

Verbesserung des CVB3-Maus- Myokarditismodells durch die Entwicklung pankreasattenuierter Coxsackieviren

vorgelegt von

Diplom-Biochemiker

Markian Pryshliak

ORCID: 0000-0003-0001-8270

von der Fakultät III – Prozesswissenschaften
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften

- Dr. rer. nat –

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. Roland Lauster

Gutachter 1: Prof. Dr. Jens Kurreck

Gutachter 2: Prof. Dr. Claus-Thomas Bock

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 15. März 2019

Berlin 2019

Zusammenfassung

Das Coxsackievirus B3 (CVB3)-Maus-Myokarditismodell wird standardmäßig zur Untersuchung der Virus-induzierten Myokarditis verwendet. Entgegen der CVB3-Infektion im Menschen stellt im murinen Organismus nicht das Herz, sondern das Pankreas das für die CVB3-Infektion susceptibelste Organ dar. Verschiedene klinische Symptome, wie der starke Gewichtsverlust, das schmerzhafte Hochziehen des Bauches sowie schnell auftretende Todesfälle, können als direkte Folge der virusbedingten akuten Pankreatitis angesehen werden. Diese fulminante Ausprägung der Pankreatitis stellt für die Tiere eine extreme Belastung dar, welche sich von der humanen Präsenz unterscheidet.

Im Fokus der vorliegenden Arbeit stand die Verbesserung des CVB3-Maus-Myokarditismodells durch die Entwicklung einer genetisch modifizierten CVB3-Variante, welche durch die Insertion von microRNA-Zielsequenzen (microRNA-Target Sites, miRNA-TS) eine Pankreasattenuation aufweist.

Die Expressionsanalyse von miRNAs im Pankreas und Herz mittels eines Affymetrix miRNA –Chip-Assays sowie quantitativer RT-PCR zeigte, dass die miRNA-375 die stärkste Expression im Pankreas aufwies und nur geringfügig im Herzen exprimiert wird. Darauf basierend wurden drei Kopien der miRNA-375TS in das 3' -bzw. 5'-Ende des Genoms der CVB3-Variante rCVB3.1, jeweils in positiver bzw. negativer Orientierung, inseriert. Die Analyse der daraus resultierenden vier rekombinanten CVB3-Varianten *in vitro* zeigte, dass die virale Replikation über die Insertion der miRNA-TS in positiver Orientierung in die 3'-UTR des Genoms (Virusvariante: CVB3-375TS(3+)) am effektivsten durch die miRNA-375 unterdrückt wurde. In der pankreatischen Zelllinie EndoC-βH1 wurde, verglichen mit dem keine TS-Sequenzen enthaltenden Kontrollvirus, die Replikation von CVB3-375TS(3+) durch die endogene miRNA-375 Expression ca. um vier log₁₀-Stufen verringert. In isolierten primären embryonalen Kardiomyozyten wurde CVB3-375TS(3+) hingegen nicht unterdrückt.

Für die *in vivo* Versuche wurden drei Kopien der miRNA-375TS in das 3'-Ende des Genoms der kardiotropen CVB3-Variante H3N inseriert. Es zeigte sich, dass die intraperitoneale (i.p.) Injektion des generierten Virus (H3N-375TS) in NMRI-Mäusen weder eine Pankreatitis noch eine Myokarditis verursachte. Hingegen führte die intravenöse (i.v.) Applikation von H3N-375TS in NMRI- als auch Balb/C-Mäusen zu einer Infektion des Herzens und induzierte je nach Versuchsaufbau eine akute oder chronische Myokarditis ohne Infektion des Pankreas. Während die akute Myokarditis sich durch moderate kardiale H3N-375TS-Titer, die Expression proinflammatorischer Zytokine sowie die Inflammation und die Zerstörung des Herzgewebes auszeichnete, war die chronische Myokarditis durch sehr geringe kardiale H3N-375TS-RNA Level ohne detektierbare Virusreplikation sowie durch die Ausbildung fibrotischer Gewebeareale gekennzeichnet.

Ob und welche Rolle das Pankreas für die Ausbildung der Myokarditis in Mäusen spielt wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen nunmehr eindeutig, dass bei der i.p. Applikation von CVB3 das Pankreas essentiell für die kardiale Infektion ist, wohingegen

bei der i.v. Applikation eine Myokarditis ohne Infektion des Pankreas durch die mittels miRNA-375TS genetisch modifizierte CVB3-Variante verursacht werden kann. Das H3N-375TS induzierte Modell erlaubt so die Untersuchung der CVB3induzierten Myokarditis in Mäusen unabhängig von einer Pankreasinfektion.

Zudem verringerte das pankreasattenuierte H3N-375TS bei NMRI-Mäusen, vor allem aber bei Balb/C-Mäusen, die auf die Pankreatitis zurückführbaren Schmerzen bzw. das Leiden während der CVB3-Infektion. Damit verstärkt es nicht nur die wissenschaftliche Relevanz der Myokarditisanalyse im Mausmodell, sondern es entspricht hinsichtlich der tierschutzrechtlichen Forderungen der 3R-Richtlinien den beiden Aspekten *Reduction* und *Refinement*.

Abstract

The coxsackievirus B3 (CVB3) mouse myocarditis model is the standard model to investigate virus-induced myocarditis. Compared to human, in mice the pancreas but not the heart represents the most susceptible organ for CVB3 infection. Multiple clinical symptoms, as drastic weight loss, painful contraction of the stomach as well as sudden death are direct results of the viral induced pancreatitis. Thus, the pathogenesis of CVB3 infection differs between mice and men, as in the murine CVB3 induced myocarditis model the pancreas is always co-infected and damaged by CVB3.

This study aimed to improve the mouse myocarditis model by development of a genetically engineered CVB3 variant, which became pancreas-attenuated by insertion of microRNA-target sites (miRNA-TS) sequences.

Analysis of miRNA expression in the pancreas and the heart by Affymetrix-miRNA-chip analysis as well as quantitative RT-PCR revealed that miRNA-375 is the highest expressed miRNA in the pancreas with minimal expression in the heart. Based on this finding, four miRNA-375 susceptible CVB3 variants were generated by insertion of three copies of miRNA-375TS in positive or negative orientation into the 3'- or 5'-end of the CVB3 genome of the CVB3 variant rCVB3.1. *In vitro* it was shown that the generated CVB3 containing the inserted miRNA-375TS in positive orientation in the 3'UTR of the CVB3 genome (virus variant: CVB3-375TS(3+)) was strongest suppressed by miRNA-375. In pancreatic EndoC- β H1 cells replication of CVB3-375TS(3+) was suppressed up to four \log_{10} steps by endogen miRNA-375 expression compared to a non-targeted control virus. Furthermore, there was no repression of the virus in isolated primary embryonic mouse cardiomyocytes.

For *in vivo* experiments, three copies of the miRNA-375TS were inserted into the 3'UTR of the cardiotropic CVB3 variants H3. Here, the intraperitoneal (i.p.) administration of the engineered virus H3N-375TS did not result in pancreatic as well as cardiac infection in NMRI mice. However, intravenous (i.v.) administration of H3N-375TS into NMRI and Balb/C mice resulted in the infection of the heart and induced acute and chronic myocarditis, respectively, but did not lead to pancreatic infection. The acute myocarditis was characterized by moderate cardiac titers of replicating H3N-375TS, cardiac tissue destruction, inflammation and expression of proinflammatory cytokines, whereas chronic myocarditis developing animals showed rarely H3N-375TS-RNA with no detectable virus replication and fibrotic tissue areas.

In literature, the role of the pancreas in virus-induced myocarditis is controversially discussed. The present study clearly shows that the pancreas is essential for cardiac infection using i.p. administered CVB3. I.v. application of genetically modified pancreas-attenuated CVB3 showed, that during this route of infection CVB3 induced myocarditis can be induced without infection of the pancreas. This allows the solely investigation of CVB3 induced murine myocarditis independently from a previous pancreas infection.

Furthermore, the pancreas-attenuated H3N-375TS reduces pain and thereby suffering of NMRI and Balb/C mice during CVB3 infection that is commonly related to pancreatitis. Therby, the model not just facilitates clinical relevance of investigation of vius-induced myocarditis in mice, in terms of animal welfare aspects, it also fulfills two requirements of the concepts of the 3-Rs, *Reduction* and *Refinement*.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Abstract	III
Inhaltsverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	IX
Abbildungsverzeichnis	XI
Tabellenverzeichnis	XIII
1 Einleitung	1
1.1 Coxsackievirus B3 (CVB3).....	1
1.1.1 Taxonomie.....	1
1.1.2 Morphologie und Genomstruktur der Picornaviren.....	2
1.1.3 Replikation und Morphogenese der Picornaviren.....	4
1.2 Pathogenität der Picornaviren (CVB3).....	7
1.2.1 Myokarditis im Menschen.....	7
1.2.2 CVB3-Myokarditis im Mausmodell.....	9
1.2.3 Antworten des angeborenen Immunsystems auf CVB Infektionen.....	11
1.2.4 Antworten des adaptiven Immunsystems auf CVB Infektionen.....	13
1.2.5 Präventive und therapeutische Ansätze gegen CVB-Infektionen.....	14
1.3 Genregulation durch nichtkodierende RNAs.....	16
1.3.1 <i>Small-interfering</i> RNA aund microRNA.....	16
1.3.2 RNA-Interferenz.....	17
1.3.3 Insertion von miRNA-Zielsequenzen zur Regulation der viralen Pathogenese bzw. des viralen Tropismus.....	19
1.4 Zielsetzung.....	23
2 Material und Methoden	26
2.1 Materialien.....	26
2.1.1 Geräte.....	26
2.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	27
2.1.3 Chemikalien.....	27
2.1.4 Puffer und Lösungen.....	28
2.1.5 Fest- und Flüssignährmedien.....	29
2.1.6 Zelllinien und Kulturmedien.....	29

2.1.7	Bakterienstämme	30
2.1.8	Plasmide	30
2.1.9	Viren.....	30
2.1.10	Enzyme	31
2.1.11	Restriktionsenzyme	31
2.1.12	Reaktionssysteme und Kits.....	32
2.1.13	DNA-und Proteingrößenstandards	32
2.1.14	Antibiotika.....	33
2.1.15	Antikörper	33
2.1.16	Oligonukleotide	33
2.1.17	Software.....	34
2.2	Methoden	35
2.2.1	Mikrobiologische Methoden	35
2.2.1.1	Anzucht von Bakterien aus Bakterienstocks	35
2.2.1.2	Herstellung chemisch-kompetenter Bakterien	35
2.2.1.3	Herstellung von Bakterienstocks.....	35
2.2.2	Molekularbiologische Methoden.....	36
2.2.2.1	Konzentrationsbestimmung von DNA- und RNA.....	36
2.2.2.2	Isolierung von Plasmid-DNA	36
2.2.2.3	DNA-Gelelektrophorese.....	36
2.2.2.4	Restriktionsverdau.....	36
2.2.2.5	Extraktion der DNA aus Agarosegelen	36
2.2.2.6	Ligation der Fragmente	37
2.2.2.7	Transformation chemisch kompetenter Zellen	37
2.2.2.8	Generierung von CVB3-cDNA-Klonen	37
2.2.2.9	Sequenzierung	45
2.2.2.10	RNA-Extraktion	45
2.2.2.11	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	45
2.2.2.12	cDNA-Synthese mittels Reverser Transkriptase-PCR	46
2.2.2.13	Quantifizierung von cDNA mittels quantitativer PCR.....	47
2.2.2.14	Auswertung der relativen Quantifizierung	48
2.2.2.15	Laser Mikrodisektion.....	48
2.2.2.16	Affymetrix miRNA-Chip-Analyse.....	49
2.2.3	Zellbiologische Methoden.....	49
2.2.3.1	Kultivierung eukaryotischer Zellen.....	49
2.2.3.2	Einfrieren von Zellen.....	49
2.2.3.3	Kultivierung von Zellen aus Kryostocks.....	50

