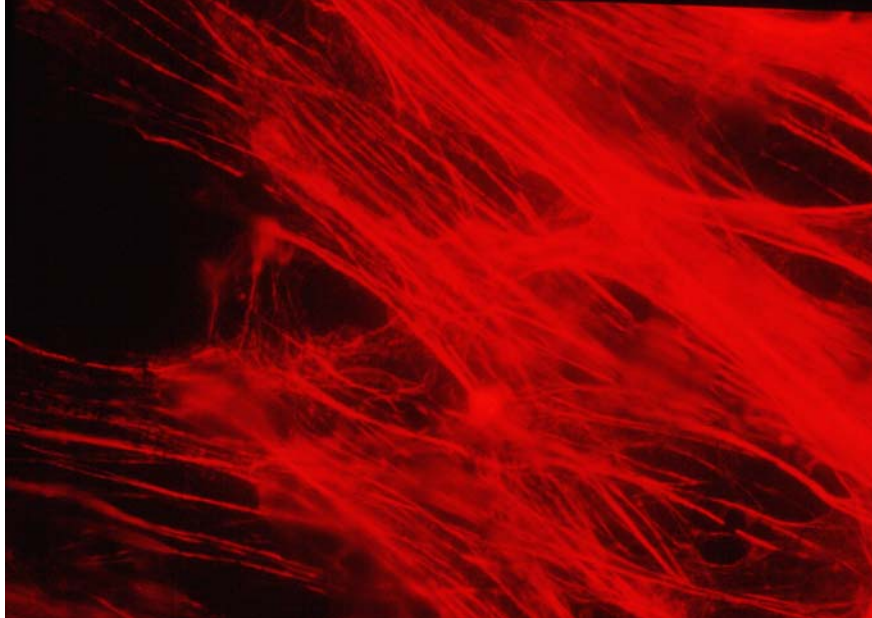


Abb. 16: Das Aktingerüst kultivierter Rattenmyozyten in der Immunfluoreszenzdarstellung mittels Phalloidin zeigt eine gerichtete Struktur.

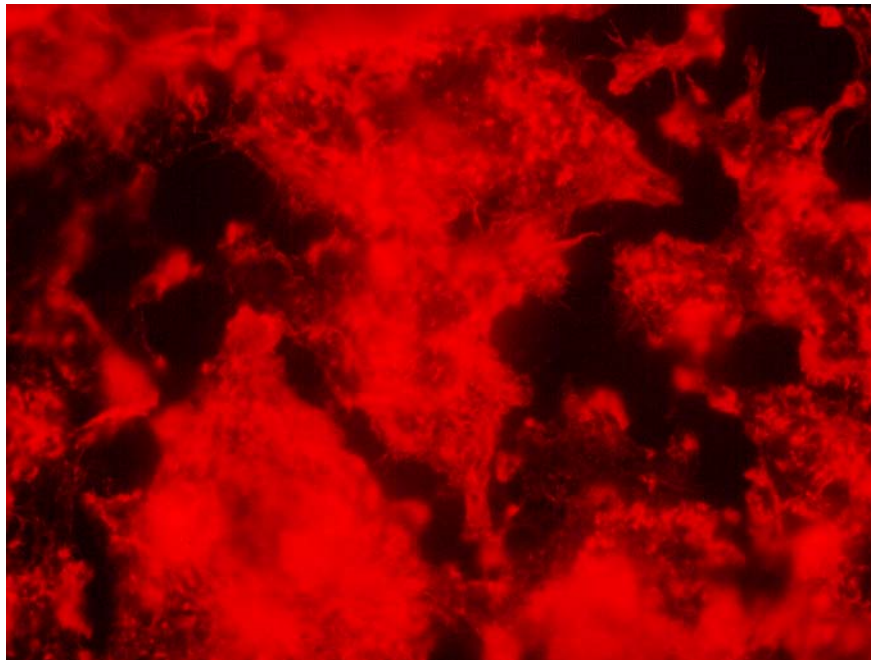


Abb. 17: Das Aktingerüst kultivierter CVB3-infizierter Rattenmyozyten erweist sich 12 h pi als fragmentiert und unkoordiniert.

3.4.2. Untersuchung der Aktinstruktur in Herzmuskelzellen *in vivo* am Mausmodell der CVB3-Myokarditis

Zur Untersuchung der Übertragbarkeit unserer Ergebnisse aus der Zellkultur auf *in vivo* Modelle haben wir Myokardschnitte von ABY/SnJ-Mäusen 4 Tage pi mit CVB3 auf strukturelle Veränderungen untersucht. Zu diesem Zeitpunkt nach Virusinokulation ist virale RNA in Myozyten bereits nachweisbar, allerdings finden sich histologisch noch keine mononukleären Entzündungszellinfiltrate (Klingel et al., 1992), so dass eine potentielle Schädigung der Myozyten ausschließlich durch den virusinduzierten zytopathischen Effekt bedingt sein kann. In der Aktindarstellung der Mausherzschnitte finden sich zwischen scheinbar intakten Myozyten Areale, die in ihrem Gehalt an F-Aktinfilamenten deutlich reduziert erscheinen und fast wie Löcher im Myokard anmuten (Abb. 18, linke Seite). Den Beleg, dass es sich bei diesen Aktin-reduzierten Bezirken um Myozyten und nicht um Infiltrate oder Bindegewebe handelt, konnten wir mittels eines Doppelmarkierungsverfahrens zur Darstellung von Desmin und Aktin erbringen. Die aktinarmen Bezirke wurden durch die Anti-Desmin-Antikörper deutlich angefärbt. Es handelt sich demnach um geschädigte Myozyten, da Desmin sich primär in Myozyten findet (Abb. 18, rechte Seite). Beim simultanen Nachweis von Aktin (rot) und einem Antikörper, der gegen die CVB3 Polymerase 3D gerichtet ist, konnten wir in den Aktin-reduzierten Bezirken des Myokards virale Polymerase (grün) nachweisen (Abb. 19). Die infizierten Myozyten weisen demnach auch *in vivo* den Zusammenbruch des Aktingerüsts während der CVB3-Infektion auf.

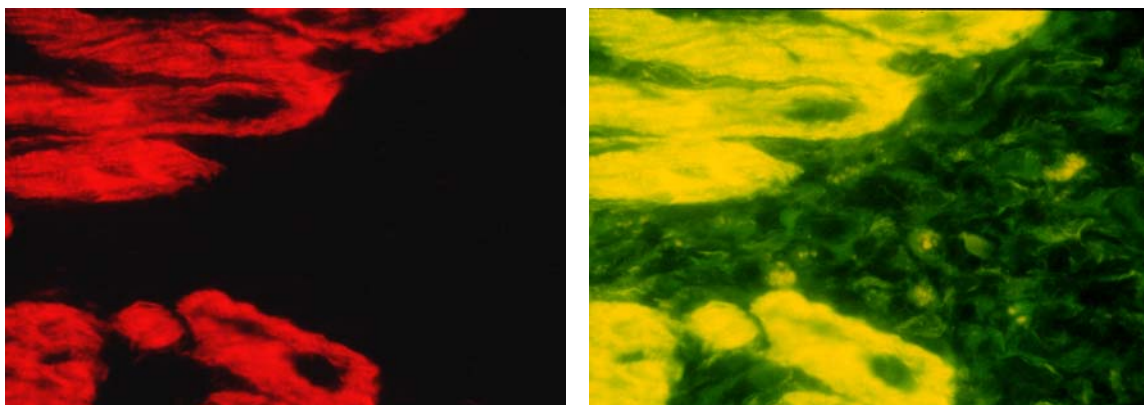


Abb. 18: Simultane Darstellung von Aktin (linke Abb.) und Desmin (rechte Abb.) im Herzmuskel einer ABY/SnJ-Maus 4 Tage pi mit CVB3.

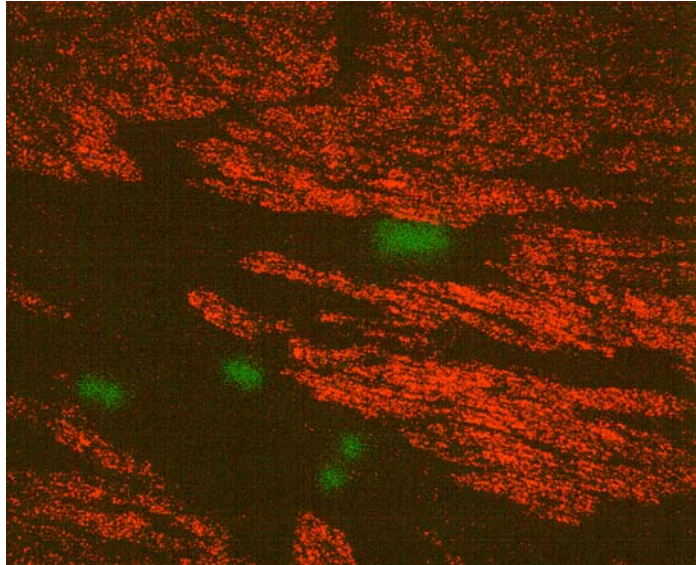


Abb. 19: Darstellung von Aktin (rot) und CVB3 Polymerase 3D (grün) durch Doppelmarkierung im murinen Myokard 4 Tage pi mittels Laserscanmikroskopie.

3.5. Einfluß des Calciums auf Veränderungen des Aktinskeletts bei der CVB3-Infektion

Wie unter 1.6. beschrieben kann Calcium im Rahmen von Infektionen eine entscheidende Rolle in der Ätiologie des zytopathischen Effekts zukommen. Zur Untersuchung des Einflusses von Calcium hinsichtlich der Schädigung zellulärer Strukturen im Rahmen der CVB3-Infektion kamen folgende Reagenzien zum Einsatz:

Verapamil: wird in der Medizin als Calciumkanalblocker eingesetzt. Verapamil blockiert den Calciumeinstrom über die potentialabhängigen Calciumkanäle vom L-Typ. Wie unter 1.6. beschrieben lässt sich die Replikation einiger Viren, darunter auch diejenige des Cytomegalievirus, durch Verapamil inhibieren.

Thapsigargin: entleert die Calciumspeicher des endoplasmatischen Reticulums. Diese Speicher sind die größten Calciumreservoirs der Zelle (Carafoli, 1987). Thapsigargin ist ein spezifischer Inhibitor der Ca^{2+} -ATPase des endoplasmatischen Reticulums (Lytton et al., 1991). Diese Ca^{2+} -ATPase transportiert Ca^{2+} vom Zytoplasma ins endoplasmatische Reticulum, um den kontinuierlichen Verlust des

gespeicherten Calciums über Kanäle der Membran des endoplasmatischen Reticulums auszugleichen (Carafoli, 1987).

3.5.1. CVB3-Infektion von HeLa-Zellen unter Verapamil

HeLa-Zellen wurden nach der unter 2.2.3. angegebenen Methode mit CVB3 infiziert, wobei dem Medium ab der Virusinkubation 1 µg/ml bzw. 5 µg/ml Isoptin® (Verapamil) zugegeben wurde.

Fünf Stunden nach Infektion zeigten sich in der Immunfluoreszenz die typischen Veränderungen des Aktingerüsts in Form einer Fragmentierung. Bei manchen Zellen schien die Verklumpung der Filamente an den Zellrändern nicht so ausgeprägt wie unter verapamilfreien Bedingungen, die Zerstörung des Aktingerüsts konnte aber nicht verhindert werden. Die von uns beobachtete Aktingerüstzerstörung im Rahmen der CVB3-Infektion erscheint somit unabhängig von einem Einstrom von Calcium durch die L-Calciumkanäle.

3.5.2. CVB3-Infektion von HeLa-Zellen unter calciumfreien Bedingungen

Zum Ausschluß des Calciumeinstroms durch Kanäle vom nicht L-Typ während der Infektion wurden HeLa-Zellen unter calciumfreien Bedingungen infiziert. Die Virussuspension wurde aus einem calciumfreien Medium hergestellt und die Zellen wurden 1 h vor Infektion in calciumfreiem Medium ohne FCS gehalten und in demselbigen nach Infektion inkubiert.

Auch unter diesen Infektionsbedingungen konnte die Zerstückelung des Aktingerüsts nicht verhindert werden und entspricht weitestgehend den Befunden wie sie in Abb. 12 dargestellt sind. Hieraus kann geschlossen werden, dass Calciumeinströme von außen in die Zelle für die von uns beobachteten Veränderungen im Aktingerüst keine Rolle spielen.

3.5.3. CVB3-Infektion von HeLa-Zellen unter Thapsigargin

Sowohl das endoplasmatische wie auch das sarkoplasmatische Retikulum enthalten Calciumspeicher. Zur Überprüfung inwieweit das in diesen Speichern vorhandene Calcium zum zytopathischen Effekt im Rahmen der CVB3-Infektion beiträgt,

entleerten wir vor Infektion diese Speicher mit Thapsigargin und infizierten die HeLa-Zellen anschließend unter calciumfreien Bedingungen. Die Untersuchung mittels Immunfluoreszenz zeigte wiederum die für die CVB3-Infektion typischen Veränderungen im Zytoskelett. Das Aktingerüst war zusammengebrochen und fraktioniert vergleichbar den Befunden wie sie in Abb. 12 gezeigt sind. Die alleinige Entleerung der Calciumspeicher unter calciumhaltigen Bedingungen ohne Infektion zeigte keinen zytopathischen Effekt auf das Aktingerüst.

Es kann somit geschlossen werden, dass die von uns beobachteten Veränderungen des Aktingerüsts bei der CVB3-Infektion nicht auf einer Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration durch Einstrom des extrazellulären Calciums oder auf der Entleerung intrazellulärer Calciumspeicher beruhen.

3.6. Untersuchungen zur Abhängigkeit der CVB3-Replikation von einzelnen Zytoskelettkompartimenten

Zur Untersuchung der Abhängigkeit der Virusreplikation von einzelnen Zytoskelettkompartimenten wurden die jeweiligen Zytoskelettstrukturen durch Zugabe verschiedener Substanzen spezifisch zerstört. Sämtliche Substanzen wurden zum Zeitpunkt der Infektion in der jeweils unten angegebenen Konzentration dem Medium zugegeben. Die Zellen wurden anschließend mittels Immunfluoreszenzmikroskopie zum Nachweis viraler Proteine sowie auf mögliche Zytoskelettveränderungen hin untersucht. Zusätzlich wurde eine Ein-Schritt-Wachstumskurve zum Nachweis der Virusreplikation erstellt sowie die intrazelluläre Produktion viraler RNA mittels *in situ* Hybridisierung untersucht.

3.6.1. CVB3-Infektion von HeLa-Zellen unter Zugabe von Nocodazol

Nocodazol führt einen unmittelbaren Zusammenbruch des Vimentingerüsts herbei, zusätzlich kommt es zu einer Depolymerisation der Mikrotubuli (Klymkowski et al., 1989). Nocodazol wurde in einer Endkonzentration von 10 µg/ml während der Inkubation mit CVB3 dem Medium gegeben.

3.6.1.1. Immunfluoreszenz zum Nachweis viraler Hüllproteine unter Nocodazol

In der Immunfluoreszenzmikroskopie zeigte sich keine Inhibition der Synthese viraler Hüllproteine unter Nocodazol. Die Zytoskelettveränderungen der Intermediärfilamente bei CVB3-Infektion unter Nocodazol waren vergleichbar mit denjenigen ohne Zusatz von Nocodazol und bestanden in einer Abrundung der Zelle, entsprechend der unter 3.2. beschriebenen zellulären Stressreaktionen. Das Aktingerüst zeigte auch unter Nocodazol seine für die CVB3-Infektion typischen Veränderungen mit Fragmentierung der Filamente wie in Abb. 12 dargestellt.

3.6.1.2. Ein-Schritt-Wachstumskurve unter Nocodazol

Die Ein-Schritt-Wachstumskurve ließ keine Inhibition der Synthese viraler Partikel erkennen. Der Titerverlauf, welcher durch Plaque-Tests ermittelt wurde, entsprach auch unter Nocodazol dem Titerverlauf einer CVB3-Infektion in HeLa-Zellen ohne Zusatz von potentiellen Inhibitoren (Abb. 20).

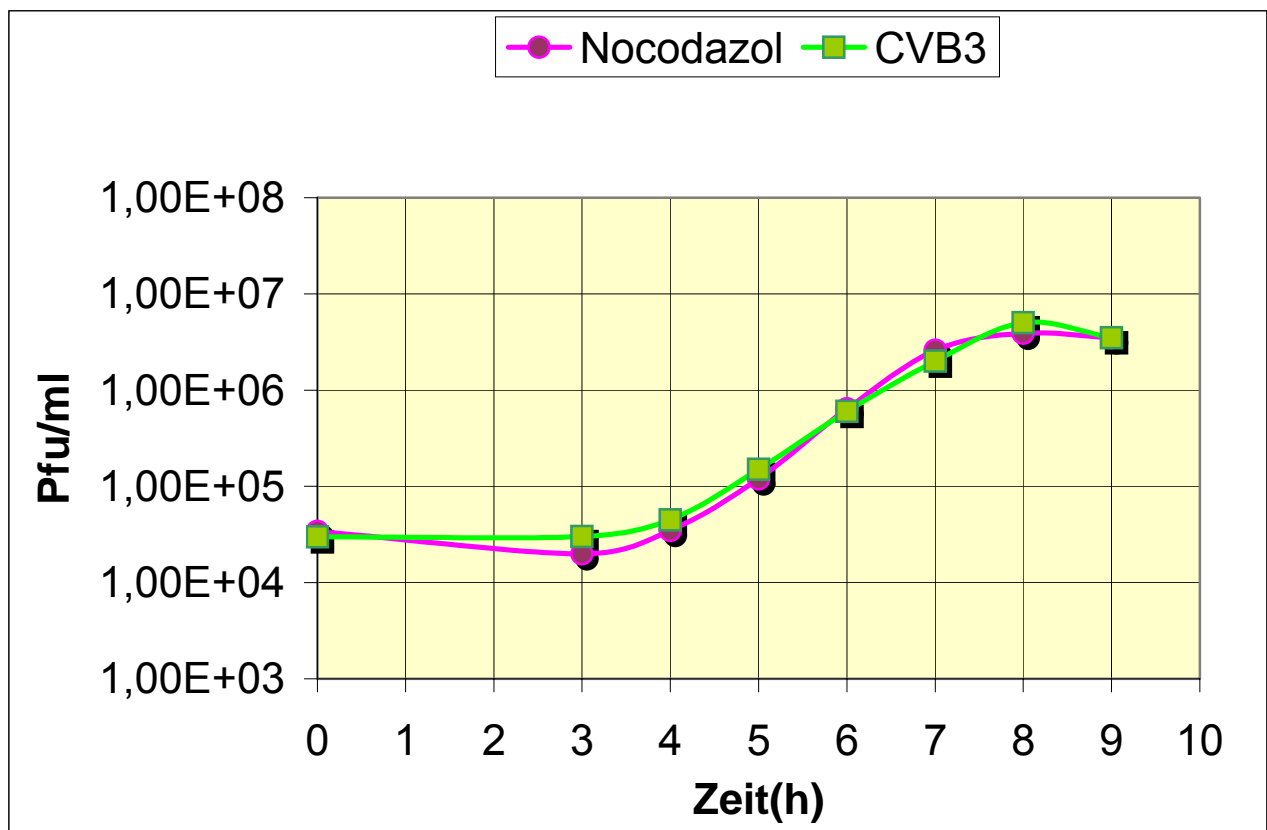


Abb. 20: Virustiter in HeLa-Zellen 0-9 h pi CVB3 mit und ohne Zugabe von Nocodazol.

3.6.1.3. *In situ* Hybridisierung zum Nachweis viraler RNA unter Nocodazol

Mittels *in situ* Hybridisierung zeigte sich keine Abnahme der viralen RNA in den Zellen unter Zusatz von Nocodazol im Vergleich zu einer CVB3-Infektion ohne Nocodazol. Die Synthese viraler RNA wird durch den Zusammenbruch des Vimentingerüstes und durch die Depolymerisation der Mikrotubuli offensichtlich nicht inhibiert.

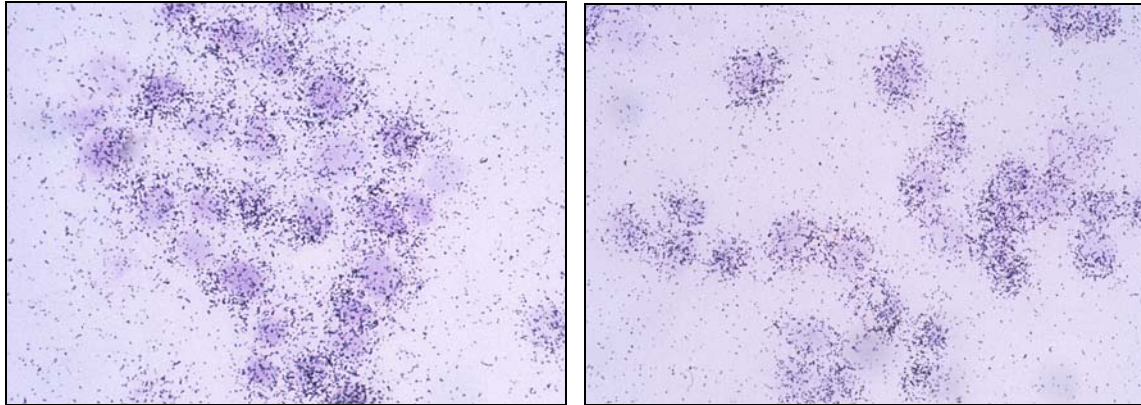


Abb. 21: *In situ* Hybridisierung zum Nachweis viraler RNA 5 h pi ohne (linke Abb.) und unter Zugabe von 10 µg/ml Nocodazol (rechte Abb.).

3.6.2. CVB3-Infektion von HeLa-Zellen unter Zugabe von Taxol

Taxol ist ein in der Onkologie vielfach eingesetztes Zytostatikum mit Angriffspunkt an den Mikrotubuli. Diese werden durch Taxol stabilisiert (de Brabander et al., 1981), wodurch eine antimittotische Wirkung auf die Zelle erzielt wird. Taxol lag in einer Endkonzentration von 20 µg/ml während der Virusinkubation im Medium vor.

3.6.2.1. Immunfluoreszenz zum Nachweis viraler Hüllproteine unter Taxol

In der Immunfluoreszenzmikroskopie zeigte das Aktingerüst unter Taxol die für die CVB3-Infektion typische Schädigung. Die Mikrotubuli zeigten auch ohne Infektion mit CVB3 unter Zugabe von Taxol einen deutlichen Strukturverlust bei Abrundung der Zelle vergleichbar dem Befund, welcher in Abb. 13 gezeigt wird. Diese Abrundung ist am ehesten auf eine Stressreaktion der Zelle bedingt durch die Gabe von Taxol zurückzuführen. Dieselben Veränderungen traten auch dann auf, wenn die Zellen zusätzlich infiziert waren. Eine Inhibition der Synthese viraler Hüllproteine war nicht zu verzeichnen.

3.6.2.2. Ein-Schritt-Wachstumskurve unter Taxol

In der Ein-Schritt-Wachstumskurve zeigte sich unter Taxol keine Änderung der Produktion infektiöser Viren im Vergleich zu einer CVB3-Infektion ohne Taxolgabe vergleichbar den in Abb. 20 gezeigten Befunden.

3.6.2.3. *In situ* Hybridisierung zum Nachweis viraler RNA unter Taxol

Auch in der *in situ* Hybridisierung fand sich mit und ohne Zugabe von Taxol eine vergleichbare Signalstärke der Silberkörner, welche die Menge der viralen RNA in den infizierten Zellen repräsentieren und entsprechen somit den Befunden wie sie in Abb. 21 dargestellt sind.

3.6.3. CVB3-Infektion von HeLa-Zellen unter Zugabe von Cytochalasin D

Cytochalasin D zerstört unmittelbar die Aktinorganisation der Zelle (Miranda et al., 1974). Es wird als wirkungsvolle Substanz eingesetzt, um den Einfluß von Aktin auf verschiedene Zellfunktionen zu untersuchen. Zudem ist bekannt, dass Cytochalasin D mRNA vom Zytoskelett ablöst, wobei die mRNA allerdings in ihrer Struktur nicht verändert wird und in ihrer Translationsfähigkeit erhalten bleibt. Die Ablösung der mRNA vom Zytoskelett stellt einen reversiblen Prozess dar (Ornelle et al., 1986).

3.6.3.1. Immunfluoreszenz zum Nachweis viraler Hüllproteine unter Cytochalasin D

Auch bei einer Infektion unter Cytochalasin D fanden sich in der Immunfluoreszenzfärbung virale Hüllproteine, wobei die Menge viraler Proteine im Vergleich zu unbehandelten infizierten Zellen als geringgradig reduziert erscheint. Das Keratingerüst erscheint verdichtet und weniger strukturiert und entspricht somit dem Bild nicht-behandelter CVB3-infizierter Zellen (Abb. 22).

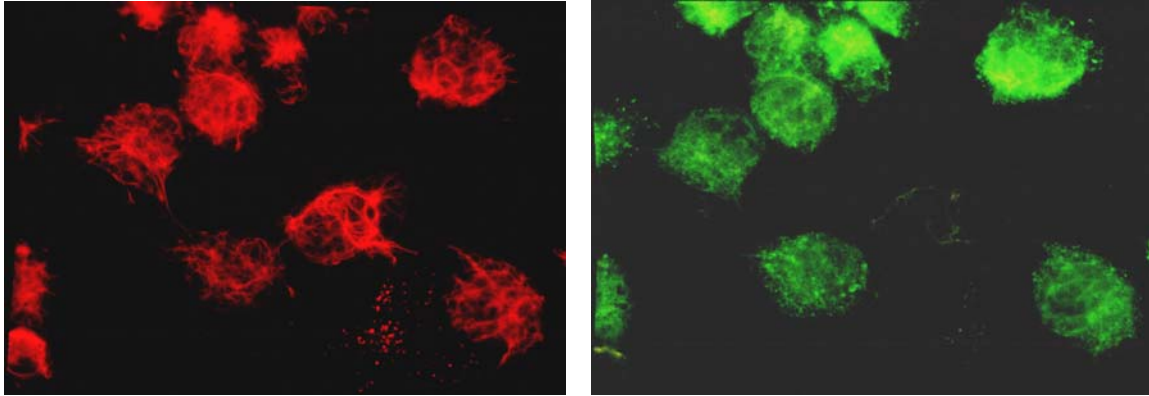


Abb. 22: Darstellung des Keratingerüsts (linke Abb.) und simultaner Nachweis von CVB3-Hüllproteinen (VP432) (rechte Abb.) in HeLa-Zellen 5h pi unter Zugabe von 10 ug/ml Cytochalasin.

Das Aktingerüst zeigte erwartungsgemäß unter Zugabe von Cytochalasin D eine Umstrukturierung mit Fragmentierung der Filamente (Abb. 23, linke Abb.). In CVB3-infizierten HeLa-Zellen blieb die typische randständige Konzentration der Aktinfragmente unter Cytochalasin D bei den meisten Zellen aus (Abb. 23, rechte Abb.)

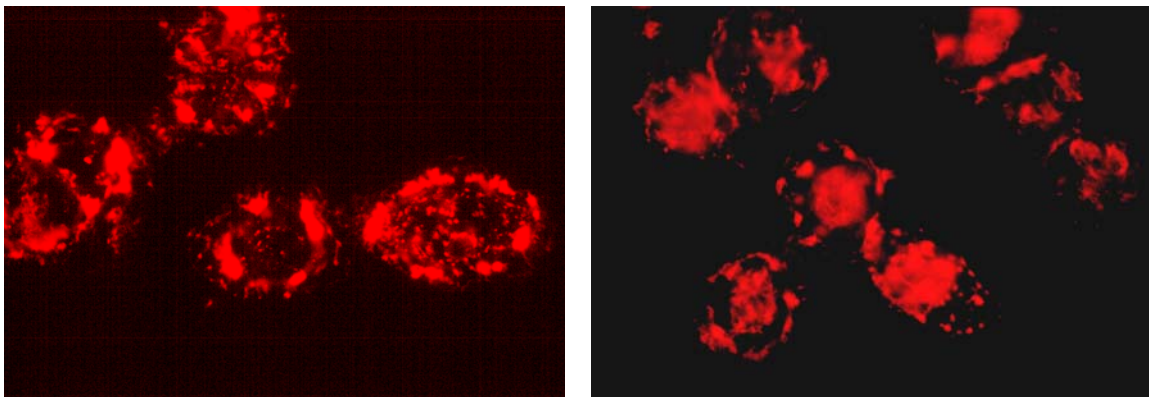


Abb. 23: Darstellung der Aktinfilamente in HeLa-Zellen unter Zugabe von Cytochalasin D (10µg/ml) ohne Infektion (Abb. links) und 5 h nach CVB3-Infektion (Abb. rechts).

3.6.3.2. Ein-Schritt-Wachstumskurve unter Cytochalasin D

Die Ein-Schritt-Wachstumskurve unter Cytochalasin D unterschied sich in zweierlei Hinsicht von der Ein-Schritt-Wachstumskurve ohne Cytochalasin D. Zum einen zeigte sich ein verzögerter Titeranstieg um ca. 3 h, zum anderen lag der Titer unter Cytochalasin D in der oben angegebenen Konzentration 1-1,5 log-Stufen unter demjenigen ohne Cytochalasin D (Abb. 24).

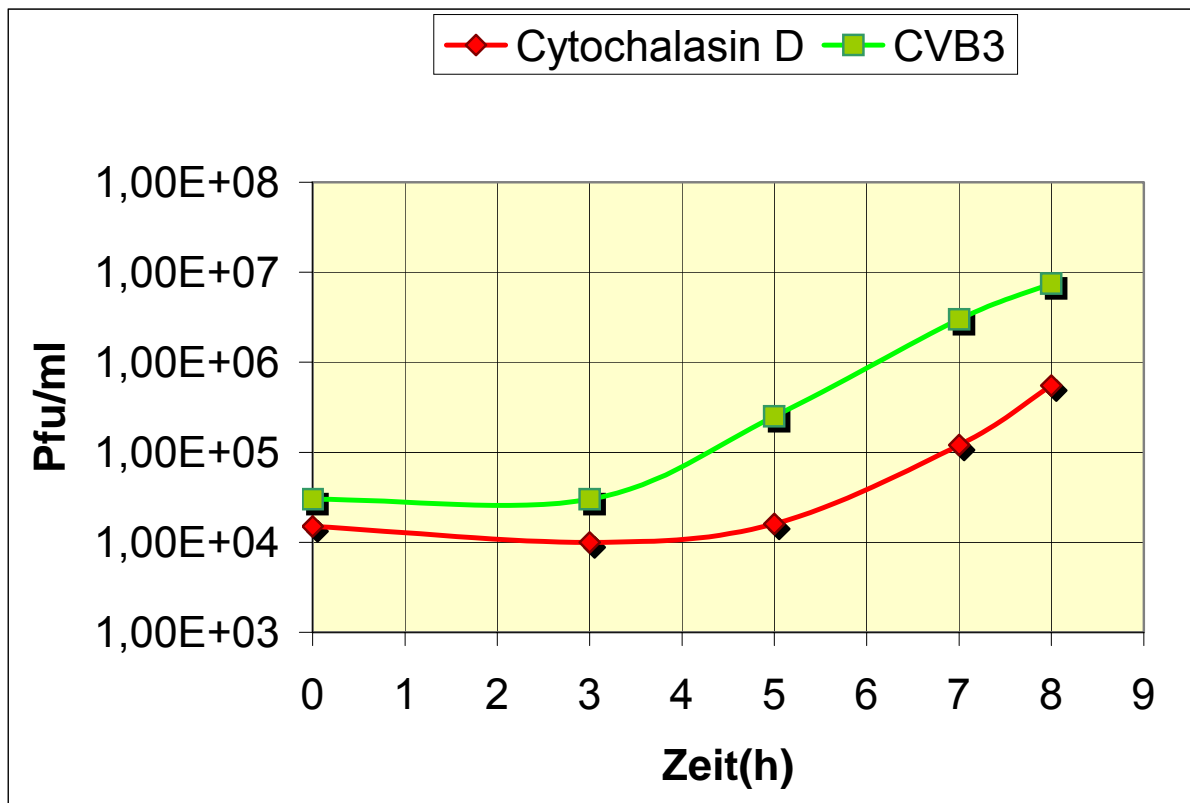


Abb. 24: Ein-Schritt-Wachstumskurve in CVB3-infizierten HeLa-Zellen mit und ohne Zugabe von 10µg/ml Cytochalasin D.