2.2.3.4	Zellzahlbestimmung	50
2.2.3.5	Transfektion eukaryotischer Zellen.....	50
2.2.3.6	Dual-Luciferase Reporter Assay als Funktionalitätsnachweis der miRNA-375-TS ...	51
2.2.3.7	Zellviabilitätsassay	52
2.2.4	Westerblot	53
2.2.5	Virologische Methoden	53
2.2.5.1	Herstellung von rekombinantem CVB3	53
2.2.5.2	Aufreinigung der Viren mittels Saccharose-Kissen	54
2.2.5.3	Bestimmung des Virustiters mittels Plaque Assay.....	54
2.2.5.4	Infektion von Zellkulturen mit CVB3	55
2.2.5.5	MiRNA vermittelte CVB3-Inhibierungsassays.....	55
2.2.6	CVB3-Myokarditismodell in der Maus.....	56
2.2.6.1	Injektion und zeitlicher Ablauf der CVB3-Injektion.....	56
2.2.6.2	Allgemeiner Gesundheitsstatus	57
2.2.6.3	Histologische Untersuchungen.....	57
2.2.6.4	Herzpassagierung von CVB3	57
2.2.6.5	Hämodynamische Messung.....	58
2.3	Statistische Auswertung.....	58
3	Ergebnisse.....	59
3.1	Evaluierung der miRNA	59
3.2	Insertion der miRNA-375TS in das CVB3-Genom.....	61
3.3	Generierung replikativer CVB3-Varianten.....	62
3.4	Wachstumsanalysen und Zellviabilitätsassays der generierten CVB3-Varianten.....	64
3.5	Reportergenassay mit pMCV-MIR-375 in HEK293T-Zellen	66
3.6	Inhibierungsassays mit pMCV-MIR-375 in HEK293T-Zellen	66
3.7	Inhibierungsassays mit miRNA-375-Mimics in HeLa-Zellen.....	67
3.8	Endogene miRNA-375-Expression verschiedener Pankreaszelllinien	68
3.9	Inhibierungsassays mit endogen miRNA-375 exprimierenden Zellen	69
3.10	Replikation der rekombinanten CVB3-Varianten in primären embryonalen Kardiomyozyten	71
3.11	Vergleich des Verlaufs der H3N und rCVB3.1 Infektion <i>in vivo</i>	72
3.12	Wachstumsanalyse und Inhibierungsassays mit rekombinantem H3N.....	74
3.13	Verlauf der H3N-375TS Infektion in NMRI-Mäusen nach intraperitonealer Applikation.....	75
3.14	Die intravenöse Applikation von H3N-375TS induziert bei NMRI-Mäusen eine Myokarditis ohne Ausbildung einer Pankreatitis.....	79
3.15	Herzpassagiertes rekombinantes H3N-375TS induziert eine starke Myokarditis in NMRI-Mäusen	82

3.16	Das chronische Modell der Mausmyokarditis.....	86
3.17	Die intravenöse Infektion von H3N-375TS verursacht in Balb/C-Mäusen eine akute Myokarditis, aber keine Pankreatitis	88
4	Diskussion	92
4.1	Evaluierung der miRNAs.....	93
4.2	Einfluss der Insertion von miRNA-TS auf die Replikation und Zytotoxizität von CVB3	94
4.2.1	Inhibierung von miRNA-375TS enthaltender CVB3-Varianten durch miRNA-375.....	96
4.3	Intraperitoneale Injektion von CVB3.....	98
4.3.1	rCVB3.1 verursacht keine Myokarditis in NMRI-Mäusen	98
4.3.2	H3N induziert eine Myokarditis nach i.v. Applikation in NMRI-Mäuse.....	99
4.4	Intravenöse Injektion von CVB3	101
4.4.1	Intravenöse Injektion von H3N-375TS verursacht eine Myokarditis.....	102
4.4.2	Vergleich der intraperitonealen und intravenösen Applikationsrouten.....	102
4.4.3	Vergleich des H3N-375TS-Myokarditismodells in NMRI -und Balb/C-Mäusen.....	105
4.4.4	Herzpassagierung von CVB3	106
4.4.5	Das chronische Modell der CVB3-Mausmyokarditis	107
4.4.6	Hämodynamische Messungen.....	108
4.5	Umsetzung des 3R-Gedankens	110
4.6	Ausblick.....	111
	Literaturverzeichnis.....	114
	Anhang	140

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
bp	Basenpaar(e)
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (<i>complementary desoxy-ribonucleic acid</i>)
Ct	Zyklusschwellenwert (<i>cycle threshold</i>)
CVB3	Coxsackievirus Typ B 3
d	Tage (days)
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxy ribonucleic acid</i>)
DNaseI	Desoxyribonuklease I
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	und andere (<i>et alia</i>)
EtOH	Etahnol
FCS	fetales Kälberserum (<i>foetal calf serum</i>)
GAPDH	Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
h	Stunden (<i>hours</i>)
IFN	Interferon
Ig	Immunoglobulin
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid
IRES	interne ribosomale Eintrittsstelle (<i>internal ribosome entry site</i>)
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
l	Liter
m	Milli (-gramm, -liter, -mol)
M	Mol
MCS	Multiple Klonierungsstelle (<i>multiple cloning site</i>)
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minuten
miRNA	microRNA
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule (1 mmHg = Pa)

MOI	Multiplizität der Infektion (<i>multiplicity of infection</i>)
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (<i>messenger ribonucleic acid</i>)
μ	Mikro (-gramm, -liter, -mol; -molar)
n.s.	statistisch nicht signifikant
NaCl	Natriumchlorid
NFκB	nukleärer Faktor kappaB (<i>nuclear factor κB</i>)
NOD	Nukleotidbindungs- und Oligomerisierungs-Domäne (<i>nucleotid binding and oligomerisation domain</i>)
OD	Optische Dichte
ORF	offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>)
p. i.	nach der Infektion (<i>post infection</i>)
PAMP	pathogenassoziiertes molekulares Faktor (<i>pathogen-associated molecular pattern</i>)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PFA	Paraformaldehyd
pfu	Lochbildende Einheit (<i>plaque forming unit</i>)
qRT-PCR	Quantitative Echtzeit-PCR (<i>quantitative real time PCR</i>)
RdRP	RNA-abhängige RNA-Polymerase
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RNAseA	Ribonuklease A
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RT	Reverse Transkription
s	Sekunden
SEM	Standardabweichung des Mittelwertes (<i>standard error of the mean</i>)
SM-Puffer	Magnesium Saline Puffer
ss	einzelsträngig (<i>single stranded</i>)
THY	Todd-Hewitt Bouillon mit Hefeextrakt (<i>Todd-Hewitt with yeast extract</i>)
TLR	<i>Toll-like-Rezeptor</i>
TNFα	Tumornekrosefaktor α
Tris	Trishydromethylaminomethan
ÜS	Überstand
UTR	untranslatierte Region
vgl.	vergleiche
vRNA	virale RNA
z. B.	zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Struktur der Picornaviren.	3
Abbildung 2: Aufbau des Picornavirus-Genoms.....	4
Abbildung 3: Replikation der Picornaviren.....	5
Abbildung 4: Aufbau des Picornavirus-Genoms und Prozessierung des Polyproteins.....	7
Abbildung 5: Mechanismus der RNA-Interferenz.	19
Abbildung 6: Insertion pankreasspezifischer miRNA-Target Sites in das CVB3-Genom modifiziert den viralen Tropismus im Mausmodell.....	24
Abbildung 7: Klonierung der MCS in das 3'-Ende des CVB3-Genoms im pMKS1-Plasmid.....	39
Abbildung 8: Darstellung des pMKS1-3'MCS-Plasmids mit der MCS am 3'-Ende mit den Restriktionsschnittstellen <i>AsiSI</i> , <i>XbaI</i> , <i>NdeI</i> und <i>PmeI</i>	40
Abbildung 9: Klonierung von drei miRNA-375TS in das Fragment mit der MCS in das 3'-Ende des CVB3-Genoms.	41
Abbildung 10: Klonierung der TS-Sequenzen am Beispiel der miRNA-375TS, die dreifach in das 5'-Ende des pMKS1-Plasmids inseriert wurden.	42
Abbildung 11: Inserierungsstellen der miRNA-375TS- sowie der miRNA-39TS-Sequenzen in das 5'- bzw. 3'-Ende des CVB3-Genoms.	42
Abbildung 12: Generierung des pMKS1-H3N-Plasmids.	43
Abbildung 13: Klonierung von drei miRNA-375TS-Kopien in das pMKS1-H3N-Plasmid.	44
Abbildung 14: Klonierung von drei Kopien der miRNA-375TS in das psiCHECK2-Plasmid.	44
Abbildung 15: Produktion rekombinanter CVB3's einschließlich der Bestimmung des Virustiters mittels Plaque Assay.	54
Abbildung 16: Relative miRNA-Expression in den pankreatischen Geweben von Balb/C-Mäusen...	60
Abbildung 17: Relative miRNA-Expression in Herz und Pankreas von Balb/C-Mäusen.	61
Abbildung 18: Insertionsstellen der miRNA-375TS und miRNA-39TS-Sequenzen im pMKS1-Plasmid.	62
Abbildung 19: GFP-Expression nach Transfektion von CVB3- cDNA bzw. CVB3-rRNA.....	63
Abbildung 20: Wachstumskurven rekombinanter CVB3-375TS und CVB3-39TS-Varianten.....	64
Abbildung 21: Zellviabilitätsassays (XTT) der rekombinanten CVB3-375TS bzw. CVB3-39TS-Varianten.	65
Abbildung 22: Überprüfung der Funktionalität der inserierten miRNA-375TS mittels Dual-Luciferase-Reporterassay.	66
Abbildung 23: Inhibierung rekombinanter CVB3 mit 3'- bzw. 5'-inserierten miRNA-375TS durch die	67
Abbildung 24: Inhibierung rekombinanter CVB3 mit 3'- bzw. 5'- inserierten miRNA-375TS durch.	68
Abbildung 25: MiRNA-375-Expression verschiedener Zelllinien.....	69

Abbildung 26: CVB3-eGFP induziert die Expression des VP1-Proteins in EndoC- β H1-Zellen.....	70
Abbildung 27: Inhibierungsassays mit CVB3-375TS(3+) und CVB3-39TS(3+) in Endo β H1-Zellen.	71
Abbildung 28: Replikation von rCVB3.1, CVB3-375TS(3+) sowie CVB3-39TS(3+) in primären embryonalen Kardiomyozyten.	72
Abbildung 29: Vergleich der Infektion von rCVB3.1 und H3 in NMRI-Mäusen.....	73
Abbildung 30: Wachstumskurvenanalysen und Inhibierungsassays von H3N-375TS, H3N-39TS bzw. H3N nach Applikation miRNA-375-Mimics.	74
Abbildung 31: Die intraperitoneale Injektion von H3N-375TS führt nicht zur Infektion von NMRI-Mäusen.	77
Abbildung 32: Histologische und hämodynamische Analyse intraperitoneal mit H3N-375TS infizierter NMRI-Mäuse.....	78
Abbildung 33: Die intravenöse Applikation von H3N-375TS verursacht in NMRI-Mäusen eine Myokarditis, aber keine Pankreatitis.	81
Abbildung 34: Die intravenöse Applikation von herzpassagiertem oder hochdosierte H3N-375TS verursacht in NMRI-Mäusen eine Myokarditis, aber keine Pankreatitis.	83
Abbildung 35: Die intravenöse Applikation von herzpassagiertem oder hochdosierte H3N-375TS verursacht in NMRI-Mäusen eine Inflammation des Herzgewebes, jedoch keine des Pankreas.....	84
Abbildung 36: Expression der miRNA-375 im Herz- und Pankreasgewebe von H3N-375 infizierten Mäusen.	85
Abbildung 37: Die intravenöse Applikation von herzpassagiertem H3N-375TS verursacht in NMRI-Mäusen eine chronische Myokarditis, aber keine Pankreatitis.....	87
Abbildung 38: Hämodynamische Messungen von intravenös mit H3N-375TS infizierten Mäusen. ...	88
Abbildung 39: Die intravenöse Applikation von H3N-375TS verursacht in Balb/C-Mäusen eine akute Myokarditis, aber keine Pankreatitis.	90
Abbildung 40: Die intravenöse Applikation von H3N-375TS verursacht in Balb/C-Mäusen eine Inflammation im Herzgewebe, nicht aber im Pankreas.....	91
Abbildung 41: Hämodynamische Messungen von intravenös mit H3N-375TS infizierten Balb/C-Mäusen.	91
Abbildung 42: Histologisches Präparat des endo- und exokrinen Pankreas.	94
Abbildung 43: Schematische Darstellung der Angriffstellen der miRNA und siRNA.....	97
Abbildung 44: Schematische Darstellung der miRNA-7650-Angriffsstelle im CVB3-Genom.....	101
Abbildung 45: Schematische Darstellung des Infektionsverlaufes von pankreasattenuiertem und nicht-pankreasattenuiertem H3N in Abhängigkeit von der Applikationsroute.	104

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einige Vertreter der Familie Picornaviridae, deren Wirte und Krankheitsbilder.	2
Tabelle 2: Auslöser der Myokarditis. (modifiziert nach ⁸³).....	8
Tabelle 3: Eigenschaften der siRNAs und miRNA (modifiziert nach ²⁰²).	16
Tabelle 4: Geräte.	26
Tabelle 5: Verbrauchsmaterialien.....	27
Tabelle 6: Chemikalien.	27
Tabelle 7: Puffer und Lösungen.	28
Tabelle 8: Verwendete Fest- und Flüssignährmedien.	29
Tabelle 9: Verwendete Zelllinien mit entsprechendem Kulturmedium und Zusätzen.	29
Tabelle 10: Verwendete Bakterienstämme.....	30
Tabelle 11: Verwendete Plasmide.....	30
Tabelle 12: Verwendete Viren.....	30
Tabelle 13: Enzyme.....	31
Tabelle 14: Restriktionsenzyme zuzüglich Schnittstelle und Inkubationstemperatur.	31
Tabelle 15: Reaktionssysteme und kommerzielle Kits.....	32
Tabelle 16: DNA- und Proteingrößenstandards.	32
Tabelle 17: Antibiotika, verwendete Konzentrationen und Lösungsmittel.	33
Tabelle 18: Antikörper.	33
Tabelle 19: Verwendete Oligonukleotide.....	33
Tabelle 20: Verwendete Software-Programme.	34
Tabelle 21: Zusammensetzung des Eagle-Overlay-Mediums.	55
Tabelle 22: Ergebnisse der Affymetrix miRNA-Chip-Analyse	59

1 Einleitung

1.1 Coxsackievirus B3 (CVB3)

Die Bezeichnung Coxsackievirus geht auf die Erstisolierung des Virus während der Poliovirus-Epidemie im Jahr 1947 durch Gilbert Dalldorf und Grace Sickles im Ort Coxsackie innerhalb des US Bundesstaates New York zurück. Sie isolierten das Virus aus einem Jungen, der unter akuter schlaffer Myelitis (ASM) litt. Die Symptomatik und der durch das Virus hervorgerufene Krankheitsverlauf ähnelten stark denen, welche durch das Poliovirus hervorgerufen wurden¹. Basierend auf der Pathogenität in Säuglingsmäusen werden Coxsackieviren in zwei Subgruppen unterteilt.^{2,3} Der Coxsackievirus Subtyp A (CVA) umfasst bislang 23 beschriebene Serotypen während für den Coxsackievirus Subtyp B (CVB) aktuell sechs Serotypen beschrieben sind⁴. Im Allgemeinen induziert CVA in der Maus ASM als Resultat einer weitreichenden Infektion der Skelettmuskulatur, verbunden mit einer generalisierten Myositis infolge eines perakuten Infektionsverlaufes³. Der später entdeckte Coxsackievirus Subtyp B wurde aus einem Patienten mit aseptischer Meningitis isoliert⁵. Auch wenn sich viele CVB-Infektionen durch einen milden Krankheitsverlauf auszeichnen^{6,7}, können sie dennoch schwerwiegende Herz-, Nervensystem- oder Pankreaserkrankungen auslösen^{3,8}. Am häufigsten führen CVB-Infektionen jedoch zu einer akuten Myokarditis, die bei progredientem Krankheitsverlauf zu einer dilatativen Kardiomyopathie (DCM) und Herzversagen führen^{4,8-10}.

1.1.1 Taxonomie

Coxsackieviren sind der Familie *Picornaviridae* untergeordnet, die zur Gattung Enteroviren zählt.¹¹ Der Familie der *Picornaviridae* gehören >30 Genera und >75 Serotypen an, von denen die relevantesten humanpathogenen Vertreter aus dem Genus der Enteroviren stammen, wohingegen veterinärmedizinisch die Aphthoviren eine größere Bedeutung spielen. So verursachen Aphthoviren bei Tieren die Maul- und Klauenseuche, während Enteroviren bei Menschen die Hand-Fuß-Mund-Krankheit, Myokarditis (CVB3), Poliomyelitis (Poliovirus), Hepatitis (Hepatoviren) oder Rhinitis (Rhinoviren) auslösen können¹⁰ (**Tab. 1**). Auch wenn Säugetiere und Vögel den Großteil der Wirte für die meisten Picornaviren darstellen, wurden sie vereinzelt auch in Reptilien und Fischen nachgewiesen¹².

Weiterhin werden Picornaviren hinsichtlich ihrer Säurestabilität in säurestabile und säurelabile Erreger unterteilt. Säurestabile Erreger wie Enteroviren lösen vornehmlich Infektionen des Magen-Darm-Trakts aus, da sie marginal bis gar nicht durch das saure Milieu des Magens beeinträchtigt werden^{13,14}, wohingegen säurelabile Picornaviren wie Rhinoviren meist Infektionen des Nasen-Rachen-Raumes verursachen¹³.

Tabelle 1: Einige Vertreter der Familie Picornaviridae, deren Wirte und Krankheitsbilder.
(Modifiziert nach ¹⁰).

Gattung	Spezies	Wirt	Krankheit
Aphthovirus	Maul-und Klauenseuche Virus	Klauentiere	Maul-und Klauenseuche
Cardiovirus	Encephalomyokarditisvirus	Säugetiere, Vögel	Encephalitis
Enterovirus	Theilovirus	Maus	Neurologische Erkrankungen
	Coxsackievirus B1-6	Mensch	Myokarditis, Pankreatitis
	Enteroviru 71	Mensch	Hand-Fuß-Mund-Krankheit
	Poliovirus 1-3	Mensch	Poliomyelitis
Hepatoviren	Rhinovirus	Mensch	Atemwegserkrankungen
	Hepatitis A	Mensch, Affen	Hepatitis
Kobuvirus	Aichivirus	Mensch	Gastroenteritis

1.1.2 Morphologie und Genomstruktur der Picornaviren

Der Name Picornavirus setzt sich aus *pico* (lateinisch „sehr klein“) und RNA (Genom) zusammen. Es handelt sich um nicht behüllte Viren, deren Kapsidgröße zwischen 22-30 nm variiert und eine ikosaedrische Struktur aufweist. Das Kapsid setzt sich aus zwölf Pentameren zusammen, welche jeweils aus fünf Protomeren bestehen, die wiederum aus je vier Kapsidproteinen (VP1, VP2, VP3 und VP4) gebildet werden (**Abb. 1A**). Die ersten drei Virusproteine, VP1-3, bilden die Oberfläche des Virus, während das VP4-Protein auf der Innenseite des Kapsids lokalisiert ist (**Abb. 1D**). Die größten Strukturproteine sind die VP1-Proteine. Sie bilden innerhalb der Pentamere (5-fache Symmetrieachse) eine kronenartige Struktur an deren Berührungspunkten eine Spalte entsteht, welche als *Canyon* bezeichnet wird (**Abb. 1B**). Die *Canyons* kommen bei allen Enteroviren vor und ermöglichen die Bindung zellulärer Rezeptoren wie z. B. die des *very-low-density lipoprotein receptor* (VLDL-R) bei einigen Serotypen humaner Rhinoviren sowie die des *decay-accelerating factor* (DAF) (CD55) bei verschiedenen Serotypen der Echoviren und CVB¹⁵⁻¹⁸. Neben der 5-fach-Symmetrieachse existiert zudem eine 3-fache Symmetrieachse, die von den Proteinen VP1, VP2 und VP3 gebildet wird¹⁹ (**Abb. 1B-C**). Das VP4-Protein kommt nur im Kapsidinneren vor und ist aufgrund seiner positiv geladenen Aminosäurereste mit der viralen RNA assoziiert^{17,20}.