3.6.3.3. *In situ* Hybridisierung zum Nachweis viraler RNA unter Cytochalasin D

In der *in situ* Hybridisierung konnte 5 h pi in HeLa-Zellen unter Cytochalasin D im Vergleich zu derjenigen ohne Zusatz von Cytochalasin D keine signifikante Abnahme derjenigen Signalstärke verzeichnet werden, welche die Menge der neu synthetisierten viralen RNA reflektiert.

3.7. Untersuchungen zur Abhängigkeit der CVB3-Replikation in HeLa-Zellen vom Calciumeinstrom durch L-Calcium-Kanäle

3.7.1. CVB3-Infektion von HeLa-Zellen unter Verapamil

Verapamil wird in der Medizin als Calciumkanalblocker eingesetzt. Verapamil blockiert den Calciumeinstrom über die potentialabhängigen Calciumkanäle vom L-Typ (siehe 3.5). Verapamil wurde dem Medium in einer Konzentration von 1 bzw. 5 µg/ml zum Zeitpunkt der Infektion zugegeben.

3.7.1.1. Immunfluoreszenz zur Darstellung von Aktin und viralen Hüllproteinen unter Verapamil

In der Immunfluoreszenzdarstellung fand sich sowohl bei einer Konzentration von 1 µg/ml Verapamil als auch bei einer Konzentration von 5 µg/ml die für die CVB3 typische Zerstückelung des Aktingerüsts in HeLa-Zellen entsprechend Abb. 12. Virale Hüllproteine waren in der Immunfluoreszenzdarstellung in vergleichbarer Menge wie in denjenigen Zellen ohne Verapamil nachweisbar.

3.7.1.2. Ein-Schritt-Wachstumskurve unter Verapamil

In der Ein-Schritt-Wachstumskurve fand sich bei einer Konzentration von 5 µg/ml Verapamil keine Abnahme des Virustiters im Vergleich zu dem Titer ohne Zugabe des Calciumantagonisten, vergleichbar den Befunden, die in Abb. 20. gezeigt sind.

3.7.1.3. *In situ* Hybridisierung zum Nachweis viraler RNA unter Verapamil

Die *in situ* Hybridisierung an HeLa-Zellen, welche unter einer Konzentration von 5 µg/ml Verapamil mit CVB3 infiziert worden waren, zeigte keine Abnahme der Synthese viraler RNA im Vergleich zu HeLa-Zellen, die nicht unter Zugabe von Verapamil infiziert wurden, vergleichbar der Darstellung in Abb. 21.

3.8. Untersuchung der Abhängigkeit der CVB3-Replikation vom Golgiapparat

3.8.1. CVB3-Infektion von HeLa-Zellen unter Brefeldin A

Brefeldin A ist ein Makrolid-Antibiotikum, welches an verschiedenen Stellen im vesikulären Transport angreift und den Membrantransport zwischen cis- und trans-Golgiapparat hemmt.

3.8.1.1. Immunfluoreszenz zum Nachweis viraler Hüllproteine unter Brefeldin A

In der Immunfluoreszenzdarstellung von HeLa-Zellen, die in der Anwesenheit von Brefeldin A infiziert wurden, waren virale Hüllproteine nicht nachweisbar (Abb. 25,

rechte Abb.). Das Zytoskelett der Zellen erschien in der Darstellung von Keratin (Abb. 25, linke Abb.), Vimentin und α -Tubulin nicht modifiziert oder signifikant restrukturiert im Vergleich zu uninfizierten Zellen. Auch war keine Abrundung der Zellen zu erkennen. Die Fragmentierung des Aktingerüsts blieb ebenso wie die anderen für die CVB3-Infektion typischen Zytoskelettveränderungen aus, wenn Brefeldin A vom Beginn der Inkubationszeit an dem Medium zugesetzt war (Abb. 25).

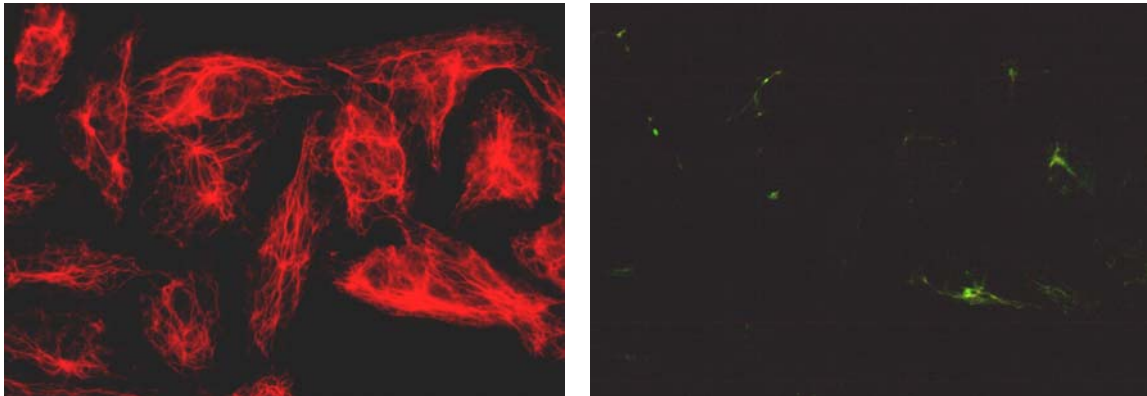


Abb. 25: Simultane Darstellung von Keratin (linke Abb.) und viralen Hüllproteinen VP423 (rechte Abb.) in HeLa-Zellen 5 h pi unter Anwesenheit von Brefeldin A während der gesamten Infektionsdauer.

Wurde Brefeldin A 1.5 h pi dem Medium zugesetzt, so konnte ein großer Teil der Zellen vor einer Schädigung weitgehend bewahrt werden und das Aktingerüst zeigte in den meisten Zellen 5 h pi eine normale Konfiguration (Abb. 26, linke Abb.). Wurde Brefeldin A 2.5 h pi, also kurz vor dem Auftreten der initialen, durch Immunfluoreszenz nachweisbaren Aktinschädigung zugesetzt, so konnte der völlige Zusammenbruch des Aktingerüsts nicht verhindert werden und es bot sich 5 h pi das gleiche Bild hinsichtlich der Aktinschädigung wie ohne Brefeldin A (Abb. 26, rechte Abb.).

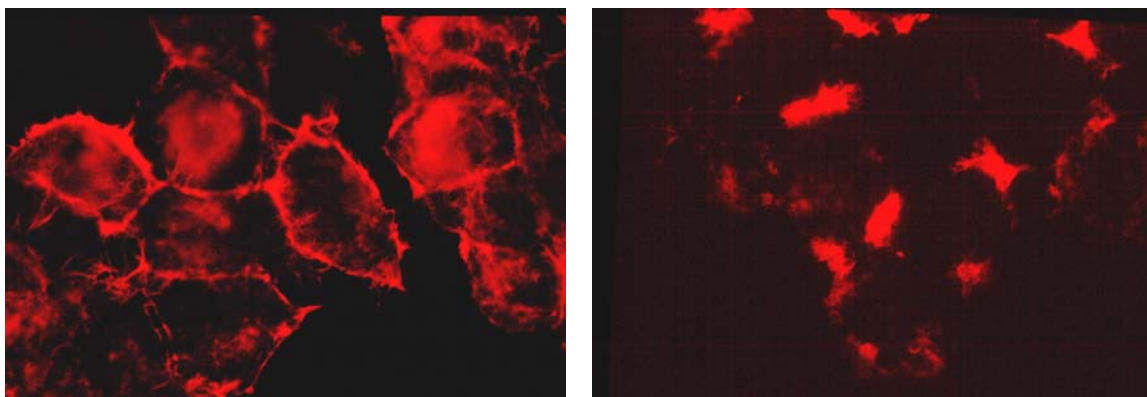


Abb. 26: HeLa-Zellen 5 h pi bei Zugabe von Brefeldin A 1.5 h nach Infektion. Die Aktinfilamente erscheinen weitestgehend normal konfiguriert (linke Abb.). Dagegen ist die regelrechte Aktinstruktur in den meisten Zellen 5 h pi aufgehoben, wenn Brefeldin erst 2.5 h pi dem Medium zugegeben wurde (Abb. rechts).

3.8.1.2. Ein-Schritt-Wachstumskurve unter Brefeldin A

Schon bei einer Konzentration von 0.25 µg/ml Brefeldin A war eine vollständige Inhibition der Synthese viraler Partikel zu beobachten. Die Ein-Schritt-Wachstumskurve zeigte keinen Anstieg des Virustiters in einem Zeitraum von 9 h pi. Der Titer blieb auf Niveau des Ausgangswertes (Abb. 27).

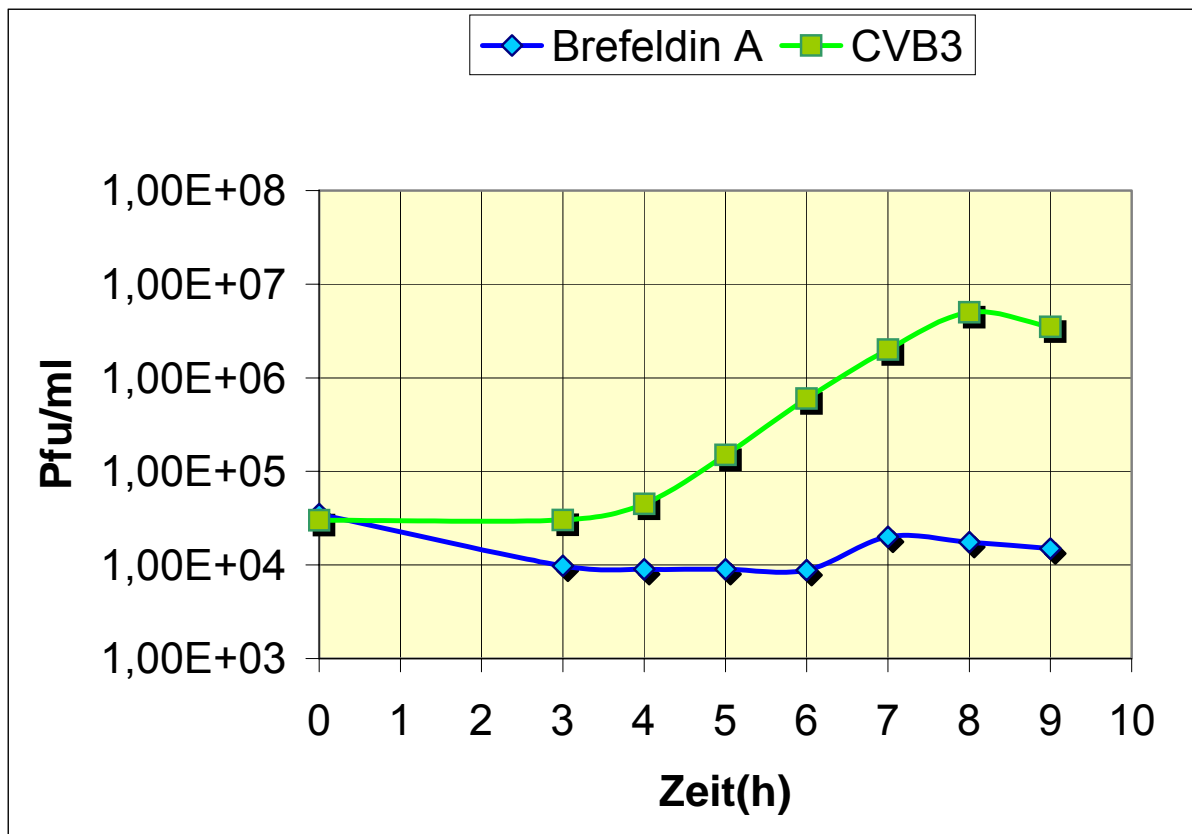


Abb. 27: Ein-Schritt-Wachstumskurve einer CVB3-Infektion ohne und mit Zugabe von Brefeldin A (0.25 µg/ml).

3.8.1.3 In situ Hybridisierung zum Nachweis viraler RNA unter Brefeldin A

In der *in situ* Hybridisierung zeigte sich bereits bei einer Konzentration von 0.25 µg/ml Brefeldin A eine Inhibierung der viralen RNA Synthese, wenn Brefeldin A von Beginn der Infektion an dem Medium zugesetzt war. Interessanterweise gab es einzelne CVB3 RNA-positive Zellen zwischen offensichtlich uninfizierten Zellen. Ob es sich hierbei um Brefeldin A-resistente Zellen handelt, ist unklar.

Gab man Brefeldin A 1.5 h pi dem Medium hinzu, so konnte bei dem größten Teil der untersuchten Zellen eine Inhibition der viralen RNA Synthese verzeichnet werden.

Wurde Brefeldin A hingegen 2.5 h pi dem Medium zugesetzt, so war keine Inhibition der viralen RNA Synthese in der *in situ* Hybridisierung mehr nachzuweisen (Abb. 28).

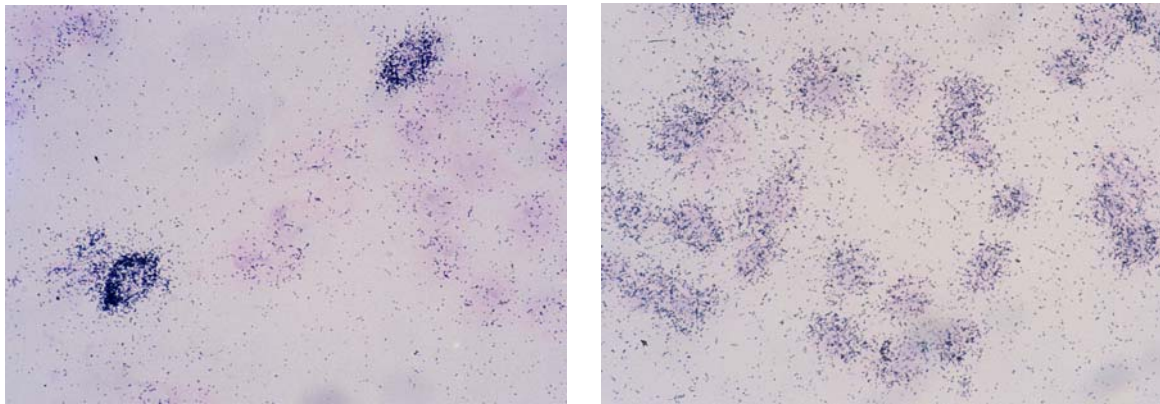


Abb. 28: Nachweis viraler RNA durch *in situ* Hybridisierung in HeLa-Zellen, wenn Brefeldin A (0.25 µg/ml) 1,5 h pi (linke Abb.) bzw. 2,5 h pi zugegeben wurde (rechte Abb.).

Tabelle 3 zeigt die Zusammenfassung des Einflusses der oben aufgeführten Substanzen auf die Zerstörung des Aktingerüsts sowie auf die Generierung viraler Proteine (Ergebnisse der Immunfluoreszenz), auf die Generierung infektiöser Viruspartikel (Ergebnisse der Ein-Schritt-Wachstumskurve) und auf die Synthese der viralen RNA (Ergebnisse aus der *in situ* Hybridisierung) in CVB3-infizierten HeLa-Zellen. Alle Experimente wurden in zwei voneinander unabhängigen Versuchsreihen durchgeführt und zeigten vergleichbare Ergebnisse.