Das Genom aller Picornaviren besteht aus einem einzelsträngigen RNA-Molekül in positiver Orientierung und hat eine Länge von 7,2-8,5 kb. Am 5'-Ende ist das Genom kovalent mit dem kleinsten viralen Protein, dem *viral protein genome-linked* (VPg) verbunden, welches auch als 3B-Protein bezeichnet wird²¹⁻²³. Im Gegensatz zu eukaryotischen mRNAs, die klassischerweise eine 7-Methyl-Guanosin (m7G) Cap-Struktur am 5'-Ende tragen, die für die Translation notwendig ist²⁴, wird diese bei den Picornaviren durch das Protein VPg initiiert. Dank der Verkappung werden die mRNAs vor dem Abbau durch zelluläre Exonucleasen geschützt. Bei den Picornaviren wird das VPg-Protein kovalent an das 5'-Ende der viralen genomischen RNA gebunden. Auf das VPg-Protein folgt ein etwa 500-1200 nt langer Bereich, die 5'

untranslated region (5'UTR), bestehend aus mehreren Sekundär- und Tertiärstrukturen, welche bei den Picornaviren die Ribosomen-Eintrittsstelle (*internal ribosomal entry site*, IRES) ausbilden und damit die Translations-Initiation ermöglichen^{21,25-27}. Die ersten 100 Nukleotide in der 5'-UTR der Enteroviren enthalten Kleeblatt-Strukturen, über welche sie an das virale Nichtstruktur-Protein 3C bzw. dessen Vorläuferprotein 3CD_{Pro} binden.²⁸ Durch die zusätzliche Bindung des Wirtproteins *poly (rC)-binding protein* (PCBP) erfolgt die Rekrutierung der Polymerase 3D zum Replikationskomplex²⁹⁻³¹. Die 5'UTR endet vor dem Startcodon des viralen Polyproteins. Das 3'-Ende ist polyadenyliert und bildet den PolyA-Schwanz aus. Auch am 3'-Ende befindet sich eine 30-650 nt lange UTR, die 3'UTR, die nach dem Stopcodon beginnt und vor dem PolyA-Schwanz des viralen Genoms endet.^{21,23,32} Innerhalb dieser beiden nichtkodierenden Bereiche liegt lediglich ein offener Leserahmen (*open reading frame*, ORF)¹⁰ (Abb. 2).

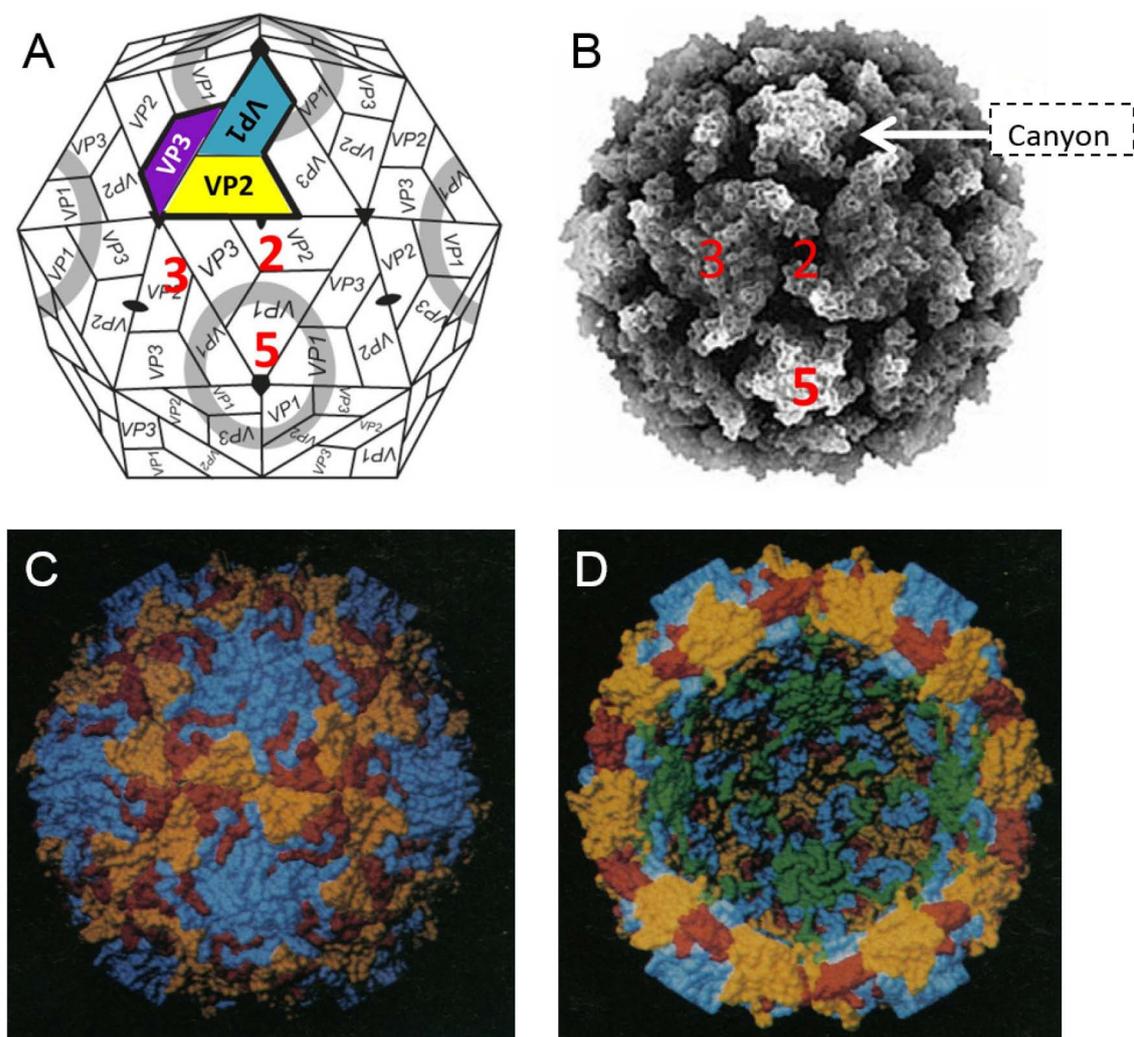


Abbildung 1: Struktur der Picornaviren.

(A) Schematische Darstellung der Struktur von Picornaviren mit der typischen ikosaedrischen Symmetrie. (B) Computermodell des Poliovirus. Gekennzeichnet sind die 5-fache, 3-fache und 2-fache Achsensymmetrie sowie die *Canyons*. (C) Picornaviruskapsid bestehend aus VP1 (blau), VP2 (orange) und VP3 (rot). (D) Querschnitt des Virions. Die Innenseite des Picornaviruskapsids ist überwiegend mit VP4 (grün) ausgekleidet. Modifiziert nach ^{17,19,33}. [VP: Virales Protein]

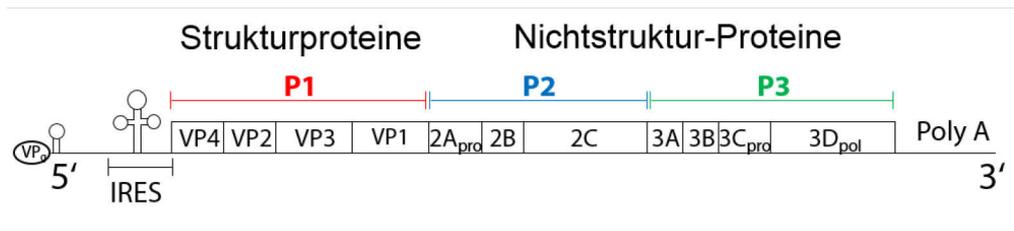


Abbildung 2: Aufbau des Picornavirus-Genoms.

Das Genom der Picornaviren besteht aus Struktur- und Nichtstrukturproteinen. *Upstream* des viralen Polyprotein-Komplexes befindet sich die für die Translations-Initiation nötige Ribosomeneintrisstelle (IRES). Das 3'-Ende ist polyadenyliert (Poly A). Die Abbildung ist modifiziert nach ³⁴. [VP: Virales Protein, IRES: *internal ribosome entry site*; P: Protein, pol: Polymerase, Poly A: polyadenyliert]

1.1.3 Replikation und Morphogenese der Picornaviren

Der produktive Replikationszyklus von CVB wird durch die Bindung der Viren an den Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptor (CAR) initiiert.³⁵⁻³⁷. Dieses Transmembranprotein wird unter anderem im Herz- und Pankreasgewebe exprimiert und ist in polarisierten Zellen in den *Tight Junctions* lokalisiert³⁵, in welchen die CAR-vermittelte CVB-Aufnahme abhängig von Caveolin, jedoch unabhängig von Dynamin erfolgt. Im Gegensatz dazu verläuft die CAR-vermittelte CVB Aufnahme in nicht polarisierten Zellen Caveolin-unabhängig und Dynamin-abhängig³⁸. Während die CVB Serotypen 2, 4 und 6 ausschließlich CAR für die Bindung und Initialisierung in die Wirtszelle benötigen^{4,15,39}, erfolgt die CVB Bindung bei den CVB Serotypen 1, 3 und 5 über den *Decay accelerating factor* (DAF)⁴⁰⁻⁴². Das humane Transmembranprotein DAF bewahrt die Zellen primär vor der vom Komplementsystem vermittelten Lyse⁴³. Während der CVB3-Aufnahme fungiert er als Ko-Rezeptor, indem das Virus ihn auf der apikalen Zellseite bindet und so über intrazelluläre Signalwege eine Umstrukturierung des Aktinzytoskeletts bewirkt. Dies führt dazu, dass CVB über die Zellmembran zu den *Tight Junctions* und folglich zum eigentlichen Initialisierungsrezeptor CAR gelangt⁴⁴. Im Laufe der Bindung der Viruspartikel an DAF sowie der Rezeptor-vermittelter Endozytose über CAR in das Zellinnere, ändert sich die Konformation der viralen Strukturproteine⁴⁵. Dabei wird das virale Plus-Stranggenom aus den Endosomen in das Zytoplasma freigesetzt. Im Lebenszyklus der Picornaviren hat die einzelsträngige, virale Plus-Strang-RNA drei wichtige Aufgaben: Sie dient sowohl als *messenger RNA* (mRNA) für die Translation des viralen Polyproteins als auch als Matrize für die RNA-Replikation und stellt zudem das Genom dar, welches in die Virionen verpackt wird³³ (**Abb. 3**).

Aufgrund ihrer positiven Orientierung wird die virale RNA im Zytoplasma der Wirtszelle direkt translatiert. Die Translation der viralen RNA wird durch die sich in der 5'UTR befindenden IRES-Strukturen ermöglicht^{24,26}. Die IRES vermittelt die Bindung des Plus-Stranggenoms an das endoplasmatische Retikulum der Ribosomen und initiiert so die Translation. Es entsteht ein ca. 240 kDa großes Polyprotein, welches stufenweise durch die viralen Cysteinproteasen 2APro und 3CDPro zunächst in die Vorläuferproteine P1, P2 und P3 und dann in die eigentlichen Virusproteine, die Strukturproteine VP1, VP2, VP3, VP4 sowie die Nichtstruktur-Proteine 2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C und 3D

fragmentiert wird⁴⁶ (Abb. 4). Die Nichtstruktur-Proteine, die aus dem Vorläuferprotein P2 hervorgehen (2A-C), vermitteln primär die Reorganisation zellulärer Membranstrukturen, was dazu führt, dass Vesikel gebildet werden, an denen die virale RNA-Replikation abläuft⁴⁷. Die Nichtstruktur-Proteine der P3 Proteinregion (3A-D) dienen der viralen RNA-Replikation sowie der proteolytischen Prozessierung⁴⁸.

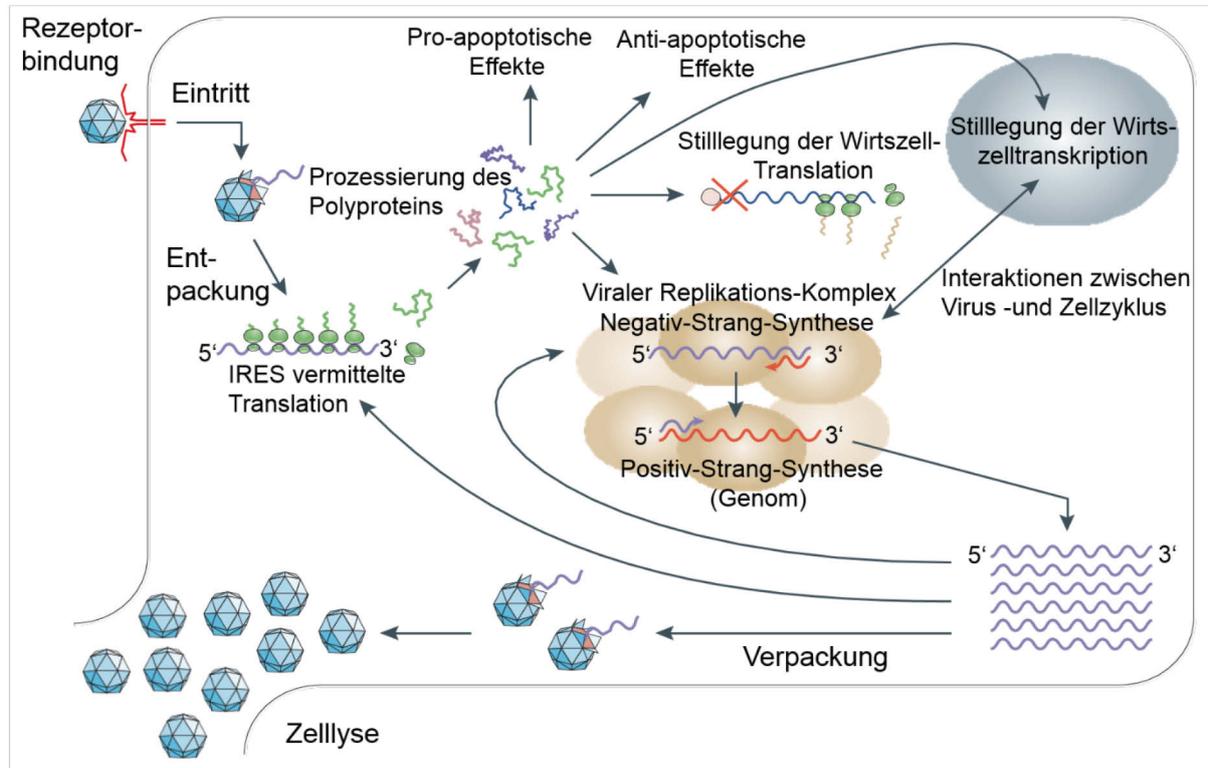


Abbildung 3: Replikation der Picornaviren.

Schematische Darstellung des Replikationszyklus von Picornaviren modifiziert nach¹⁰. [IRES: *internal ribosom entry site*]

Die prozessierte 3D RNA-abhängige RNA-Polymerase, 3D^{Pol} (RdRP) transkribiert das Plus-Stranggenom der Picornaviren in Minus -Strang-RNA. Das am 5'-Ende der viralen RNA lokalisierte VPg sowie dessen uridinylierte Derivate dienen dabei als Protein-Primer für die Initiation der Minus-Strang-RNA Synthese^{49,50} indem sie an das 3'-PolyA-Ende der viralen RNA binden, was in der Bildung VPg gebundener PolyU-Produkte am 5'-Ende der Minus-Strang-RNA resultiert. Entsprechend dient die Minus-Strang-RNA als Matrize für die Plus-Strang-RNA Synthese, indem uridinyliertes VPg dessen Synthese an komplementären Adenosinbasen am 3'-Ende der Minus-Strang-RNA initiiert. Aus einer vorliegenden Minus-Strang-RNA können wiederum durchschnittlich sechs bis acht RNA-Plus-Stränge gebildet werden. Während der akuten Virusinfektion beträgt das Verhältnis von negativen und positiven RNA-Strängen mitunter 1:100, was wiederum zeigt, dass aus einer viralen Minus-Strang-RNA zahlreiche Plus-Strangkopien gebildet werden können⁵¹.

Da die Wirtsmaschinerie nicht über eine eigene 3D^{Pol} verfügt, müssen die Viren die 3D^{Pol} selbst kodieren und prozessieren, so dass sie innerhalb der Picornavirenfamilie extrem hoch konserviert ist^{46,52}.

Die hohe Mutationsrate der Picornaviren resultiert aus der hohen Fehlerrate der 3D^{Pol}, die etwa alle 2000 Basen eine Punktmutation inseriert und so das Risiko des Auftretens sogenannter *Escape*-Mutanten erheblich verstärkt⁵³. Die reifen Viren verlassen die Wirtszelle über lytische bzw. bisher wenig bekannte Mechanismen, welche wahrscheinlich an die Autophagosomie geknüpft sind⁵⁴. Innerhalb des CVB Replikationszyklus spielt die Autophagie, welche Prozesse des intrazellulären streng regulierten Abbaus sowie des Recyclings von Proteinen bzw. ganzen Zellorganellen zur Aufrechterhaltung der Homöostase umfasst, eine bedeutende Rolle. Während der Makroautophagie wird zunächst eine sogenannte Isolationsmembran generiert, die von verschiedenen Organellen, unter anderem dem endoplasmatischem Retikulum (ER)⁵⁵, dem Golgi-Komplex⁵⁶ oder der äußeren Mitochondrienmembran⁵⁷, zur Verfügung gestellt wird. Aus dieser bilden sich die Autophagosomen, welche die für sie charakteristische Doppelmembran besitzen. Diese wiederum fusionieren mit Endosomen zu Amphisomen⁵⁸. Amphisomen oder Autophagosomen vereinen sich mit Lysosomen zu Autolysosomen in denen über lysosomale Hydrolasen der Abbau der zellulären Bestandteile erfolgt⁵⁹. CVB und auch Polioviren induzieren die Bildung autophagosomenähnlicher Vesikel während ihrer Replikation, da sie deren Doppelmembran als Struktur für ihre Replikation nutzen. Sowohl *in vitro*^{60,61} als auch *in vivo*⁶² wurde nachgewiesen, dass die Inhibierung der Autophagie zu einer signifikanten Reduktion der CVB Replikation führte. In der mit Mäusen durchgeführten Studie führte die spezifische Deletion des für die Autophagie essentiellen Gens ATG5 in pankreatischen Azinuszellen, zu einer 2000-fachen Verringerung der CVB3-Titer im Pankreas sowie einer deutlich geringeren Zerstörung des pankreatischen Gewebes⁶². Sowohl Polioviren als auch CVB benötigen die Autophagie zur Unterstützung ihrer Replikation, dennoch unterscheiden sie sich bezüglich ihres Verhaltens gegenüber der Bildung von Autolysosomen. Während Polioviren die Fusion von Autophagosomen mit Lysosomen induzieren, scheint CVB diese zu inhibieren, wohlmöglich um der lysosomalen Degradation zu entgehen^{61,63}. Die Stilllegung verschiedener spezifischer lysosomaler *soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor* (SNAR) Proteine, welche die Autolysosomenbildung regulieren, zeigte bislang keine eindeutigen Befunde, so dass die genaue Rolle der Autolysosomen für die Replikation von CVB unklar bleibt^{61,64}.

Die durch das Freiwerden der Virusnachkommenschaft beobachtenden starken morphologischen Veränderungen der infizierten Zellen werden als cytophatischer Effekt (CPE) bezeichnet⁶⁵. Der Replikationszyklus ist nach etwa sechs bis acht Stunden beendet und resultiert in der Entstehung von bis zu 10000 neuen Viruspartikeln je infizierter Zelle⁶⁶.

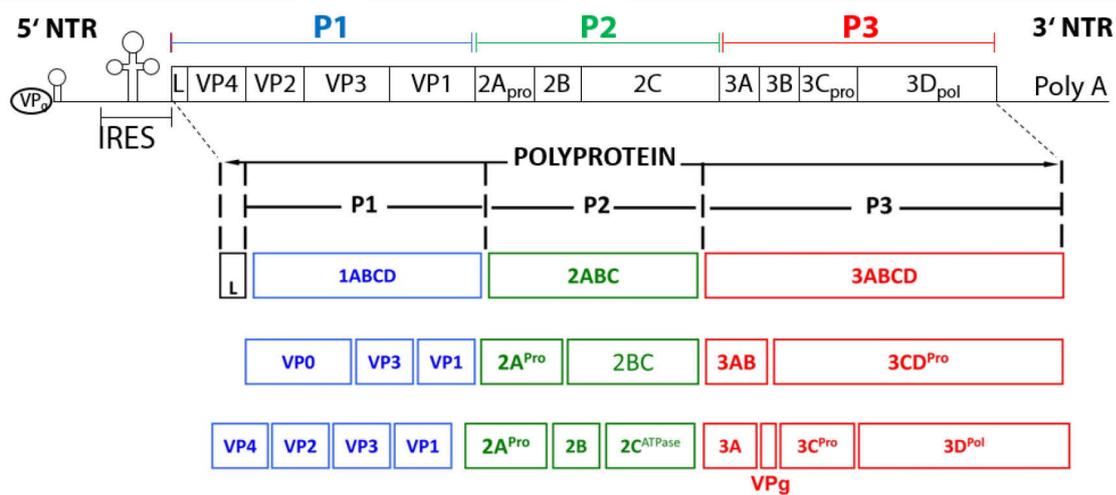


Abbildung 4: Aufbau des Picornavirus-Genoms und Prozessierung des Polyproteins.

Schematische Darstellung des Replikationszyklus von Picornaviren modifiziert nach¹⁹. [VP: Virales Protein, IRES: *internal ribosome entry site*; P: Protein, pol: Polymerase, Poly A: polyadenyliert; NTR: nichttranslatierte Region]

1.2 Pathogenität der Picornaviren (CVB3)

Infektionen mit Enteroviren resultieren in einem breiten Spektrum klinischer Krankheitsbilder, wie beispielsweise der aseptischen Meningitis und Meningoenzephalitis (CVA), der Myokarditis und Perikarditis (CVB und Echoviren), systemischer neonataler Infektionen (CVB, Echoviren), der Pankreatitis (CVB) aber auch respiratorischer Krankheiten (Rhinoviren, EC-68)⁶⁷. Trotz des pathogenen Potentials verlaufen 50 – 80% der nicht polioviralen Enterovirusinfektionen asymptomatisch⁶⁸. Dabei ist das Alter der Patienten stark mit dem klinischen Verlauf der Infektion assoziiert. Infektionen des Zentralnervensystems betreffen vornehmlich Kinder zwischen 5-15 Jahren, wohingegen sich die Myokarditis überwiegend bei 20-40 Jährigen manifestieren. Besonders schwere Infektionsverläufe treten dagegen bei Neugeborenen auf, die sich mitunter in sepsisähnlichen Erkrankungen, Myokarditen aber auch Infektionen des Zentralnervensystems äußern können⁶⁷.