Tabelle 3: Zusammenfassung der Wirkung der getesteten Substanzen auf den viralen Replikationszyklus und die Zytoskelettschädigung

	Inhibierung der Aktinzerstörung (Nachweis durch Immunfluoreszenz)	Inhibierung der Synthese viraler Proteine (5h pi) (Nachweis durch Immunfluoreszenz)	Inhibierung der Virusreplikation (Wachstumskurve)	Inhibierung der viralen RNA-Synthese (Nachweis durch <i>in situ</i> Hybridisierung)
Nocodazol	nein	nein	nein	nein
Taxol	nein	nein	nein	nein
Cytochalasin D	nein	nein	um 1-1.5 log	nein
Verapamil	nein	nein	nein	nein
Brefeldin A	ja	ja	ja	ja

3.9. Zusammenfassung der Ergebnisse

Anhand CVB3-infizierter HeLa-Zellen konnte belegt werden, dass die Virusreplikation mit grundlegenden Veränderungen des Zytoskeletts der permissiven Zielzelle einhergeht. Die Intermediärfilamente Keratin und Vimentin weisen im Rahmen der Infektion keine geordnete Struktur mehr auf, sondern es findet sich vielmehr eine Verklumpung der Filamente im Bereich der Zellmitte. Das im uninfizierten Zustand sehr feine α -Tubulingerüst der HeLa-Zellen verdichtet sich im Verlauf der Infektion mit CVB3 zu einer undifferenzierten Masse. Das F-Aktingerüst erfährt die eindrucksvollste Veränderung bei der CVB3-Infektion. Die infizierten HeLa-Zellen erscheinen im Zellinneren bis auf wenige Filamentbündel ausgehöhlt, die F-Aktinfilamente finden sich vollkommen fragmentiert und verklumpt am Zellrand wieder.

Untersucht man diese Zytoskelettveränderungen hinsichtlich ihrer Spezifität für die virusinduzierten Schädigungen, so zeigt sich, dass nur der Zusammenbruch des F-Aktingerüsts ein spezifisches Phänomen im Rahmen der CVB3-Replikation darstellt, während die Veränderungen des Keratins, Vimentins und α -Tubulins vielmehr als virusinduzierte Stressreaktionen der Zelle zu interpretieren sind, da sie sich in vergleichbarer Form auch durch thermische oder chemische Reize induzieren lassen.

Bezüglich des zeitlichen Verlaufes der F-Aktinschädigung erkennt man den initialen Zusammenbruch des F-Aktingerüsts 2 bis 3 h pi, d.h. in einem Zeitraum, in dem v.a. die Synthese viraler Proteine stattfindet. In der *in situ* Hybridisierung zeigt sich bereits nach 2 h ein deutlicher Anstieg der viralen RNA Synthese. Da zu diesem Zeitpunkt noch keine Schädigung des Zytoskeletts zu beobachten ist, kann davon ausgegangen werden, dass das F-Aktingerüst weder bei der Virusaufnahme, noch bei der initialen Transkription viraler RNA, sondern vielmehr im Rahmen der viralen Proteinsynthese geschädigt wird.

Zur Übertragung der beobachteten Veränderungen des F-Aktingerüsts in CVB3-infizierten HeLa-Zellen auf das *in vivo* Modell der CVB3-Myokarditis wurden zudem Untersuchungen an kultivierten Rattenmyozyten vorgenommen. Auch in Myozyten konnte ein Zusammenbruch des F-Aktingerüsts im Rahmen der Infektion mit CVB3 durch Immunfluoreszenz nachgewiesen werden.

Untersuchungen am Modell der CVB3-infizierten ABY/SnJ-Maus haben zudem den

Nachweis von Aktin-reduzierten Bezirken im Myokard 4 d pi erbracht. Diese Areale korrelieren im immunhistochemischen Doppelmarkierungsverfahren räumlich mit dem Nachweis der viralen Polymerase 3D in Myozyten, wodurch die Veränderungen im F-Aktingerüst in Assoziation mit der Virusreplikation eindrucksvoll nicht nur in HeLa-Zellen, sondern auch am Mausmodell belegt werden konnte.

Zur Überprüfung, ob ein Calciumeinstrom in die Zelle oder eine Entleerung der intrazellulären Calciumspeicher den zytopathischen Effekt im Rahmen der CVB3-Infektion induziert, wurden HeLa-Zellen einerseits unter calciumfreien Bedingungen mit und ohne vorherige Entleerung der intrazellulären Calciumspeicher durch Thapsigargin und andererseits unter Blockade der L-Calcium-Kanäle durch Verapamil mit CVB3 infiziert. In keinem Fall konnte der Zusammenbruch des F-Aktingerüsts verhindert werden. Somit erscheint die Zerstörung des F-Aktinskeletts bei der CVB3-Infektion weder abhängig vom Calciumeinstrom in die Zelle noch von der Entleerung der intrazellulären Calciumspeicher.

Zur Überprüfung der Assoziation der viralen Replikation vom Zytoskelett der infizierten Zelle wurden einzelne Zytoskelettanteile durch verschiedene Substanzen spezifisch zerstört und die virale Replikation mittels einer Ein-Schritt-Wachstumskurve, *in situ* Hybridisierung zum Nachweis viraler RNA sowie durch Immunfluoreszenz zum Nachweis viraler Proteine sowie der Zytoskelettanteile überprüft. Bei der Zerstörung des F-Aktingerüsts mittels Cytochalasin D konnte ein vergleichsweise niedrigerer Virustiter sowie ein verzögerter Titeranstieg in der Ein-Schritt-Wachstumskurve nachgewiesen werden. Die Zerstörung des Keratin-, und Vimentingerüsts sowie des α -Tubulingerüsts hingegen hatte keinen nachweisbaren Einfluss auf die Virusreplikation.

In weiteren Untersuchungen wurde die Abhängigkeit der Virusreplikation von Transportmechanismen des Golgiapparats der Zielzelle überprüft. Hierzu wurde der Membrantransport im Golgiapparat mittels Brefeldin A blockiert. Erfolgt die Zugabe von Brefeldin A zu Beginn der Infektion, kommt es zu einer nahezu vollständigen Inhibition der Synthese viraler RNA, folglich ließen sich auch keine viralen Proteine nachweisen und auch die Schädigung des Zytoskeletts blieb aus. Demzufolge zeigte sich auch in der Ein-Schritt-Wachstumskurve kein Titeranstieg. Gibt man Brefeldin A erst 2.5 h pi dem Medium zu, so ist keine Inhibition der Synthese viraler RNA mehr zu beobachten und die Schädigung des Aktinskeletts ist dann vergleichbar mit derjenigen bei der Infektion ohne Brefeldin A.

Zusammenfassend lässt sich folgern, dass dem Aktingerüst der Zielzelle eine wichtige funktionelle Bedeutung für die Replikation von CVB3 zukommt und hierbei spezifisch zerstört wird. Diese Schädigung des Aktinskeletts korreliert zeitlich mit der viralen Proteinsynthese. Diese Beobachtung wurde auch *in vivo* anhand des Mausmodells der CVB3-Myokarditis bestätigt. Durch die Zerstörung des F-Aktingerüsts mittels Cytochalasin D lässt sich die Virusreplikation deutlich inhibieren. Eine vollständige Inhibierung der Virusreplikation kann durch die Blockierung des Golgiapparats mittels Brefeldin A erreicht werden, welcher für die virale RNA Synthese offensichtlich eine entscheidende Rolle spielt.

4. DISKUSSION

Über die Veränderungen des Zytoskeletts und dessen Bedeutung im Rahmen der CVB3-Infektion ist nur wenig bekannt, während die Interaktionen des Zytoskeletts mit verschiedenen anderen Viren wie dem Poliovirus (Lenk & Penman, 1978; Doedens et al., 1994), Herpesviren (Avitable et al., 1995) oder dem HIV (Sasaki et al., 1995; Pearce-Pratt et al., 1994) relativ gut untersucht sind.

Im Folgenden wird die Interaktion von CVB3 mit Zytoskelettanteilen der Zielzelle erläutert, die Rolle von Calcium bezüglich der Zytoskelettschädigung und die Bedeutung des Golgiapparats im Rahmen der CVB3-Replikation diskutiert und mit anderen Virusinfektionen verglichen. Ferner werden die Ergebnisse der *in vitro* Versuche im Hinblick auf deren Übertragbarkeit auf das *in vivo* Mausmodell der CVB3-Myokarditis diskutiert.

4.1. Zytoskelettveränderungen bei der Infektion mit CVB3 im Vergleich mit anderen Virusinfektionen

4.1.1. Intermediärfilamente

Bei der Untersuchung der Veränderungen der Intermediärfilamente im Rahmen der Infektion von HeLa-Zellen mit CVB3 zeigte sich sowohl im Keratin- wie auch im Vimentingerüst ein deutlicher Strukturverlust. Die regelhafte Ordnung des Keratingerüsts sowie auch des Vimentingerüsts war nach Infektion mit CVB3 nicht mehr zu erkennen, die Zelle stellte sich als verkleinertes, kugelförmiges Gebilde dar, welches sich deutlich von der uninfizierten, rautenförmigen HeLa-Zelle unterschied. Dieses Ergebnis entspricht Beobachtungen, die bei der Infektion mit Poliovirus, einem weiteren Vertreter aus der Gruppe der Picornaviren, gemacht wurden. Auch bei der Infektion mit Polioviren kommt es zu einem ausgeprägten Strukturverlust der Intermediärfilamente, welcher als Reorganisation des Zytoskeletts im Rahmen der Replikation beschrieben wurde. Desweiteren wurde aufgrund der Kolo-kalisation viraler Proteine mit den Intermediärfilamenten die Hypothese aufgestellt, dass diese Filamente einen Hauptort der viralen Proteinsynthese darstellen (Doedens et al., 1994).

Unsere Untersuchungen mit CVB3 bieten bezüglich der Kollokalisierung viraler Hüllproteine mit dem Zytoskelett ein anderes Bild. So konnte keine eindeutige Kollokalisierung viraler Proteine mit den Intermediärfilamenten der infizierten Zelle nachgewiesen werden, vielmehr fanden sich die viralen Hüllproteine homogen über die ganze Zelle verteilt.

Zur Klärung der Frage, ob die beobachtete Reorganisation der Intermediärfilamente bei der viralen Infektion ein spezifisches Phänomen der CVB3-Infektion darstellt, wurden die HeLa-Zellen anderen Stressoren ausgesetzt, wie z.B. einem osmotischen oder thermischen Reiz. Vergleicht man die Zytoskelettveränderungen der HeLa-Zellen unter unphysiologischen thermischen bzw. osmotischen Bedingungen mit den Veränderungen im Rahmen der CVB3-Infektion, so zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Organisation der Intermediärfilamente. Daraus lässt sich folgern, dass es sich bei den beobachteten Veränderungen nicht um einen Umbau der Intermediärfilamente im Rahmen der Virusreplikation, sondern vielmehr um streßspezifische Reaktionen handelt, die im Verlauf der Infektion auftreten.

Die Abhängigkeit der Replikationsrate von CVB3 von den Intermediärfilamenten der infizierten Zelle wurde am Beispiel des Vimentins untersucht. Hierzu wurden HeLa-Zellen unter der Zugabe von Nocodazol, einer Substanz, welche die Organisation des Vimentingerüsts zerstört, ohne jedoch den Zelltod zu bewirken, mit CVB3 infiziert. In der *in situ* Hybridisierung konnte keine Abnahme der viralen RNA Synthese nachgewiesen werden und in der Immunfluoreszenz ließ sich keine Abnahme der Expression viraler Hüllproteine belegen. Demzufolge zeigte auch die mittels Plaque-Test ermittelte Wachstumskurve keine Abnahme der Synthese infektiöser Viruspartikel.

Zur Untersuchung der Abhängigkeit der Virusaufnahme von den Intermediärfilamenten wurde das Vimentingerüst der HeLa-Zellen vor Infektion mit CVB3 mittels Nocodazol zerstört. Auch hier zeigte sich keine Inhibition der viralen Replikation in den obengenannten Untersuchungsverfahren. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass ein intaktes Vimentingerüst weder für die Aufnahme noch für die CVB3-Replikation von entscheidender Bedeutung ist. Diese Ergebnisse wiederum entsprechen Beobachtungen bei der Infektion mit Poliovirus. Obwohl für dieses Virus eine Reorganisation der Intermediärfilamente beschrieben ist, zeigt Nocodazol keinen Effekt auf die Replikationsrate von Poliovirus (Doedens et al., 1994).

Nicht alle Vertreter der Klasse der Picornaviren sind hinsichtlich ihrer Replikation

unabhängig von den Intermediärfilamenten. So konnte bei dem neurotrophen murinen Theiler's Enzephalomyelitis Virus, welches wie CVB3 und Poliovirus zur Familie der Picornaviren gehört, im Verlauf seiner Replikation in BHK-21-Zellen eine Bindung von Virionen an zwei 60kDa-Proteine, die als Vimentin und Desmin identifiziert werden konnten, nachgewiesen werden (Nedellec et al., 1998). Untersucht wurde die Interaktion zwischen zwei Stämmen des Theiler's-Virus, GDV2 und DA, und den Zytoskelettproteinen der infizierten Zelle. Es konnte gezeigt werden, dass Anti-Vimentin- und Anti-Desmin-Antikörper an GDV2 und DA-Virionen binden, die aus BHK-21-Zell-Extrakten gewonnen worden. Zusätzlich wurde die Lokalisation der viralen Proteine und des Desmins bzw. Vimentins mittels konfokaler Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht. Hierbei fand sich in Folge der Infektion eine muschelartige Anordnung der Intermediärfilamente, die einen Einschluß viraler Partikel aufwies. Eine enge räumliche Assoziation von GDV2-Viruspartikeln und 10nm dicken Intermediärfilamenten konnte auch elektronenmikroskopisch gezeigt werden (Nedellec et al., 1998). Dem Vimentingerüst wird demzufolge eine wichtige Rolle bei der Replikation des Theiler's Virus zugeschrieben.

4.1.2. α -Tubulin

Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, verändert sich auch die Struktur der Mikrotubuli im Verlauf der CVB3-Infektion. Das in uninfizierten Zellen sich als äußerst feines Geflecht repräsentierende α -Tubulin verdichtet sich bei der CVB3-Infektion zu einer strukturlosen Masse. Versuche, bei denen die Zelle anderen schädlichen Reizen, wie Hitze oder osmotischer Stress, ausgesetzt wurde, zeigten jedoch, dass es sich auch bei diesen Veränderungen analog zu den Veränderungen der Intermediärfilamente wohl um stressinduzierte Reaktionen der HeLa-Zellen handelt und nicht um eine Restrukturierung der Mikrotubuli im Rahmen der CVB3-Replikation.

Der Einsatz von Taxol, einem in der Onkologie eingesetztem Agens, welches die Mikrotubuli stabilisiert, zeigte keine inhibierende Wirkung auf die Replikation von CVB3. Unter Taxoleinfluss ließ sich ebenfalls keine Inhibition der Synthese viraler RNA noch der viralen Hüllproteine noch des Virustiters nachweisen. Auch die Inkubation mit Taxol vor Infektion zur Überprüfung der Abhängigkeit der Virusaufnahme von Mikrotubuli in die permissive Zelle führte zu keiner Inhibition der Virusreplikation. Bei der Infektion von BHK- und Vero-Zellen mit Herpes simplex

Virus Typ 1 (HSV-1) hingegen kommt es zu einer grundlegenden Reorganisation der Mikrotubulstruktur der infizierten Zelle, welche aus einer Fragmentation und anschließenden Neuordnung der Filamente besteht. Das Mikrofilamentgerüst hingegen bleibt während der Infektion mit HSV-1 intakt. Durch die Zugabe von Taxol während der HSV-1-Infektion lässt sich die Fragmentation der Mikrotubuli verhindern und das Mikrotubuligerüst gleicht auch nach der Infektion dem uninfizierter Zellen (Avitabile et al., 1995).

Im Gegensatz zu unseren Befunden bei CVB3 führt z.B. beim Junin-Virus eine Zerstörung der Mikrotubuliordnung zu einer Reduktion der Virusproduktion. So konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit Nocodazol, das neben seinem Effekt auf das Vimentingerüst auch die Mikrotubuli depolymerisiert, eine deutliche Abnahme der Virusproduktion bei der Infektion von Vero-Zellen mit dem Junin-Virus zur Folge hatte (Candurra et al., 1999).