1.2.1 Myokarditis im Menschen

Entzündliche Prozesse im Herzmuskel werden nach Soberheim im Jahr 1937 unter der Bezeichnung Myokarditis zusammengefasst und können sowohl akut als auch chronisch verlaufen⁶⁹. Die zugrunde liegenden Ursachen der Myokarditis sind sehr vielseitig und können in Abhängigkeit von den individuellen Konditionen und Prädispositionen sowie sozioökonomischer Faktoren des Betroffenen zu stark variierenden Ausprägungen und Krankheitsverläufen führen⁷⁰⁻⁷⁵. Aufgrund dessen, sowie der Tatsache, dass Myokarditen zum Teil auch asymptomatisch verlaufen können, gestaltet sich die klinische Diagnose der Myokarditis schwierig⁷⁶. Vorrangig leiden Betroffene unter Kurzatmigkeit, Thoraxschmerzen sowie oftmals damit einhergehender Perikarditis bzw. ventrikulärer Arrhythmie, die zur kurzzeitigen Bewusstlosigkeit und auch zum plötzlichen Tod führen kann^{77,78}. Prinzipiell erleiden Männer häufiger eine Myokarditis als Frauen, dennoch entwickeln ältere Frauen oftmals schwerere

Krankheitsverläufe, welche mit lebensbedrohlichen kardialen Dysfunktionen bis hin zum Herzversagen verbunden sein können^{79,80}. Die Symptomatik bei Kindern hingegen ist weniger eindeutig, da sie viele Parallelen zu anderen Kinderkrankheiten aufweist. Die Symptome können akutes Erbrechen, starke Kopf- und Bauchschmerzen sowie übermäßige Müdigkeit beinhalten^{81,82}. Neben nicht infektiösen Ursachen chemischer, physikalischer oder toxischer Natur stellen zahlreiche infektiöse Erreger, darunter Viren, Bakterien, Protozoen und Pilze, Auslöser der Myokarditis dar⁸³ (**Tab. 3**). Lag die Prävalenz der Myokarditis im Jahr 1992 bei etwa 8 / 100000 Erkrankten pro Jahr⁸⁴ wurde sie innerhalb des Zeitraumes von 1990 – 2013 bereits bei 22 / 100000 Patienten jährlich indiziert⁸⁵. Dabei werden etwa 20-25% durch virale Erreger verursacht⁸⁶. Darunter finden sich neben CVB auch Infektionen mit Adenoviren⁸⁷, dem Hepatitis C Virus⁸⁸, Cytomegaloviren oder dem humanen Immundefizienz-Virus⁸⁹.

Tabelle 2: Auslöser der Myokarditis. (modifiziert nach⁸³).

Infektiöse Ursachen	nicht infektiöse Ursachen
<p>RNA Viren: Picornaviren (Coxsackie A + B, Echoviren, Polioviren, Hepatitisviren), Orthomyxoviren (Influenza), Paramyxoviren (Respiratorische Syncytial-Virus, Mumps), Togaviren (Rubella), Flaviviren (Denguefieber, Gelbfieber)</p>	<p>Autoimmunerkrankungen: Dermatomyositis, inflammatorische Darmerkrankungen, Rheumatoide Arthritis, Sjögrens Syndrom, <i>Lupus erythematoses</i></p>
<p>DNA Viren: Adenoviren (A1, 2, 3 und 5), Enteroviren (1 (B19V) und 2), Herpesviren (humane Herpesviren 6 A/B, Cytomegalieviren, Epstein-Barr-Viren, Varicella-Zoster-Viren), Retroviren (HIV)</p>	<p>Medikamente: Aminophyllin, Amphetamine, Antracyclin, Catecholamine, Chloramphenicol, Kokain, Cyclophosphamid, Doxorubicin, 5-Fluoruracil, Mesylate, Methylsergite, Phenyntione, Zidovudine</p>
<p>Bakterien: Chlamydien (<i>Chlamydomphila pneumoniae/ psittacosis</i>), <i>Haemophilus influenzae</i>, Legionellen, Pneumophilien, <i>Brucella clostridium</i>, <i>Francisella tularensis</i>, <i>Neisseria meningitis</i>, Mykobakterien (Tuberkulose), Salmonellen, Staphylokokken, <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Streptococcus pneumonia</i>, Tularemia, Tetanus, Syphilis, <i>Vibrio cholera</i></p>	<p>Hypersensitive Reaktionen bei Medikamenten: Azitromycine, Benzodiazepine, Clozapine, Cephalosporine, Dapsone, Dobutamine, Lithium, Diuretika, Thiazide, Methyl dopa, Mexiletine, Streptomycine, Sulfonamide, Tetanustoxoide, Tetrazyklinen</p>
<p>Protozoen: <i>Entamoeba histolytica</i>, Leishmania, <i>Plasmodium falciparum</i>, <i>Trypanosoma cruzi</i></p>	<p>Hypersensitive Reaktionen bei Toxinen: Bienen, Vespene, Schwarze Witwe, Skorpione, Schlangen</p>

Innerhalb der Pathogenese der CVB verursachten Myokarditis spielt der Serotyp B3 die gravierendste Rolle, dennoch können auch die Serotypen B1, B2, B4 und B5 eine Myokarditis auslösen. Insbesondere in Amerika und Westeuropa treten Infektionen mit dem Serotyp B6 sehr selten auf^{82,90}. Primär replizieren CVB nach fäkal-oralen Aufnahme innerhalb des schleimhautassoziierten lymphatischen Gewebes des Pharynx, können bedingt durch ihre Säurestabilität den Magenraum passieren und

letztlich das lymphatische Gewebe des Gastrointestinaltraktes infizieren^{14,18,91}. Der Großteil der Infektionen verläuft asymptomatisch bzw. führt zu einem schwach ausgeprägten Krankheitsverlauf, welcher sich mitunter in erkältungsähnlicher Ausprägung, die teils von Durchfallerscheinungen begleitet wird, kenntlich macht^{23,82,92}. Die im Darm stattfindende Virusvermehrung, welche mit einer Virämie verbunden ist, kann sich jedoch abhängig von genetischen bzw. gesundheitlichen Dispositionen oder Komorbiditäten der betroffenen Personen sowie der Virulenz und dem Tropismus des Virusstammes systemisch über den Blutkreislauf ausbreiten^{4,82,93–95}. Diese sekundäre Virämie betrifft überwiegend Pankreas, Herz, Hirn und Muskelgewebe^{96–99}. Insbesondere bei Säuglingen kommt es zur systemischen CVB3-Manifestation, die aufgrund der Multiorganbeteiligung in etwa 50% der Fälle zum Tode führt. Im Gegensatz dazu erleiden gesunde Erwachsene überwiegend Infektionen des Myokards, die je nach individueller Kondition ohne Folgeschäden abklingen können^{82,94}. Ursächlich für den Krankheitsverlauf der CVB3-Myokarditis scheint die Interaktion zwischen Virus- und Wirtsfaktoren zu sein. Verschiedene Studien zeigten, dass u.a. die Schädigung der Myozyten infolge lytischer Virusreplikation^{65,100,101}, eine übermäßige proinflammatorische Immunantwort durch T-Lymphozyten^{94,102–104} sowie die Schädigung des Myokards über antikörpervermittelte Autoimmunreaktionen, entscheidend den Grad der Myokarditis beeinflussen^{105–108}. Adaptive Immunmechanismen grenzen die Infektion letztendlich ein und führen zur Eliminierung des Erregers, so dass eine vollständige Ausheilung erfolgt⁸². Gelingt keine vollständige Beseitigung des Virus kann es zu einer chronischen Inflammationsreaktion bzw. zu einer entzündungsfreien Persistenz von CVB3 in den T-Lymphozyten oder Makrophagen kommen. Bei der chronischen Myokarditis kann es, ausgelöst durch anhaltende proinflammatorische Prozesse und fortschreitende Fibrose, zu ventrikulären Funktionsstörungen kommen, die im schwersten Fall zu einer tödlich verlaufenden Herzinsuffizienz führen. Kardiale Dysfunktionen treten jedoch gleichsam innerhalb der akuten Myokarditis auf. Die DCM weist geringfügige bzw. keine entzündlichen Prozesse im Myokard auf, wobei trotz fehlender cytopathischer Effekte infolge der lytischen Virusfreisetzung eine Schädigung der Myozyten induziert wird^{77,109}.

1.2.2 CVB3-Myokarditis im Mausmodell

Die Rolle des Maus-CVB3-Myokarditismodells innerhalb der klinischen Forschung ist von immenser Bedeutung. Zahlreiche pathophysiologische Erkenntnisse der CVB induzierten Myokarditis beim Menschen beruhen auf Befunden aus Mausmodellen^{108,110–113}.

Basierend auf den Befunden zur CVB3 induzierten Myokarditis die aus Tierversuchen stammen, gibt es derzeit drei häufig genutzte Maus-Myokarditismodelle. Die experimentelle Autoimmunmyokarditis (EAM) wird durch Adjuvantien und kardiales Myosin induziert. Das Hybrid-CVB3-Modell, welches Ähnlichkeiten mit dem EAM aufweist, wird durch herzpassegiertes CVB3 und zerstörte Herzproteine ausgelöst. Das dritte, klassische Modell, welches auch als Grundlage für die Etablierung der

Pankreasattenuation der vorliegenden Arbeit benutzt wurde, zeichnet sich dadurch aus, dass CVB3 auf den Zellen kultiviert und aufgereinigt wird.¹¹⁴

Die immense strukturelle und funktionelle Ähnlichkeit des murinen CAR^{35,37} zu seinem humanen Analogon^{36,37} ermöglicht so vermutlich die Replikation humanpathogener CVB-Stämme in Mäusen. Kardiovirulente CVB-Stämme induzierten in genetisch prädisponierten Mäusen eine der humanen Myokarditis ähnliche Entzündung des Herzmuskels¹¹³.

Jedoch gibt es Unterschiede zwischen der humanen und murinen Präsenz der CVB-Infektion. Im Gegensatz zum Menschen ist im murinen Organismus, neben dem Herzen das Pankreas das für die CVB3-Infektion empfindlichsten Organ. Insbesondere das exokrine Pankreas ist sehr stark von inflammatorischen Prozessen betroffen^{95,115,116}. Verschiedene klinische Symptome, wie der starke Gewichtsverlust, das schmerzhafte Hochziehen des Bauches sowie schnell auftretende Todesfälle, können als direkte Folge der virusbedingten akuten Pankreatitis in Mäusen angesehen werden. Diese fulminante Ausprägung der Pankreatitis stellt für die Tiere eine extreme Belastung dar, welche im humanen Organismus in dieser Form nicht auftritt¹¹⁶. Ein weiterer gravierender Unterschied liegt darin, dass im Menschen die CVB3-Replikation im endokrinen Pankreas stattfindet, in Mäusen jedoch im exokrinen Pankreas.¹¹⁷

Der Verlauf der Krankheit hängt von verschiedenen Faktoren ab, wie dem verwendeten Mausstamm, dem Geschlecht, Gewicht und Alter der Tiere, dem Virusstamm bzw. daraus generierten modifizierten Virusvarianten sowie der Virusdosis^{95,115,118-120}.