Zusammenfassend zeigen unsere Ergebnisse, dass sowohl die Aufnahme als auch die Replikation von CVB3 unabhängig von einem intakten zellulären Intermediärfilament- oder Mikrotubulisystem ist.

4.1.3. Mikrofilamente

Das F-Aktingerüst von HeLa-Zellen zeigt nach Infektion mit CVB3 sehr charakteristische Veränderungen. Auffällig ist der vollkommene Zusammenbruch der des F-Aktinskeletts, das sich nach der Infektion mit CVB3 fragmentiert und an den Zellrändern verklumpt darstellt. Vergleicht man dieses Bild mit dem F-Aktingerüst von HeLa-Zellen, die unter osmotischen oder thermischen Stress gesetzt wurden, so zeigt sich, dass diese typische Fragmentierung nur unter Infektion mit CVB3 auftritt und durch die anderen untersuchten Reize auf die Zelle nicht zu provozieren ist. Diese Virus-induzierten Veränderungen unterscheiden sich somit deutlich von der als Stressreaktion interpretierten strukturellen Reorganisation der Intermediärfilamente und der Mikrotubuli.

Änderungen der F-Aktinstruktur sind ein häufig beschriebenes Phänomen bei viralen Infektion. Bei der Infektion mit dem *Autographa californica polyhidrosis* Virus kommt es bereits im Rahmen der Virusaufnahme 30 min pi zur Bildung von spezifischen F-Aktinsträngen (Charlton & Volkmann, 1993). Diese Strangbildung wird durch die frühe Expression des viralen Genes arif-1 ausgelöst (Roncarati & Knebel-Mörsdorf,

1997). Das Rabiesvirus dagegen löst in der späten Phase der Infektion eine deutliche Signalabnahme von F-Aktin aus, wie unter Verwendung der konfokalen Laserscanmikroskopie beschrieben wurde (Ceccaldi et al., 1997).

Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, beginnen die Veränderungen in der F-Aktinorganisation bei der CVB3-Infektion nach 2,5-3 h pi sichtbar zu werden und resultieren in einer vollkommenen Fragmentierung und Verklumpung der Aktinfilamente am Zellrand 4-6 h pi. Aus der zeitlichen Korrelation des Infektionszyklus mit den Änderungen der Aktinstruktur kann gefolgert werden, dass es sich nicht um Veränderungen im Rahmen der Virusaufnahme in die Zielzelle, sondern vielmehr um ein Geschehen im Rahmen der Virusreplikation handeln muß. Zur näheren Untersuchung der Rolle des Aktingerüsts im Rahmen der viralen Replikation wurden die HeLa-Zellen unter Zugabe von Cytochalasin D, einer Substanz, welche unmittelbar die Aktinorganisation der Zelle zerstört, kultiviert. Hierbei fand sich eine Abnahme des Virustiters in der Wachstumskurve um 1-1,5 log-Stufen im Vergleich zur Wachstumskurve ohne Cytochalasin D-Zugabe. In der Immunfluoreszenzmikroskopie zeigte sich unter Zugabe von Cytochalasin D in den infizierten Zellen zwar eine Fragmentierung des Aktingerüsts, die typische CVB3-induzierte Verklumpung am Zellrand blieb jedoch aus. Eine Inkubation mit Cytochalasin D vor Infektion erbrachte keine stärkere Inhibition der viralen Replikation, ein Hinweis darauf, dass das Aktingerüst nicht für die Virusaufnahme in die permissive Zelle bedeutsam ist, wie es z.B. vom murinen ekotropen Leukämievirus bekannt ist. Die Aufnahme dieses Virus lässt sich durch eine Zerstörung des Aktingerüsts vor Infektion signifikant senken (Kizhatil & Albritton, 1997). Auch Untersuchungen an HIV-infizierten Zellen zeigten, dass eine Inkubation von peripheren mononukleären Zellen mit Cytochalasin D die Aufnahme von HIV in diese Zellen und somit deren Infektion verhindert. Diese Inhibition wird offensichtlich über eine Störung aktinabhängiger Korezeptoren, welche für die Virusaufnahme von Bedeutung sind, erreicht (Iyengar et al., 1998). Hingegen zeigt das „Black Creek Canal Virus“, ein Vertreter der Hantaviren, eine Abhängigkeit der Virusausschleusung vom Aktingerüst. Eine Inkubation von Vero-Zellen mit Cytochalasin D während der Infektion führt zu einer Abnahme der freigesetzten viralen Partikel um 94%. Dagegen erbrachte die Inkubation mit Cytochalasin D vor Infektion keinen weiteren inhibierenden Effekt auf die Virusreplikation. Auch konnte für dieses Virus eine Kolokalisation des viralen Nukleokapsidproteins N mit den aktinhaltigen

Mikrofilamenten nachgewiesen werden (Ravkov et al., 1998).

Von Cytochalasin D ist bekannt, dass es nicht nur die F-Aktinstruktur zerstört, sondern auch mRNA vom Zytoskelett ablöst, ohne sie in ihrer Translationsfähigkeit zu verändern, wobei diese Ablösung einen reversiblen Prozess darstellt (Ornelles et al., 1986). Die zytoskelettabhängige Translation ist ein im Zellzyklus häufig genutzter Weg der Proteinsynthese, wobei den aktinhaltigen Mikrofilamenten eine Verankerungsfunktion für die mRNA zugesprochen wird (Yisraeli et al., 1990). Dieser aktinabhängige Translationsweg ist bei der Infektion durch das humane Parainfluenzavirus Typ 3 (HPIV3), einem Vertreter der Gruppe der Paramyxoviren, bekannt. HPIV3 benötigt Aktin zur mRNA-Synthese sowie auch für die Translation seiner mRNA. Durch Inkubation der infizierten Zellen mit Cytochalasin D lässt sich eine Inhibierung der viralen RNA Synthese erreichen, so dass geschlossen werden kann, dass dem Aktingerüst eine wichtige Rolle in der Replikation von HPIV3 zukommt (Gupta et al., 1998; De & Banerjee, 1999).

Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde ließ sich in der Immunfluoreszenzmikroskopie bei der Infektion mit CVB3 erst ein Zusammenbruch des Aktingerüsts und nachfolgend eine Verklumpung der Aktinfragmente an den Zellrändern darstellen. Unter der Annahme, dass das Aktingerüst als Ort der CVB3-Replikation genutzt wird, wie unsere Untersuchungen mittels Cytochalasin D implizieren, könnte die Konzentrierung der Aktinfilamente am Zellrand zur Ausbreitung des Virus durch direkte Infektion von Nachbarzellen dienen. Unterstützt wird diese Hypothese durch die Untersuchungen von Klingel et al., (1998), in denen durch elektronenmikroskopische *in situ* Hybridisierung gezeigt wurde, dass CVB3 bei der akuten Infektion mit Filamenten des Zytoskeletts assoziiert ist und hierdurch eine Ausbreitung direkt von Zelle zu Zelle erreicht („cell-to-cell spread“). Eine interzelluläre Virusausbreitung unter Einbeziehung des Zytoskeletts ist auch von anderen Viren wie z.B. dem HTLV-1 bekannt (Igakura et al., 2003). Eine Beteiligung des F-Aktins wird auch für die direkte Zell-zu-Zell-Ausbreitung von HIV angenommen und als ein wichtiger Grund für eine Infektion des menschlichen Organismus über die Schleimhäute diskutiert. (Pearce-Pratt et al., 1994).

Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass ein intaktes Mikrofilamentsystem, bzw. dessen virusspezifische Veränderungen die CVB3-Replikation fördert, nicht aber für dessen Aufnahme in die permissive Zelle relevant ist. Aufgrund des zeitlichen Verlaufes der Schädigung des Aktingerüsts, welche ca. 3 h pi manifest wird, liegt die Vermutung nahe, dass die Mikrofilamente im Rahmen der viralen Proteinsynthese zerstört werden. Als Ursache für den Zusammenbruch des Aktingerüsts im Rahmen der CVB3-Infektion dürfte die virale Proteinase 2A eine entscheidende Rolle spielen. Wie Badorff et al. (1999) zeigen konnten, schneidet die virale Proteinase 2A im Rahmen der Infektion das zelluläre Molekül Dystrophin. Die N-terminale Domäne des Dystrophins wie auch die „Rod“- Domäne binden an Aktin, so dass die virale Proteinase 2A-Aktivität vermutlich die beiden aktinbindenden Domänen von der β -Dystroglycan-bindenden Domäne trennt und so den Zusammenbruch des Aktingerüsts induziert. Hierbei wird angenommen, dass diese Trennung einer Konformationsänderung im Aktingerüst vorausgeht. Ferner wird von Badorff et al., 1999 postuliert, dass durch den Zusammenbruch des Dystrophinskelettes das gesamte Zytoskelett der infizierten Zelle reorganisiert wird und hierdurch die Virusausbreitung fördert (Badorff et al., 1999; Badorff et al. 2000).

Eine Zerstörung der Dystrophinordnung im Rahmen der viralen Infektion könnte im Zusammenhang mit der Pathogenese der postinfektiösen Kardiomyopathie stehen. Im Mausmodell der CVB3-Myokarditis konnte gezeigt werden, dass der Dystrophin-Glykoprotein-Komplex in infizierten Myozyten zerstört wird (Xiong et al., 2002). Auch konnte in einem humanen Herzpräparat eines Patienten, bei dem sich in Folge einer CVB2-Myokarditis eine dilatative Kardiomyopathie entwickelt hat, ein Untergang vom Myozyten beobachtet werden. Im Bereich dieser nekrotischen Myozyten konnte das virale Hüllprotein VP1 nachgewiesen werden. Des Weiteren fand sich in diesen Bereichen eine Zerstörung der Dystrophinordnung (Badorff & Knowlton, 2004). Auf die Bedeutung von Störungen in der Struktur des Dystrophins für die Entstehung einer Kardiomyopathie weisen auch Befunde bei hereditären Kardiomyopathieformen hin, bei denen genetische Dystrophindefekte beschrieben wurden (Berko et al., 1989).

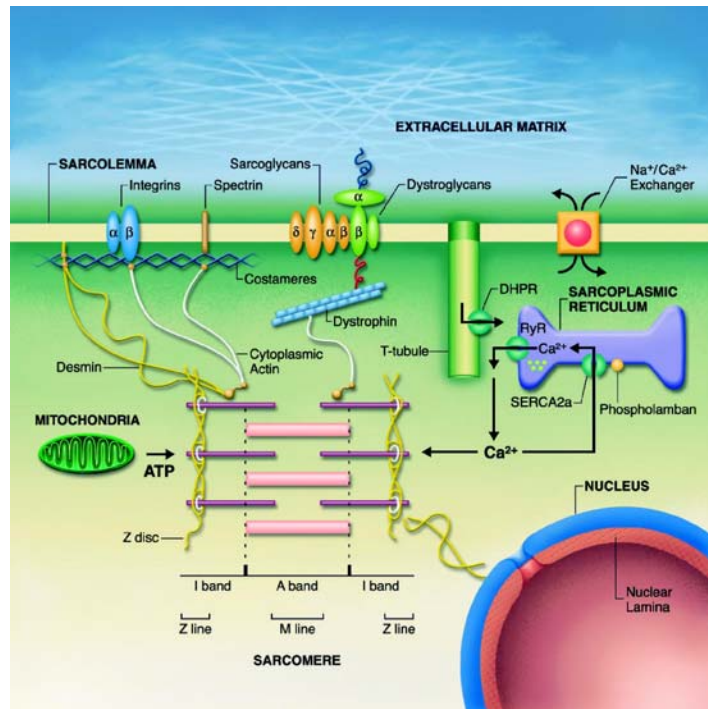


Abb. 29: Schematische Darstellung der Interaktion myozytärer Zytoskelettproteine mit dem Zellkern, dem Sarkolemm und der extrazellulären Matrix (Fatkin & Graham, 2002).

4.2. Einfluß von Calcium auf die Zerstörung der Mikrofilamente bei der CVB3-Infektion

Calciumionen spielen in der eukaryonten Zelle eine wichtige regulatorische Rolle bei der Organisation des Aktingerüsts. Diese Regulation wird über die Bindung von Tropomyosin und dem calciumabhängigen Caldesmon vermittelt, welche zur Stabilisierung der Aktinfilamente dienen (Shariff & Luna, 1992; Shariff et al., 1993).

Der Einstrom von Calciumionen kann im Rahmen von Infektionen zu zytopathischen Effekten führen. Clostridium difficile (Cl. difficile), der Erreger der in Folge von Breitbandantibiotikabehandlung auftretenden pseudomembranösen Colitis, ist ein Bakterium, dessen schädigende Wirkung auf Zellen zum großen Teil durch Toxine vermittelt wird. Für das Toxin B des Clostridium difficile wurde nachgewiesen, dass es einen Calciumeinstrom in die Zelle auslöst, der wiederum die Zerstörung des Aktingerüsts der betroffenen Zelle einleitet (Gilbert et al., 1995). Aber auch bei viralen Infektionen sind einströmende Calciumionen in die infizierte Zelle als Auslöser zytopathischer Effekte bekannt. Infiziert man Zellen mit Rotavirus unter calciumfreien Bedingungen, so bleibt der sonst beobachtete zytopathische Effekt aus (Michelangeli

et al., 1991).

Veränderungen der intrazellulären Calciumkonzentration werden häufig im Rahmen viraler Infektionen beobachtet. Das Poliovirus induziert 2 bis 3 h pi einen Anstieg der Calciumkonzentration der infizierten Zelle, so dass die virale Translation 6 h pi unter drastisch veränderten Calciumbedingungen stattfindet. Blockiert man die virale RNA-Synthese, so bleibt dieser Calciumanstieg aus (Irurzun et al., 1995).

Der Einstrom von Calciumionen in die infizierte Zelle wurde auch im Verlauf der CVB3-Infektion von van Kuppeveld et al., (1997) beschrieben. Etwa 2 h pi steigt der Calciumgehalt der Zelle an, wobei der Anstieg sein Maximum zwischen 6 und 14 h pi erreicht. Korreliert man den Calciumgehalt der Zellen mit dem Schweregrad des zytopathischen Effektes, so zeigen jene Zellen, welche die höchste Calciumkonzentration haben, die schwersten Schädigungen. Das virale Protein 2B von CVB3 gilt als Promotor für den Calciumeinstrom in die infizierte Zelle. Es wird angenommen, dass die erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration über eine verstärkte Membranpermeabilität die Ausschleusung neu gebildeter viraler Partikel begünstigt (van Kuppeveld et al., 1997).

Zur Untersuchung der Rolle des Calciums für die beschriebene Desorganisation der Aktinstruktur während der CVB3-Infektion wurden die HeLa-Zellen zum einem unter Zugabe des Calciumantagonisten Verapamil, zum anderen unter calciumfreien Bedingungen infiziert. Verapamil ist ein in der Kardiologie gebräuchlicher Calciumantagonist, welcher die L-Ionenkanäle für Calcium blockiert. Durch Zugabe von Verapamil konnte weder der zytopathische Effekt hinsichtlich der Zerstörung der Mikrofilamente verhindert werden, noch konnte eine Abnahme der Virusreplikation festgestellt werden. Somit kann davon ausgegangen werden, dass der Calciumeinstrom über die L-Calciumkanäle nicht die Ursache der beobachteten Mikrofilamentveränderungen bei der CVB3-Infektion ist. Im Vergleich dazu konnte gezeigt werden, dass durch Verapamil die Replikationsrate des Influenzavirus Typ A gesenkt wird (Nugent & Shanley, 1984). Auch die Replikationsrate von Vaccinia- bzw. Masernviren konnte durch Verapamil um 97% bzw. 76% gesenkt werden (Shainkin-Kestenbaum, 1993).

Zur weiteren Klärung der Rolle von Calcium hinsichtlich seiner zytotoxischen Bedeutung wurden die HeLa-Zellen unter calciumfreien Bedingungen infiziert. Vor und während der CVB3-Infektion wurden die Zellen in einem calciumfreien Medium gehalten und die zellinternen Calciumspeicher des endoplasmatischen

Retikulums durch Zugabe von Thapsigargin entleert. Unter diesen Bedingungen fand sich bei der CVB3-Infektion weiterhin der beschriebene Zusammenbruch der Mikrofilamente, die Fragmentierung des Aktingerüsts trat in gleichem Maß auf wie in calciumhaltigem Medium. Der von van Kuppeveld et al., (1997) beschriebene Calciueinstrom ist somit nicht als ursächlich für den in dieser Arbeit beschriebenen zytopathischen Effekt anzusehen. Im Vergleich dazu konnte für Rotavirus, einem der wichtigsten Gastroenteritiserreger im Kleinkindesalter gezeigt werden, dass der Calciueinstrom mit Veränderungen des Aktins in den Mikrovilli assoziiert ist und eine wichtige Rolle im Infektionszyklus der Rotaviren spielt (Brunet et al., 2000a,b).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Calcium weder für den beschriebenen zytopathischen Effekt ursächlich ist, noch beeinflussen Veränderungen der Calciumkonzentration in der Wirtszelle die Replikationsrate von CVB3.

4.3. Interaktion von CVB3 mit dem Zytoskelett von Myozyten

CVB3 stellt einen kardiotropen Vertreter der Enteroviren dar, welcher als wichtigster Erreger viraler Herzerkrankungen, insbesondere der viralen Myokarditis, gilt (Kandolf & Hofschneider, 1989). Zur Klärung der Frage, ob sich der in den letzten Kapiteln beschriebene Zusammenbruch des Aktingerüsts nicht nur an HeLa-Zellen, sondern auch in infizierten Myozyten beobachten lässt, wurden primäre Rattenmyozyten kultiviert und mit CVB3 infiziert. Auch in Rattenmyozyten konnte gezeigt werden, dass die CVB3-Replikation mit einer massiven Störung der Aktinorganisation einhergeht. Zur Untersuchung der Fragestellung, ob die *in vitro* beobachteten Veränderungen des Aktingerüsts auch bei einer CVB3-Infektion *in vivo* auftreten, wurden ABY/SnJ-Mäuse (Klingel et al., 1992) mit CVB3 infiziert und die Herzen 4 d pi untersucht. Aus den Befunden, dass sich 4 d pi sich im Herzmuskel noch keine zellulären Entzündungszellinfiltrate nachweisen lassen, kann geschlossen werden, dass eine potenziell auftretende Zytotoxizität in Myozyten bei der Infektion nicht durch die reaktive Immunantwort, z.B. durch CD8⁺T-Zellen, bedingt sein. Andererseits sind die Myozyten 4 d pi aber bereits infiziert und virale RNA bzw. virale Proteine lassen sich mittels *in situ* Hybridisierung bzw. durch Immunfluoreszenz nachweisen, so dass die zu diesem Zeitpunkt vorhandene Zytotoxizität durch die

Virusreplikation bedingt sein muß.

Bei der Untersuchung der murinen Herzpräparate fanden sich Areale, in denen die Struktur des Aktins nicht mehr erkennbar war, in welchen sich aber in der immunhistochemischen Doppelmarkierung virale Polymerase nachweisen ließ. Wir konnten zeigen, dass es sich bei den zerstörten Arealen um infizierte Myozyten handelt, da in Folgeschnitten in diesen Arealen Desmin nachweisbar war, ein Intermediärfilament vom Typ 2, welches sich primär in Muskelzellen findet (Alberts et al., 1994).

Die beschriebenen Veränderungen der CVB3-infizierten Rattenmyozyten als auch der murinen Myozyten *in vivo* sind insofern von großer Bedeutung, als bekannt ist, dass CVB3 als kardiotropes Virus in besonderem Maße Myozyten infiziert. Beim Menschen kann sowohl im akuten Stadium der Infektion wie auch in der Phase der persistierenden Infektion der Herzmuskel irreversibel geschädigt werden. Der Viruspersistenz wird hierbei eine wichtige ätiopathogenetische Rolle bei der Entstehung der dilatativen Kardiomyopathie zugeschrieben (Kandolf et al., 1993; Kandolf, 1998). Der genaue Mechanismus, welcher nach einer Virusinfektion zur dilatativen Kardiomyopathie führt, ist bis heute nicht vollständig geklärt. Zum einen wird die Erkrankung als Reaktion des Immunsystems im Sinne einer Autoimmunreaktion diskutiert (Huber et al., 1998). Es wurde gezeigt, dass bei der Infektion von Mäusen mit CVB3 bereits 7 d pi Antikörper gegen Herzmuskelgewebe auftreten. Hierbei konnten IgG-Antikörper gegen die schwere Kette des Myosins sowie gegen Tropomyosin und Aktin gefunden werden (Latif et al., 1999). Zum anderen wird als schädigender Mechanismus die direkte Zytopathogenität durch CVB3 diskutiert (Chow et al., 1991; Klingel et al., 1998).

CVB3 Δ VP0 cDNA ist eine replikationsrestringierte CVB3 cDNA-Mutante, bei der die Bildung infektiöser Viruspartikel verhindert wird, aber eine Expression viraler Proteine auf niedrigem Niveau aufrechterhalten wird. Transfiziert man CVB3 Δ VP0 cDNA in kultivierte Rattenmyozyten, so läßt sich trotz Abwesenheit infektiöser Partikel ein zytopathischer Effekt in den transfizierten Zellen beobachten (Wessely et al., 1998a). Die herzmuskelspezifische Expression von CVB3 Δ VP0 cDNA in transgenen Mäusen schließlich führt zur Entwicklung einer dilatativen Kardiomyopathie innerhalb des ersten Lebensjahres der Tiere. Die Präsenz infektiöser Viren ist zur Induktion der dilatativen Kardiomyopathie im Mausmodell offensichtlich nicht notwendig, sondern es reicht hier die Produktion viraler Proteine auf niedriger Ebene aus (Wessely et al.,

1998b). Insbesondere die Expression der viralen Proteinase 2A könnte hierbei eine entscheidende Rolle spielen, da über sie ein Zusammenbruch des Dystrophin-Glykoprotein-Komplexes induziert wird und dadurch in der Entstehung der dilatativen Kardiomyopathie relevant sein könnte (Badorff & Knowlton, 2004). Der Zusammenbruch des Dystrophin-Glykoprotein-Komplexes könnte auch den von uns bei der CVB3-Infektion beobachteten Zusammenbruch des Aktingerüsts erklären, da Aktin über Dystrophin mit membranständigen Glykoproteinen verbunden ist (Fatkin & Graham, 2002). Interessanterweise ist die Virusreplikation im Herzmuskel verstärkt und die Entwicklung der Kardiomyopathie beschleunigt, wenn Dystrophin-defiziente Mäuse mit CVB3 infiziert werden, als Hinweis dafür, dass eine Dystrophindefizienz für eine Enterovirus-induzierte Kardiomyopathie prädisponierend wirkt (Xiong et al., 2002).

Aktin ist als kontraktiles Protein ein wichtiger Bestandteil der kardialen Myozyten. Bei der Untersuchung von Herzmuskelgewebe, das von Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie gewonnen wurde, konnte eine Abnahme des Aktin Gehaltes der Myozyten gezeigt werden (Hein et al., 2000). Hieraus lässt sich ersehen, dass das Aktin als Strukturprotein des Herzens und dessen potentielle Schädigung durch ein virales Agens eine pathogenetisch wichtige Rolle bei der Entstehung einer dilatativen Kardiomyopathie spielen könnte.

Zusammenfassend kann gefolgert werden, dass CVB3 über eine Zerstörung des Aktingerüsts einen direkten zytopathischen Effekt auf die infizierte Zelle ausübt und somit bei der Induktion der dilatativen Kardiomyopathie als Komplikation der enteroviralen Myokarditis bedeutsam ist.

4.4. Die Rolle des Golgiapparates im Rahmen der CVB3-Replikation

Im Rahmen der Infektion von Vero-Zellen mit Poliovirus kommt es zu einem vollständigen Zusammenbruch des Golgikomplexes der Zielzelle (Sandoval et al., 1997). Wichtige Schritte hierbei sind die Zerstörung des cis-Golgi-Netzwerkes, welches in Fragmente aufgespalten wird, die Freisetzung des an den Golgikomplex gebundenen und für den Membrantransport relevanten Proteins β -COP sowie der Zusammenbruch der Golgizisternen. Bei der Poliovirusinfektion konnte gezeigt werden, dass eine transiente Expression des viralen Proteins 2B in COS-7-Zellen zu

einer Zerstörung des Golgikomplexes führt (Sandoval et al., 1997).

Brefeldin A, ein Metabolit, der aus Pilzen gewonnen wird und den Transport von Vesikeln zwischen Golgiapparat und endoplasmatischem Retikulum blockiert und die Anordnung der Golgiproteine zerstört, inhibiert die RNA Synthese von Poliovirus und somit die Synthese viraler Partikel überaus effizient (Doedens et al., 1994). Als möglicher Mechanismus der Inhibierung wurde die Blockade der GTP-abhängigen Synthese sekretorischer Transportvesikel diskutiert, welche in der RNA Synthese im Rahmen der Replikation von Poliovirus eine wichtige Rolle spielen könnte (Cuconati et al., 1998). Für das humane Cytomegalievirus (HCMV) konnte ebenfalls gezeigt werden, dass eine Zugabe von Brefeldin A im frühen Infektionszyklus die Synthese von HCMV DNA inhibiert (Eggers et al., 1992).

Auch im Rahmen der CVB3-Infektion zeigte sich unter Zugabe von Brefeldin A zu Beginn der Infektion eine vollständige Inhibition der Virusreplikation. In der Immunfluoreszenzmikroskopie ließ sich kein virales Protein nachweisen und in der Ein-Schritt-Wachstumskurve konnte kein Anstieg der viralen Titer im Vergleich zum Ausgangswert verzeichnet werden. Auch das Zytoskelett zeigte in Anwesenheit des Brefeldin A keine Schädigung durch CVB3. Gibt man Brefeldin A erst 2,5 h nach Beginn der Inkubationszeit dem Kulturmedium zu, einem Zeitpunkt, zu dem sich initial noch keine zytopathischen Effekte am Zytoskelett zeigen, so lässt sich 5 h pi sowohl virale RNA wie auch virale Proteine nachweisen, zudem finden sich die typischen CVB3-induzierten Zytoskelettveränderungen. Zusammenfassend kann geschlossen werden, dass Brefeldin A die Replikation von CVB3 vollständig inhibieren kann, ein Befund, der nahelegt, dass CVB3 entsprechend dem Poliovirus den Golgikomplex im Rahmen seiner RNA Synthese nutzt.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Das Coxsackievirus B3 (CVB3) ist ein kardiotropes Enterovirus aus der Familie der Picornaviren. Es gilt als wichtigster Erreger viraler Herzerkrankungen, insbesondere der viralen Myokarditis. Besonders bei Säuglingen ist die Virusmyokarditis mit einer sehr hohen Letalitätsrate von über 50% behaftet. Wird die akute Erkrankung überstanden, besteht die Möglichkeit der Entstehung einer chronischen Myokarditis. Dieser chronische Verlauf kann über bisher nicht vollständig geklärte Mechanismen zum klinischen Bild einer dilatativen Kardiomyopathie (DCM) und einer folgenden Herzinsuffizienz führen.

Von vielen Viren ist bekannt, dass das Zytoskelett der infizierten Zelle im Rahmen der viralen Replikation in seiner Struktur grundlegend verändert wird. Beispielsweise kommt es während der Infektion von HeLa-Zellen mit Poliovirus, einem weiteren Mitglied der Familie der Picornaviren, zu grundlegenden Veränderungen des Zytoskeletts. Es gibt Hinweise dafür, dass bei der Poliovirusinfektion das Zytoskelett modifiziert wird und ein grundlegendes zelluläres Kompartiment der Virusreplikation darstellt. Im Gegensatz zu Poliovirus ist über die Interaktion von CVB3 mit dem Zytoskelett der permissiven Zielzelle bislang nur sehr wenig bekannt.

Das Ziel dieser Arbeit war es, einen Beitrag zum Verständnis der Virus-Wirt-Interaktion unter besonderer Berücksichtigung des Zytoskeletts bei der CVB3-Infektion zu leisten.

Anhand CVB3-infizierter HeLa-Zellen konnten folgende Befunde erhoben werden:

- Die Intermediärfilamente Keratin und Vimentin zeigen nach Infektion keine geordnete Struktur mehr, sondern eine Verklumpung im Bereich der Zellmitte.
- Das im uninfizierten Zustand sehr feine α -Tubulingerüst der HeLa-Zellen verdichtet sich im Verlauf der Infektion mit CVB3 zu einer homogenen Masse.
- Das F-Aktingerüst erfährt bei der CVB3-Infektion die eindrucksvollste Veränderung. Die infizierten HeLa-Zellen erscheinen im Zellinneren bis auf wenige Filamentbündel ausgehöhlt, das F-Aktingerüst wird völlig fragmentiert und findet sich verklumpt am Zellrand wieder.

Untersucht man diese Zytoskelettveränderungen hinsichtlich ihrer Spezifität für die Virusinfektion, so zeigt sich, dass nur der Zusammenbruch des F-Aktingerüsts ein spezifisches Phänomen im Rahmen der Virusreplikation darstellt, während die

Veränderungen der Organisation des Keratins, Vimentins und α -Tubulins vielmehr als virusinduzierte Stressreaktionen der Zelle anzusehen sind, welche sich in ähnlicher Form auch nach Behandlung der Zellen mit thermischen oder chemischen Reizen induzieren lassen.

Bezüglich des zeitlichen Verlaufes der F-Aktinschädigung findet man den Zusammenbruch des F-Aktingerüsts erst 2 bis 3 Stunden pi, einem Zeitraum, der mit der Synthese viraler Proteine korreliert. Wie durch *in situ* Hybridisierung, einem Verfahren zur Darstellung viraler RNA, gezeigt wurde, geht die Synthese viraler RNA derjenigen der Proteinsynthese um ca. 1 Stunde voraus, da bereits 2 Stunden pi große Mengen neu synthetisierter viraler RNA nachzuweisen sind. Da zu diesem Zeitpunkt noch annähernd keine Desorganisation des Zytoskeletts zu beobachten ist, kann davon ausgegangen werden, dass das F-Aktingerüst weder bei der Virusaufnahme noch bei der Synthese viraler RNA, sondern vielmehr im Rahmen der viralen Proteinsynthese geschädigt wird. Unterstützt wird diese Beobachtung durch Untersuchungen von Badorff et al., die zeigen konnten, dass die virale Proteinase 2A von CVB3 das zelluläre Dystrophin spaltet und vermutlich hierdurch den Zusammenbruch des Aktingerüsts induziert.

Zur Übertragung der anhand CVB3-infizierter HeLa-Zellen beobachteten Veränderungen des F-Aktins auf das *in vivo* Modell der CVB3-Myokarditis wurden zunächst Untersuchungen an kultivierten Rattenmyozyten vorgenommen, da CVB3 im Herzmuskel vornehmlich Myozyten infiziert. Auch hier konnte ein Zusammenbruch des F-Aktingerüsts nach CVB3-Infektion gezeigt werden. In weiterführenden Untersuchungen anhand des Mausmodells der CVB3-induzierten Myokarditis der ABY/SnJ-Maus konnten wir 4 Tage pi deutlich aktinreduzierte Bezirke als infizierte Myozyten im Myokard der Tiere identifizieren. Die in der Zellkultur gezeigten F-Aktin-Strukturveränderungen können somit auch auf das *in vivo* Mausmodell der CVB3-induzierten Myokarditis übertragen werden.

Zur Überprüfung der Abhängigkeit der viralen Replikation vom Zytoskelett der infizierten Zielzelle wurden einzelne Zytoskelettanteile durch verschiedene Substanzen spezifisch zerstört und die Effizienz der viralen Replikation mittels *in situ* Hybridisierung, Immunfluoreszenzmikroskopie sowie durch Ein-Schritt-Wachstumskurven überprüft. Infolge der gezielten Zerstörung des F-Aktingerüsts durch Cytochalasin D konnte ein verzögerter Titeranstieg sowie ein erniedrigter Virustiter in der Ein-Schritt-Wachstumskurve nachgewiesen werden. Die Zerstörung des Keratin-,

Vimentin- oder α -Tubulingerüsts hingegen hatte keinen nachweisbaren Einfluss auf die Virusreplikation.