Bezüglich ihres Virulenzphänotyps werden drei Typen von CVB3-Stämmen unterschieden, die als avirulent, pankreovirulent und kardiovirulent bezeichnet werden^{82,95}. Avirulente Stämme induzieren keine Inflammation im murinen Pankreas- und Herzgewebe und sind oftmals von einer geringeren Replikation begleitet. Pankreo- und kardiovirulente Stämme replizieren signifikant höher als avirulente. Dabei induzieren pankreovirulente Stämme inflammatorische Krankheiten im murinen Pankreas, wohingegen kardiovirulente Stämme zusätzlich eine Myokarditis verursachen. Dabei gilt jedoch, dass in Mäusen eine akute Myokarditis nicht in Abwesenheit einer Pankreatitis auftritt. Die Pankreatitis hingegen kann unabhängig von der Entwicklung einer Myokarditis induziert werden⁹⁵.

Die maximalen viralen Titer sind in vielen Organen etwa 2-4 Tagen nach der Infektion detektierbar bevor die Viren durch das murine Immunsystem bekämpft werden. Kardiovirulente CVB3-Stämme können jedoch bis zu 14 Tage nach Infektion im Herzen detektiert werden¹¹⁸. In Abhängigkeit vom Mausstamm können diese sowohl einen akuten als auch chronischen Verlauf der Myokarditis ausprägen. Während in C57BL/6 Mäusen intraperitoneal (i.p.) applizierte CVB3 während der akuten Myokarditis eliminiert werden, entwickeln A.BY/SnJ sowie SWR/J Mäuse eine chronische Erkrankung des Herzens durch die Persistenz der viralen RNA im Myokard aber auch in der Milz sowie in den Lymphknoten^{121,122}.

Die murine als auch die humane Myokarditis kann in 3 Phasen unterteilt werden, welche fließend ineinander übergehen, sodass sich Transitionsprozesse nicht immer eindeutig zuordnen lassen^{77,123}.

Während der initialen, akuten Phase infiziert das Virus die Zielzellen. Sie umfasst den viralen Eintritt sowie die Replikation des Virus und zudem die dadurch bedingte Aktivierung des Immunsystems. Die beobachtete Myokardschädigung beruht auf intrazellulären Vorgängen während der Virusreplikation, die zu einer Verformung der Zellkerne sowie Kondensation des Chromatins führen kann. Zudem kann es bedingt durch Veränderungen der Membranpermeabilität, aber auch durch viral induzierte proteolytische Prozesse innerhalb des Zytoskelettes, zur Zytolyse kommen. Diese Zellzerstörung ist mikroskopisch ersichtlich^{77,123,124}.

In der sich anschließenden subakuten, autoimmunen Phase erfolgt eine starke Antwort des angeborenen und adaptiven Immunsystems, welche infolge der anhaltenden sich negativ inotrop auswirkenden Zytokinfreisetzung und destruktiver Immunprozesse zu einer starken Schädigung des Myokards führen^{125,126}. Innerhalb der vorangehenden unspezifischen angeborenen Immunantwort kommt es zu einer starken Infiltration des Herzmuskelgewebes mit Makrophagen und Natürlichen Killerzellen (NK)^{118,124}, welche von der verstärkten Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine Tumornekrosefaktor alpha (TNF α), Interleukin-1beta (IL-1 β), IL-2 und IL-6 sowie Interferon gamma (IFN γ) bzw. auch antiinflammatorischer Zytokine wie IL-10 begleitet wird¹²⁷. Die sich anschließende adaptive Immunantwort erfolgt über zytotoxische T-Zellen und die Sezernierung spezifischer kreuzreaktiver Antikörper aus B-Zellen¹²⁸. Auch wenn diese Phase mit fulminanten Gewebsschädigungen verbunden ist, kommt es in der Regel im Verlauf zu einer Eindämmung der Infektion und der Eliminierung des Virus. In einigen Mausstämmen kommt es, ähnlich der humanen DCM, zu einer chronischen Phase der Infektion, die sich durch eine Remodellierung des Myokards auszeichnet, in der es, infolge zunehmender Dilatation, zu Funktionseinschränkungen und zur DCM kommen kann⁷⁰.

1.2.3 Antworten des angeborenen Immunsystems auf CVB Infektionen

Die angeborene Immunantwort stellt die initiale Welle schneller zelluläre Reaktionen des Immunsystems auf eindringende Mikroorganismen bzw. Fremdpartikel dar. Diese werden anhand sogenannter *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) erkannt, welche spezifisch für bestimmte Gruppen von Pathogenen, nicht jedoch für einzelne Erreger sind¹²⁹. Virus-spezifische PAMPs sind beispielsweise ssRNA¹³⁰, dsRNA¹³¹ oder unmethylierte CpG DNA¹³². Da die viralen Nukleinsäuren erst erkannt werden können, wenn sie sich frei zugänglich im Zytoplasma befinden, wird die angeborene Immunantwort ausgelöst nachdem die Virusinfektion bereits erfolgt ist. Die virusinduzierte Bildung und Freisetzung von Typ I Interferonen (IFN) stellt die häufigste Form der antiviralen Immunität dar, welche wiederum in der Expression antiviral wirkender Proteine in den umliegenden Zellen resultiert¹³³. Typ I IFN gliedern sich in verschiedene Subtypen von IFN α und eine Form von IFN β ¹³⁴. Coxsackieviren sind sensitiv gegenüber IFN β ¹³⁵. Sowohl in Typ I IFN-Rezeptor *Knockout* Mäusen¹³⁶ als auch in IFN β *Knockout* Mäusen¹³⁷ zeigte sich die protektive Rolle von Typ I IFN bzw. IFN β während der Frühphase der Infektion mit CVB3. Über die beiden zytosolischen Erkennungsrezeptoren *retinoic acid inducible gene I* (RIG-I) und *melanoma differentiation antigen 5* (MDA-5) bzw. den in den endosomalen Membranen lokalisierten *Toll-like*

Rezeptor 3 (TLR3, erkennt dsRNA) wird die Kinase IKK ϵ /TBK1 aktiviert, welche über die Phosphorylierung des Interferonregulierenden Faktors 3 (IRF-3) die Transkription von IFN β induziert^{138,139}. Für dessen Transkription sind zudem die Transkriptionsfaktoren *nuclear factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells* (NF- κ B), *activating transcription factor 2* (AFT-2) sowie *cellular-Jun* (c-Jun) nötig. Durch die Bindung von IFN β an die Typ I-Interferonrezeptoren der umliegenden Zellen erfolgt, vermittelt über den *janus activated kinase/signal transducers and activators of transcription* (Jak/STAT) Signalweg, die Expression verschiedener interferonstimulierter Gene und folglich die Bildung antiviraler Proteine, wie die der Proteinkinase R, welche wiederum der Virusvermehrung entgegenwirken^{140,141}. Korrelierend mit den Befunden der Typ I-Interferonrezeptor- und IFN β -Knockout-Mäuse zeigte sich in MDA-5¹⁴² und TLR3¹⁴³ defizienten Mäusen ebenfalls eine verstärkte Pankreatitis und erhöhte Letalität in der Frühphase einer CVB3-Infektion, wenngleich keine Veränderung der viralen Titer, sondern lediglich eine Verzögerung der Virusreplikation zu beobachten war. Demnach reduziert IFN β die Sterblichkeit während der CVB-Infektion unabhängig von der Beeinflussung der viralen Titer.¹³⁶ Die Aktivierung von IRF-3 erfolgt je nach Erkennungsrezeptor vermittelt über das Adaptorprotein *mitochondrial antiviral-signaling-protein* (MAVS; - MD5) bzw. *Toll/interleukin-1 receptor* (TIR)-*domain-containing adaptor protein inducing interferon beta* (TRIF; - TLR-3). Coxsackieviren wiederum sind in der Lage über die Protease 3C MAVS bzw. TRIF zu spalten und somit die IFN-Antwort zu unterbinden¹⁴⁴. Die ssRNA der Coxsackieviren wird über TLR7 und TLR8 erkannt, was zur Sekretion von Typ I IFN bzw. anderen proinflammatorischen Zytokinen wie IL-6 oder TNF α führt. Diese über TLR7/8 vermittelten Signalwege erfolgen, verglichen mit den über TLR3 bzw. MDA5 initiierten, spät innerhalb der Infektion¹⁴⁵⁻¹⁴⁷. Auch wenn CVB über verschiedene Erkennungsrezeptoren erkannt werden kann, scheint der TLR3 eine übergeordnete Rolle in der Erkennung dieses Virus zu spielen, da TLR3 defiziente Mäuse weder die CVB3- bzw. CVB4-Replikation kontrollieren konnten, noch die Aktivierung anderer alternativer Signalwege eine signifikante protektive Wirkung zeigte^{148,149}. Infektionen mit CVB3 zeigten, dass sowohl NK-Zellen, Makrophagen als auch dendritische Zellen an der Sekretion proinflammatorischer Zytokine bzw. von Mediatoren beteiligt sind¹⁵⁰⁻¹⁵². In Mäusen führte die Depletion von NK-Zellen zu erhöhten CVB3-Titern in Herz und Pankreas¹⁵³. Ein adoptiver Transfer von Makrophagen aus Wildtyp-Mäusen in mit CVB4 infizierte TLR3-*Knockout* Mäuse verringerte die kardiale Inflammation und resultierte in einer geringeren Sterblichkeit infolge der Infektion¹⁴⁸. In humanen Monozyten bewirkte die Infektion mit CVB3 die Freisetzung der pro-inflammatorischen Zytokine TNF α , IL-1 β und IL-6^{154,155}. Zudem entwickelten IL-6 defiziente Mäuse infolge einer CVB3-Infektion eine chronische autoimmune Myokarditis aus¹⁵⁶. Somit scheint ein Gleichgewicht zwischen Zeitpunkt, Menge und Dauer der Sekretion verschiedener Zyto- und Chemokine, welche infolge der CVB3-Infektion exprimiert werden, den Verlauf der Infektion bzw. die Ausbildung einer angemessenen antiviralen Immunantwort stark zu beeinflussen.