Der Einstrom von Calciumionen in die Zelle im Rahmen von Infektionen kann zum zytopathischen Effekt beitragen, wie dies z.B. von *Clostridium difficile* oder Rotavirus bekannt ist. Ein Anstieg der Calciumkonzentration der infizierten Wirtszelle kann auch bei der Infektion mit Poliovirus und CVB3 zwei bis drei Stunden pi beobachtet werden. Inwieweit ein Calciumeinstrom in die Zelle oder eine Entleerung der intrazellulären Calciumspeicher den viralen zytopathischen Effekt induziert, wurde zum einen durch Infektion unter calciumfreien Bedingungen mit und ohne vorherigen Entleerung der intrazellulären Calciumspeicher durch Thapsigargin und zum anderen durch Blockade der L-Calciumkanäle durch Verapamil überprüft. Unter keiner dieser Untersuchungsbedingungen konnte der Zusammenbruch des F-Aktingerüsts verhindert werden. Somit ist weder ein Calciumeinstrom in die infizierte Zelle noch eine Entleerung der intrazellulären Calciumspeicher im Rahmen der Infektion als ursächlich für den Zusammenbruch des F-Aktins anzunehmen.

In weiteren Untersuchungen wurde die Abhängigkeit der CVB3-Replikation vom Golgiapparat der Zielzelle überprüft. Hierzu wurde die Funktion des Golgiapparates mittels Brefeldin A blockiert. Unter Brefeldin A Zugabe kommt es zu einer vollständigen Inhibierung der Synthese viraler RNA, es ließ sich kein virales Protein nachweisen und auch die Schädigung des Zytoskeletts blieb aus. Gibt man Brefeldin A erst 2.5 Stunden pi dem Medium zu, so ist keine Inhibierung der Synthese viraler RNA mehr zu beobachten und auch die Aktinschädigung ist vergleichbar mit derjenigen bei CVB3-Infektion ohne Zugabe von Brefeldin A.

Zusammenfassend kann geschlossen werden, dass bei der CVB3-Infektion das Aktingerüst der Zielzelle eine wichtige Funktion im Rahmen der Virusreplikation übernimmt und hierbei spezifisch zerstört wird. Calcium ist für die Zytopathogenität allenfalls von sekundärer Bedeutung. Die Zerstörung des Aktingerüsts kann auch *in vivo* am Mausmodell der CVB3-Myokarditis nachgewiesen werden und erfolgt im Rahmen der viralen Proteinsynthese vermutlich durch die Proteinase 2A von CVB3. Durch eine chemische Zerstörung des F-Aktingerüsts wird die virale Replikation deutlich vermindert, jedoch nicht vollständig inhibiert. Eine vollständige Inhibierung der Virusreplikation lässt sich aber durch die Blockierung des Golgiapparats erreichen, welcher für die virale RNA Synthese eine entscheidende Rolle spielt.

6. LITERATURVERZEICHNIS

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD (1994) Molecular biology of the cell. 3rd edition Garland Publishing, Inc. NY

Albrecht T, Lee CH, Speelman DJ, Steinsland OS (1987) Inhibition of cytomegalovirus replication by smooth-muscle relaxing agents. Proc Soc Exp Biol Med, 186:41-6

Ambros V, Baltimore D (1980) Purification and properties of a HeLa cell enzyme able to remove the 5'-terminal protein from poliovirus RNA. J Biol Chem, 255:6739-44

Avitable E, Di Gaeta S, Torrisi M, Ward P, Roizman B, Campadelli-Fiume G (1995) Redistribution of microtubules and golgi apparatus in herpes simplex infected cells and their role in viral exocytosis. J Virol, 69:7472-82

Bagger JP, Baandrup U, Rasmussen K, Moller M, Vesterlund T (1984) Cardiomyopathy in Western Denmark. Br Heart J, 52:327-31

Badorff C, Lee GH, Lamphear BJ, Martone ME, Campell KP, Rhoads RE, Knowlton KU (1999) Enteroviral protease 2A cleaves dystrophin: evidence of cytoskeletal disruption in an aquired cardiomyopathy. Nat Med, 5:320-26

Badorff C, Knowlton KU (2004) Dystrophin disruption in enterovirus-induced myocarditis and dilated cardiomyopathy: from bench to bedside. Med Microbiol Immunol (Berl), 193:121-6

Berko BA, Swift M (1987) X-linked dilated cardiomyopathy. N Engl J Med, 316:1186-91

Bione S, D'Adamo P, Maestrini E (1996) A novel X-linked gene, G 4.5 is responsible for Barth syndrome. Nat Genet, 2:389-95

Bonneau AM, Darveau A, Sonenberg N (1985) Effect of viral infection on host protein synthesis and mRNA association with the cytoplasmic cytoskeletal structure. J Cell Biol, 100:1209-18

Burke E, Dupuy L, Barik S (1998) Role of cellular actin in the gene expression and morphogenesis of human respiratory syncytial virus. Virology, 252:137-48

Brunet JP, Cotte-Laffitte J, Linxe C, Quero AM, Geniteau-Legendre M, Servin A (2000a) Rotavirus infection induces an increase in intracellular calcium concentration in human intestinal epithelial cells: Role in microvillar actin alteration. J Virol, 74:2323-32

Brunet JP, Jourdan N, Cotte-Laffitte J, Linxe C, Geniteau-Legendre M, Servin A, Quero AM (2000b) Rotavirus infection induces cytoskeleton disorganization in human intestinal epithelial cells: Implication of an increase in intracellular calcium concentration. J Virol, 74:10801-06

- Candurra NA, Lgo MJ, Maskin L, Damonte EB (1999) Involvement of the cytoskeleton in Junin virus multiplication. *J Gen Virol*, 80:147-56
- Carafoli E (1987) Intracellular calcium homeostasis. *Annu Rev Biochem*, 56:395-433
- Ceccaldi PE, Valtorta F, Braud S, Hellio R, Tsiang H (1997) Alteration of the actin-based cytoskeleton by rabies virus. *J Gen Virol*, 78:2831-35
- Charlton CA, Volkman LE (1993) Penetration of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus nucleocapsids into IPLB Sf 21 cells induces actin cable formation. *Virology*, 197:245-54
- Chatterjee N, Nejman C (1985) Membrane-bound virions of coxsackievirus B4: Cellular localization, analysis of genomic RNA, genome linked protein, and effect on host macromolecular synthesis. *Arch Virol*, 84:105-18
- Chatterjee NK, Tuchowski C (1981) Comparison of capsid polypeptides of group B coxsackieviruses and polypeptide synthesis in infected cells. *Arch Virol*, 70:255-69
- Chow LH, Gauntt CJ, McManus BM (1991) Differential effects of myocarditic variants of coxsackievirus B3 in inbred mice. A pathologic characterization of heart tissue damage. *Lab Invest*, 64:55-64
- Codd MB, Sugrue DD, Gersh BJ, Melton LJ (1989) Epidemiology of idiopathic dilated and hypertrophic cardiomyopathy: A population-based study in Olmsted County, Minnesota, 1975-1984. *Circulation*, 80:564-72
- Cohen CJ, Shieh JT, Pickles RJ, Okegawa T, Hsieh JT, Bergelson JM (2001) The coxsackievirus and adenovirus receptor is a transmembrane component of the tight junction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98:15191-96
- Cordell-Stewart B, Taylor MW (1971) Effect of double-stranded viral RNA on mammalian cells in culture. *Proc Natl Acad Sci USA*, 68:1326-30
- Cowie MR, Wood DA, Coats AJS, Thompson SG, Poole-Wilson PA, Suresh V, Sutton GC (1999) Incidence and aetiology of heart failure - A population-based study. *Eur Heart J*, 20:421-28
- Cuconati A, Molla A, Wimmer E (1998) Brefeldin A inhibits cell-free, de novo synthesis of poliovirus. *J Virol*, 72:6456-64
- Dalldorf G, Sickles M (1948) An unidentified, filterable agent isolated from the feces of children with paralysis. *Science*, 108:61-63
- De Brabander M, Geuens G, Nuydens R, Willebrords R, & Demay J (1981) Taxol induces the assembly of free microtubules in living cells and blocks the organizing capacity of the centrosomes and kinetochores. *Proc Natl Acad Sci USA*, 78: 5608-12

De BP, Banerjee AK (1999) Involvement of actin microfilaments in the transcription/replication of human parainfluenza virus type 3: Possible role of actin in other viruses. *Microsc Res Tech*, 47:114-23

Doedens J, Maynell LA, Klymkowski MW, Kirkegaard K (1994) Secretory pathway function, but not cytoskeletal integrity, is required in poliovirus infection. *Arch Virol Suppl*, 9:159-72

Eggers M, Bogner E, Agricola B, Kern HF, Radsak K (1992) Inhibition of human cytomegalovirus maturation by brefeldin A. *J Gen Virol*, 73:2679-92

Etchison D, Milburn SC, Edery I, Sonenberg N, Hershey JWB (1982) Inhibition of HeLa protein synthesis following poliovirus infection correlates with proteolysis of a 220,000-dalton polypeptide associated with eucaryotic initiation factor 3 and a cap binding protein complex. *J Biol Chem*, 257:14806-10

Fatkin D, Graham RM (2002) Molecular mechanisms of inherited cardiomyopathies. *Physiol Rev*, 82:945-80

Feldmann AM, McNamara DM (2000) Myocarditis. *N Engl J Med*, 343:1388-98

Felker GM, Thompson RE, Hare JM, Hruban RH, Clemetson DE, Howard DL, Baughman KL, Kasper EK (2000) Underlying causes and long-term survival in patients with initially unexplained cardiomyopathy. *N Engl J Med*, 342:1077-84

Fjose A, Pryme IF (1984) Altered distribution profile of endoplasmic reticulum subfractions after incubation of Krebs II ascites cells with different concentrations of cytochalasin B. *Cell Biochem Funct*, 2:38-42

Foulis AK, Farquharson MA, Cameron SO, McGill M, Schönke H, Kandolf R (1990) A search for the presence of the enteroviral capsid protein VP1 in pancreases of patients with type 1 (insulin-dependent) diabetes and pancreases and hearts of infants who died of coxsackieviral myocarditis. *Diabetologia*, 33:290-98

Fricks CE, Hogle JM (1990) Cell-induced conformational change in poliovirus: externalization of the amino terminus of VP1 is responsible for liposome binding. *J Virol* 1990; 64:1934-45

Garry RF (1989) Alteration of intracellular monovalent cation concentration by a poliovirus mutant which encodes a defective 2A protease. *Virus Res*, 13:129-42

Gilbert RJ, Pothoulakis C, LaMont JT, Yakubovich M (1995) Clostridium difficile toxin B activates calcium influx required for actin disassembly during cytotoxicity. *Am J Physiol*, 268:487-95

Gillum RF (1986) Idiopathic cardiomyopathy in the United States, 1970-1982. *Am Heart J*, 111:752-55

Grumbach IM, Heim A, Pring-Akerblom I (1999) Adenoviruses and enteroviruses as pathogens in myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Acta Card*, 54:83-88

Grünig E, Tasman JA, Kücherer H, Franz W, Kübler W, Katus HA (1998) Frequency and phenotypes of familial dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*, 31:186-94

Gupta S, De BP, Drazba JA, Banerjee AK (1998) Involvement of actin microfilaments in the replication of human parainfluenza virus type 3. *J Virol*, 72:2655-62

Harris KS, Xiang W, Alexander L, Paul AV, Lane WS, Wimmer E (1994) Interaction of the polioviral polypeptide 3CD^{pro} with the 5' and 3' termini of the poliovirus genome: Identification of viral and cellular cofactors necessary for efficient binding. *J Biol Chem*, 269:27004-14

Hein S, Kostin S, Heling A, Maeno Y, Schaper J (2000) The role of cytoskeleton in heart failure. *Cardiovasc Res*, 45:273-78

Hewlett MJ, Florkiewicz RZ (1980) Sequence of picornavirus RNAs containing a radio-iodinated 5'-linked peptide reveals a conserved 5'-sequence. *Proc Natl Acad Sci USA*, 77:303-07

Higuchi ML, Reis MM, Aiello VD (1997) Association of an increase in CD8+T-cells with the presence of *Trypanosoma cruzi* antigens in chronic human myocarditis. *Am J Trop Med Hyg*, 56:485-89

Hogle JM, Chow M, Filman DJ (1985) Three-dimensional structure of poliovirus at 2.9 Å resolution. *Science*, 229:1358-65

Hohenadl C, Klingel K, Mertsching J, Hofschneider PH, Kandolf R (1991) Strand-specific detection of enteroviral RNA in myocardial tissue by in situ hybridization. *Molecular and Cellular Probes*, 5:11-2

Huber SA, Gauntt CJ, Sakkinen P (1998) Enteroviruses and myocarditis: Viral pathogenesis through replication, cytokine induction and immunopathogenesis. *Adv Virus Res*, 51:35-80

Igakura T, Stinchcombe JC, Goon PK, Taylor GP, Weber JN, Griffiths GM, Tanaka Y, Osame M, Bangham CR (2003) Spread of HTLV-I between lymphocytes by virus-induced polarization of the cytoskeleton. *Science*, 299:1713-16

Irurzun A, Arroya J, Alvarez A, carrasco L (1995) Enhanced intracellular calcium concentration during poliovirus infection. *J Virol*, 69:5142-46

Iyengar S, Hildreth JE, Schwartz DH (1998) Actin-dependent receptor colocalization required for human immunodeficiency virus entry into host cells. *J Virol* 1998; 72: 5251-55

Kandolf R, Hofschneider PH (1989) Viral heart disease. *Springer Semin Immunopathol*, 11:1-13

Kandolf R, Canu A, Klingel K (1990) Molecular studies on enteroviral heart disease. In: Brinton, MA., Heinz, FX. (eds) *New aspects of positive strand RNA viruses*. American Society for Microbiology, Washington DC, pp 340-48

- Kandolf R, Sauter M, Aepinus C, Schnorr JJ, Selinka HC, Klingel K (1999) Mechanisms and consequences of enterovirus persistence in cardiac myocytes and cells of the immune system. *Virus Res*, 62:149-58
- Kasper EK, Agema WR, Hutchins GM, Deckers JW, Hare JM, Baughman KL (1994) The causes of dilated cardiomyopathy: A clinicopathologic review of 673 consecutive patients. *J Am Coll Cardiol* 1994, 23:586-90
- Kass S, MacRae C, Graber HL, Sparks EA, McNamara D, Boudoulas H, Basson CT, Baker PB, Cody RJ, Fishman MC, Cox N, Kong A, Wooley CF, Seidman JG, Seidman CE (1994) A gene defect that causes conduction system disease and dilated cardiomyopathy maps to chromosome 1p1-1q1. *Nat Genet*, 7:546-51
- Kirkeeide EK, Pryme IF and Vedeler A (1993) Microfilaments and protein synthesis; effects of insulin. *Int J Biochem*, 25:853-64
- Kizhatil K, Albritton LM (1997) Requirements for different components of host cell cytoskeleton distinguish ecotropic murine leukemia virus entry via endocytosis from entry via surface fusion. *J Virol*, 71:7145-56
- Klingel K, Hohenadl C, Canu A, Albrecht M, Seemann M, Mall G, Kandolf R (1992) Ongoing enterovirus-induced myocarditis is associated with persistent heart muscle infection: Quantitative analysis of virus replication, tissue damage and inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89:314-18
- Klingel K, Rieger P, Mall G, Selinka HC, Huber M, Kandolf R (1998) Visualization of enteroviral replication in myocardial tissue by ultrastructural in situ hybridization: identification of target cells and cytopathic effects. *Lab Invest*, 78:1227-37
- Klingel K, Selinka HC, Huber M, Sauter M, Leube M, Kandolf R (2000) Molecular pathology and structural features of enteroviral replication: Toward understanding the pathogenesis of enteroviral heart disease. *Herz*, 25:216-20
- Klump WM, Bergmann I, Müller BC, Ameis D, Kandolf R (1990) Complete nucleotide sequence of infectious coxsackievirus B 3 cDNA: Two initial 5' uridine residues are regained during plus-strand RNA synthesis. *J Virol*, 64:1573-83
- Klymkowski MW, Bachant JB, Domingo A (1989) Functions of intermediate filaments. *Cell Motil Cytoskeleton*, 14:309-31
- Kräusslich HG, Nicklin MJH, Lee CK, Wimmer E (1988) Polyprotein processing in picornavirus replication. *Biochemie*, 70:119-30
- Kuppeveld Van FJ, Hoenderop JG, Smeets RL, Willems P, Dijkman HB, Galama MD, Melchers W (1997) Coxsackievirus protein 2B modifies endoplasmatic reticulum membrane permeability and facilitates virus release. *EMBO*, 16:3519-32
- Lacal JC & Carrasco L (1982) Relationship between membrane integrity and the inhibition of host translation in virus-infected mammalian cells: Comparative studies between encephalomyocarditis virus and poliovirus. *Eur J Biochem* 127:359-66

- Larsen GR, Dorner JA, Harris TJR, Wimmer E (1980) The structure of poliovirus replicative form. *Nucleic Acids Res* 8:1217-29
- Latif N, Zhang H, Achard LC, Yacoub MH, Dunn MJ (1999) Characterization of anti-heart-antibodies in mice after infection with coxsackie B3 virus. *Clin Immunol*, 91:90-98
- Lee GH, Badorff C, Knowlton KU (2000) Dissociation of sarcoglycans and the dystrophin carboxyl terminus from the sarcolemma in enteroviral cardiomyopathy. *Circ Res*, 87:489-95
- Lenk R, Ransom L, Kaufmann Y, Penman S (1977) A cytoskeletal structure with associated polyribosomes obtained from HeLa cells. *Cell*, 10:67-78
- Lenk R, Penman S (1979) The cytoskeletal framework and poliovirus metabolism. *Cell*, 16:289-301
- Li D, Tapscoft T, Gonzalez O, Burch PE, Quinones MA, Zoghbi WA, Hill R, Bachinski LL, Mann DL, Roberts R (1990) Desmin mutation responsible for idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circulation*, 100:461-64
- Liu B, Dai R, Tian CJ, Dawson L, Gorelick R, Yu XF (1999) Interaction of the human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid with actin. *J Virol*, 73:2901-08
- Luo M, Vriend G, Kamer G, Minor I, Arnold E, Rossmann MG, Boege U, Scraba DG, Duke GM, Palmenberg AC (1987) The atomic structure of Mengo virus at 3.0 Å resolution. *Science*, 235:182-91
- Lytton J, Westlin M and Hauley MR (1991) Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca-ATPase family of calcium pumps. *J Biol Chem*, 266:17067-71
- Mariman E, Hagebols AM, van Venrooij W (1982) On the localization and transport of specific adenoviral mRNA sequences in the infected HeLa-cell. *Nucleic Acids Res*, 10:6131-45
- Martino TA, Liu P, Petric M, Sole MJ (1995) Enteroviral myocarditis and dilated cardiomyopathy: A review of clinical and experimental studies. *In* Rotbart HA (ed.) *Human Enterovirus Infections*, ASM Press, Washington, pp 291-351
- Matsumori A, Matoba Y, Sasayama S (1995) Dilated cardiomyopathy associated with hepatitis C infection. *Circulation*, 92:2519-25
- Meerovitch K, Pelletier J, Sonenberg N (1989) A cellular protein that binds to the 5'-noncoding region of poliovirus RNA: Implications for the internal translation initiation. *Genes and Development*, 3:1026-34
- Melnick JL (1996) Enteroviruses: Polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses. *In* Fields BN, Knipe DM, Howley PM (eds.) *Virology*. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, pp 655-712

- Michelangeli F, Liprandi F, Chemello ME, Ciarlet M, Ruiz MC (1991) Effect of rotavirus infection on intracellular calcium homeostasis in cultured cells. *Virology*, 181:520-27
- Michelangeli F, Liprandi F, Chemello ME, Ciarlet M, Ruiz MC (1995) Selective depletion of stored calcium by thapsigargin blocks rotavirus maturation but not the cytopathic effect. *J Virol*, 69:3838-47
- Michels VV, Mol PP, Miller FA, Tajik AJ, Chu JS, Driscoll DJ, Burnett JC, Rodeheffer RJ, Chesebro JH, Tazelaar HD (1992) The frequency of familial dilated cardiomyopathy in a series of patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med*, 326:77-82
- Miranda AF, Godman GC, Deitch AD and Tanenbaum SW (1974) Action of Cytochalasin D on cells of established lines. I. Early events. *J Cell Biol*, 61:481-500
- Mora M, Partin K, Bhatia M, Partin J, Carter C (1987) Association of reovirus protein with the structural matrix of infected cells. *Virology*, 159:265-77
- Muckelbauer JK, Kremer M, Minor I, Diana G, Dutko FJ, Groarke J, Pevear DC, Rossmann MG (1995) The structure of coxsackievirus B3 at 3,5 Å resolution. *Structure*, 3:653-67
- Nedellec P, Vicart P, Laurent-Winter C, Martinat C, Prevost MC, Brahic M (1998) Interaction of Theiler Virus with intermediate filaments of infected cells. *J Virol*, 72:9553-60
- Nugent KM, Shanley JD (1984) Verapamil inhibits influenza type A virus replication. *Arch Virol*, 81:163-70
- Olson TM, Michels VV, Thibodeau SN, Tai Y, Keating MT (1998) Actin mutation in dilated cardiomyopathy, a heritable form of heart failure. *Science*, 280:750-52
- Ornelles DA, Fey EG and Penman S (1986) Cytochalasin releases mRNA from the cytoskeletal framework and inhibits protein synthesis. *Mol Cell Biol*, 6:1650-62
- Osborn M, Geisler N, Shaw G, Sharp G and Weber K (1982) Intermediate filaments. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 1982, 46:413-29
- Osborn M, Weber K (1976) Cytoplasmic microtubules in tissue cultured cells appear to grow from an organizing structure towards the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci USA*, 73:867-71
- Pallansch MA, Kew OM, Semler BL, Omilianowski CW, Anderson B, Wimmer E, Rueckert RR (1984) Protein processing map of poliovirus. *J Virol*, 49:873-90
- Palmenberg AC (1990) Proteolytic processing of picornaviral polyprotein. *Annu Rev Microbiol*, 44:603-23
- Pearce-Pratt R, Malamud D, Phillips DM (1994) Role of the cytoskeleton in cell-to-cell transmission of human immunodeficiency virus. *J Virol*, 68:2898-905

- Pelletier J, Sonenberg N (1989) Internal binding of eucaryotic ribosomes on poliovirus RNA: Translation in HeLa cell extracts. *J Virol*, 63:441-44
- Ravkov EV, Nichol ST, Peters CJ, Compans RW (1998) Role of actin microfilaments in Black Creek Canal virus morphogenesis. *J Virol*, 72:2865-70
- Richardson P, McKenna W, Bristow M, Maisch B, Mautner B, O'Connell J, Olsen E, Thiene G, Goodwin J, Gyarfás I, Martin I, Nordet P (1996) Report of the 1995 WHO / International Society and Federation of Cardiology Task Force on the definition and classification of cardiomyopathies. *Circulation*, 93:841-42
- Rigaut KD, Birk DE, Lenard J (1991) Intracellular distribution of input vesicular stomatitis virus proteins after uncoating. *J Virol*, 65:2622-28
- Roncarati R, Knebel-Mörsdorf D (1997) Identification of the early actin-rearrangement-inducing factor gene, arif-1, from *Autographa californica* multicapsid nuclear polyhedrosis virus. *J Virol*, 10:7933-41
- Rossmann MG (1989) The canyon hypothesis. Hiding the host cell receptor attachment site on a viral surface from immune surveillance. *J Biol Chem* 264: 14587-90
- Rubinstein SJ, Dasgupta A (1989) Inhibition of rRNA synthesis by poliovirus: Specific inactivation of transcription factors. *J Virol*, 63:4689-96
- Rueckert RR (1996) Picornaviridae: The viruses and their replication. *In* Fields BN, Knipe DM, Howley PM (eds.) *Virology*. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, pp 609-54
- Sandoval IV, Carrasco L (1997) Poliovirus infection and expression of the poliovirus protein 2B provoke the disassembly of the Golgi complex, the organelle target for the antipoliovirus drug Ro-090179. *J Virol*, 71:4679-93
- Sasaki H, Nakamura M, Ohno T, Matsuda Y, Yuda Y, Nonomura Y (1995) Myosin-actin interaction plays an important role in human immunodeficiency virus type 1 release from host cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92:2026-30
- Schofield CJ, Dias JC (1999) The southern cone initiative against Chagas disease. *Adv Parasitol* 42:1-27
- Seely KA, Aggeler J (1991) Modulation of milk protein synthesis through alteration of the cytoskeleton in mouse mammary epithelial cells cultured on a reconstituted basement membrane. *J Cell Physiol* 146:117-30
- Shainkin-Kestenbaum R, Winikoff Y, Chaimovitz C, Zimlichman S (1993) Inhibitory effect of calcium antagonist verapamil on measles and vaccinia replication in cell culture. *Isr J Med Sci*, 29:2-6
- Shariff A, Luna EJ (1992) Diacylglycerol-stimulated formation of actin nucleation sites plasma membranes. *Science*, 256:245-47

Sharrif M, Bhan MK, Knutton S, Das BK, Saini S, Kumar R (1993) Evaluation of the fluorescence actin staining test for detection of enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol*, 31:386-89

Singer RH, Langevin GL and Lawrence JB (1989) Ultrastructural visualization of cytoskeletal mRNA and their associated proteins using double-label in situ hybridization. *J Cell Biol*, 108:2343-53

Sole MJ and Liu P (1993) Viral myocarditis: A paradigm for understanding the pathogenesis and treatment of dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol Suppl A* 22: 99A-105A

Pelletier J, Sonenberg N (1989) Internal binding of eucaryotic ribosomes on poliovirus RNA: translation in HeLa cell extracts. *J Virol*, 63:441-4

Stanway G, Brown F, Christian PD, Hovi T, Hyypiä T, King AMQ, Knowles NJ, Lemon SM, Minor PD, Pallansch MA, Palmenberg AC, Skern T (2002) Taxonomy of the *Picornaviridae*: Proposed new species and description of a 10th genus. The 11th Meeting of the European Study Group on the Molecular Biology of Picornaviruses, Cape Cod, May 14-18

Sugrue DD, Rodeheffer RJM, Codd MB, Ballard DJ, Fuster V, Gersh BJ (1992) The clinical course of idiopathic dilated cardiomyopathy: A population-based study. *Ann Intern Med*, 117:117-23

Svardal AM, Pryme IF (1978) The isolation of microsomal subfractions of mouse plasmocytoma cells: The effect of salt concentrations during nitrogen cavitation. *Analyt Biochem*, 89:332-36

Svardal AM, Pryme IF, Dalen H (1981) Ultrastructure and polysome content of the microsomal subfractions of mouse plasmocytoma cells. *Mol Cell Biochem*, 34:165-75

Tsubata S, Bowles KR, Vatta M, Zintz C, Titus J, Muhonen L, Bowles NE, Towbin NA (2000) Mutations in the human deltasarcoglycan gene in familial and sporadic dilated cardiomyopathy. *J Clin Invest* 2000; 106:655-62

Vedeler A, Pryme IF and Hesketh JE (1991a) Compartmentalization of polysomes into free, cytoskeletal-bound and membrane-bound populations. *Biochem Soc Trans*, 19:1108-11

Vedeler A, Pryme IF and Hesketh JE (1991b) The characterization of free, cytoskeletal and membran-bound polysomes in Krebs II ascites cells and in 3T3 cells. *Mol Cell Biochem*, 100:183-93

Wessely R, Henke A, Zell R, Kandolf R, Knowlton K (1998) Low-level expression of a mutant coxsackieviral cDNA induces a myopathic effect in culture: An approach to the study on enteroviral persistence in cardiac myocytes. *Circulation*, 98:450-57

Wessely R, Klingel K, Santana LF, Dalton N, Hongo M, Jonathan M, Lederer W, Kandolf R, Knowlton K (1998) Transgenic expression of replication-restricted enteroviral genomes in heart muscle induces excitation-contraction coupling and dilated cardiomyopathy. *J Clin Invest*, 102:1444-53

Williams DG, Olson EGJ (1985) Prevalence of overt dilated cardiomyopathy in two regions of England. *Br Heart J*, 54:153-55

Wolosewick JJ, Porter KR (1979) Microtrabecular lattice of the cytoplasmic ground substance. *J Cell Biol*, 82:114-39

Woodruff JF (1980) Viral myocarditis. Review. *Am J Pathol*, 101:427-78

Xiong D, Lee GH, Badorff C, Dorner A, Lee S, Wolf P, Knowlton KU (2002) Dystrophin deficiency markedly increases enterovirus-induced cardiomyopathy: a genetic predisposition to viral heart disease. *Nat Med*, 8:872-7

Yisraeli JK, Sokol S, Melton DA (1990) A two-step model for the localization of maternal mRNA in *Xenopus* oocytes: Involvement of microtubules and microfilaments in the translocation and anchoring of Vgl mRNA. *Development* 1990; 108:289-98

Danksagung

Fr. PD Dr. Karin Klingel danke ich für die Anregung zu dieser Arbeit, die enge Betreuung und Tätigkeit als 1. Berichterstatterin, sowie insbesondere für eine sehr schöne und interessante Zeit in ihrer Arbeitsgruppe während des experimentellen Teiles der vorliegenden Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Reinhard Kandolf danke ich für die Überlassung des Themas und die großzügige Bereitstellung aller erforderlichen Mittel.

Für die vielfältige Hilfe beim Erlernen der zellbiologischen, virologischen und immunhistochemischen Methoden, sowie für das tolle Arbeitsklima und die große Hilfsbereitschaft danke ich insbesondere Fr. Dr. Martina Sauter, Herrn Dr. Hans-Christoph Selinka, Sandra Bundschuh, Gerd Janke und Carmen Ruoff.

Für die großzügige Überlassung der kultivierten Rattenmyozyten möchte ich mich bei Herrn Dr. Jörg-Mario Beiter bedanken, für die Hilfe am Laserscanmikroskop danke ich Herrn Dr. Ulrich Vogel.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie. Meinem Bruder Dr. Dirk Leube danke ich für die vielfältigen kleinen und großen Hilfestellungen vom Erlernen der Uhr bis zur Dissertation. Insbesondere möchte ich mich an dieser Stelle bei meinen Eltern Fritz und Renate Leube für die liebevolle und engagierte Betreuung meiner Tochter Annika Victoria Leube und den damit verbundenen beruflichen Möglichkeiten bedanken.

Lebenslauf

Name: Maike Mirja Leube
Geburtstag: 05.09.1974
Geburtsort: Stuttgart
Familienstand: ledig, 1 Tochter (Annika Victoria Leube, geb. 14.07.2003)

Schulen:

1981-1985 Mozart-Grundschule Neuhausen / F.
1985-1994 Heinrich-Heine Gymnasium Ostfildern

Studium:

12/1994 Beginn des Medizinstudiums an der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen
27.08.1996 Ärztliche Vorprüfung (Physikum)
24.03.1998 1. Staatsexamen
13.09.2000 2. Staatsexamen
27.11.2001 Abschluss des Medizinstudiums mit dem 3. Staatsexamen

Berufliche Tätigkeit:

01/2002-12/2003 Assistenzärztin Abt. für Chirurgie / Spitalzentrum Biel (CH)
01/2004-05/2004 Assistenzärztin Abt. für Urologie / Städt. Krankenhaus
Sindelfingen
01/2005-09/2005 Assistenzärztin Herz-Kreislauf-Klinik / Radolfzell
Seit 10/05 Assistenzärztin Institut für Anästhesie und Intensivmedizin /
Klinikum Friedrichshafen