1.2.4 Antworten des adaptiven Immunsystems auf CVB Infektionen

Das adaptive Immunsystems agiert über zwei verschiedene Formen der Immunantwort¹⁵⁷. Die humorale Immunantwort erfolgt über die von den B-Lymphozyten produzierten Antikörpern, welche infektiöse Partikel binden^{147,157}. T-Lymphozyten hingegen erkennen über den T-Zell-Rezeptor, einen Proteinkomplexes auf ihrer Oberfläche, spezifisch Antigenfragmente, die ihnen über die *major histocompatibility complex* (MHC)-Moleküle anderer Zellen präsentiert werden¹⁵⁷. T-Zellen können anhand ihrer immunphänotypischen Oberflächenmerkmale, den *cluster of differentiation* (CD), die als Ko-Rezeptoren fungieren, in CD4+ und CD8+-T-Zellen unterteilt werden¹⁵⁸. CD8+-T-Zellen erkennen vom MHC-I-Komplex präsentierte Antigene und sezernieren daraufhin Perforine oder andere apoptotisch wirkende Substanzen, wohingegen CD4+-T-Zellen nur die über den MHC-II Komplex präsentierten Antigene erkennen. MHC-II Komplexe werden ausschließlich von spezifischen antigenpräsentierenden Zellen wie DCs, Makrophagen oder B-Zellen exprimiert, während MHC-I-Komplexe, bis auf wenige Ausnahmen, von allen Zelltypen in Säugetieren exprimiert werden¹⁵⁸.

CVB Infektionen induzieren eine starke humorale Immunantwort, bei der sowohl im Menschen¹⁵⁹ als auch im Mausmodell¹⁶⁰ in der frühen Infektionsphase zunächst spezifische Immunoglobuline der Klasse M (IgM) gebildet werden. Die spätere und persistente humorale Immunantwort wird maßgeblich über die Bildung von Immunoglobulinen der Klasse G (IgG) reguliert¹⁶⁰. Während sich im Menschen IgMs primär gegen das VP1 Protein richten¹⁵⁹, wurde das gleiche in Mäusen für IgGs gezeigt¹⁶⁰. Die Bildung großer Mengen von Antikörpern infolge einer CVB Infektion kann jedoch auch verstärkend auf die durch die Infektion induzierte Immunantwort wirken und zu einer Verstärkung der Infektion führen¹⁶¹. Eine adäquate Immunantwort kann demnach nur über eine streng regulierte Antikörperfreisetzung gewährleistet werden kann. Ob bzw. zu welchem Anteil CD4+-T-Zellen die B-Zell-vermittelten Antikörperreaktionen unterstützen ist bislang nicht eindeutig geklärt. In MHC-II defizienten Mäusen führte die CVB3-Infektion zur Produktion nicht neutralisierender CVB3-spezifischer IgGs¹⁶², wohingegen T-Zell defiziente Mäuse neutralisierende Antikörper bildeten^{104,163}. Die Bildung CVB3-spezifischer Antikörper erfolgt dabei geschlechtsspezifisch. So zeigten weibliche Balb/C-Mäuse eine über die T-Helferzellunterart 2 (Th2) -vermittelte vermehrte Bildung von IgG1-Antikörpern wohingegen männliche Tiere vermittelt über die T-Helferzellunterart 1 (Th1) IgG2a bildeten¹⁶⁴. B-Zell *Knockout* Mäuse schafften es nicht die CVB3-Infektion zu eliminieren, sie entwickelten chronische Infektionen begleitet von hohen Virustitern in verschiedenen Organen, was zu Krankheiten wie myokardialer Fibrose und ventrikulärer Dilation führte¹²⁸. Der Transfer von B- und T-Zellen aus CVB3 immunisierten Mäusen in B-Zell *Knockout* Mäuse zeigte, dass die B-Zellen während der nachfolgenden CVB3-Infektion entscheidender zur Immunantwort beitrugen als T-Zellen^{128,165}. Bereits 1995 zeigte die Gruppe um Geller *et al.*, dass der passive Transfer spezifischer Immunoglobuline in ein Kind, welches an akuter lymphatischer Leukämie litt und zudem eine CVB4 induzierte Meningoenzephalitis aufwies, die CVB-Titer senken konnte¹⁶⁶.

Mäuse die weder ausgereifte B- noch T-Zellen besitzen, entwickeln während einer CVB3-Infektion eine schwere, tödlich verlaufende Myokarditis, induziert durch extrem hohe virale Titer im Herzen¹⁶⁷. Der Beitrag von T-Zellen an der Immunantwort gegen CVB3-Infektionen unterscheidet sich dabei sehr stark innerhalb verschiedener Mausstämme. So zeigten T-Zell-defiziente Balb/C-Mäuse¹⁰⁴ verglichen zur Wildtypkontrolle keinerlei Veränderung der CVB Replikation, wohingegen T-Zell-defiziente NFR- und C3H-Mäuse erhöhte virale Titer aufwiesen^{168,169}. Auch für die T-Zell-Immunantwort zeigte sich, dass diese immunpathologisch wirkt, so dass trotz Verringerung der viralen Titer die Ausprägung der Myokarditis verstärkt wird. Im Gegensatz zu vielen anderen Virusinfektionen induziert CVB3 lediglich eine geringe primäre CD8+-T-Zellimmunantwort, welche jedoch nicht auf die geringe Immunogenität der CVB-Proteine zurückzuführen ist^{102,170-172}. Vielmehr verhindert das Virus die MHC-I-vermittelte Präsentation von Antigenen. Dennoch tragen CD8+-Gedächtnis T-Zellen, die bereits auf geringere Mengen von MHC-Peptiden reagieren als native CD8+-T-Zellen, zum Schutz vor CVB3-Infektionen bei¹⁷³. CVB nutzt dabei zwei Mechanismen um der MHC-I Epitopräsentation zu entgehen. Zum einen können die viralen Proteine 2B, 2BC und 3A eine Zerstörung des Golgi-Apparates und damit den Austritt von Proteinen an die Zelloberfläche verhindern. Zum anderen verstärken sie endozytotische Prozesse, was dazu führt, dass auf der Zelloberfläche präsentierte Proteine wieder internalisiert werden und somit unzugänglich sind¹⁷⁴⁻¹⁷⁹. Im Gegensatz dazu reicht die Menge an durch MHC-II präsentierten viralen Epitopen aus, um eine effiziente CD4+-T-Zellantwort zu induzieren, was aufgrund des Th1-basierten Zytokinprofils zur Ausprägung von CD4+-Gedächtnis T-Zellen führt¹⁷³.

1.2.5 Präventive und therapeutische Ansätze gegen CVB-Infektionen

Obwohl zahlreiche Strategien zur Generierung von Impfstoffe gegen CVB entwickelt wurden, darunter die Immunisierung mit inaktiviertem Virus, DNA-Plasmide, die virale Proteine exprimieren¹⁸⁰ oder attenuierte Lebendimpfstoffe¹⁸¹, existiert derzeit kein klinisch verfügbarer Impfstoff.^{181,182} Da sich RNA im Gegensatz zu DNA nicht in das zelluläre Genom integrieren kann, scheint der Einsatz RNA-basierter Vakzine sicherer zu sein. Ein von Hunziker *et al.* generierter RNA-basierter CVB-Impfstoff schützte Mäuse zwar vor der CVB3-Infektion, führte jedoch nicht zur Bildung neutralisierender Antikörper¹⁸³. Eine 2004 von Yanagawa *et al.* bzw. 2006 von Lim *et al.* beschriebene neuartige Strategie, die sowohl für die therapeutische als auch prophylaktische Anwendung geeignet ist, basiert auf löslichen Virusrezeptorfusionsproteinen, welche in Mäusen sowohl die CVB-Titer als auch das Ausmaß der kardialen Inflammation sowie der fibrotischen Veränderungen reduzieren konnte^{184,185}. Eine weitere Strategie basiert auf der Verabreichung von Immunglobulinen, welche aufgrund der resultierenden mitunter nur geringen Antikörpertiter sowie auftretender intratypischer Variation gegen bestimmte Serotypen kontrovers diskutiert wird¹⁸⁶.

In therapeutischen Ansätzen finden antivirale Substanzen wie Ribavirin, welches ursprünglich als Anti-Picornavirusagenz entwickelt wurde und die Bindung der Virionen an die Wirtszellen unterbindet^{187,188} bzw. Pleconaril, welches eine starke antivirale Wirkung gegen CVB-Stämme mit Isoleucin bzw. Valin

an Position 1092 in der VP1-Region aufweisen¹⁸⁹, Verwendung. Ein neueres antivirales Generikum ist der Inhibitor TP219. Dieser bindet und depletiert zelluläres Glutathion, was dazu führt, dass das Virusassembly, nicht aber die Replikation des Virus unterbunden wird. Intraconazol, ein Breitbandinhibitor von Enteroviren, interferiert mit den Oxysterol-Bindeproteinen, was dazu führte, dass während der Formation viraler Replikationsorganellen der Transport von Cholesterin und Phosphatidylinositol-4-Phosphat zwischen den Membranen verhindert und somit die Enterovirusreplikation inhibiert wurde¹⁹⁰.

Neben besagten antiviralen Therapeutika, welche überwiegend in die Klasse antiviraler Breitbandwirkstoffe einzuordnen sind, behandelt ein Großteil der therapeutischen Maßnahmen ausschließlich Symptome, die durch CVB-Infektionen hervorgerufen werden können, wie beispielsweise die Herzinsuffizienz bzw. auftretende Herzrhythmusstörungen.

Ein weiterer neuartiger Ansatz zur spezifischen Abwehr von CVB-Infektionen stellt die Nutzung RNA-Interferenz (RNAi) basierter Strategien dar. Dabei können die Therapieansätze sich sowohl gegen virale, für die Virusreplikation essentielle Gene bzw. gegen zelluläre Gene, welche im Lebenszyklus der Viren eine Rolle spielen, richten. 2005 zeigten Yuan *et al.*, dass die CVB-Infektion in HeLa-Zellen und murinen Kardiomyozyten durch den Einsatz einer *small interfering* RNA (siRNAs) gegen die Protease 2A verringert wird¹⁹¹. Ebenfalls 2005 zeigten Merl *et al.*, dass in Mäusen eine siRNA, die sich gegen die 2A-Region von CVB richtet, die Virustiter verringert und das Überleben der Mäuse verlängert. Auch siRNA-Moleküle, welche gegen die 3C^{Pro}-Region von CVB gerichtet sind, verringerten die Virusreplikation¹⁹². Um zu verhindern, dass RNA-Viren, welche schnell Mutanten ausbilden können, resistent gegen den Einsatz von siRNA Molekülen werden (*Escape*-Mutanten), wurden mitunter drei verschiedene siRNA-Moleküle kombiniert. Ein anderer Ansatz zielt darauf ab die Bildung zelleigener Proteine, welche für die Virusreplikation essentiell sind, mittels spezifischer siRNAs zu reduzieren. So reduzierte der Einsatz einer CAR-spezifischen siRNAs die CVB3-Replikation¹⁹³. Spezifische präventive bzw. therapeutische Ansätze gegen CVB3 konnten bislang klinisch nicht etabliert werden, sind jedoch in Anbetracht der hohen Morbidität bei immunsupprimierten Patienten und Kleinkindern von ökonomischer und klinischer Relevanz¹⁹⁴.

Um den Einsatz RNAi-basierter Therapiemaßnahmen im Menschen zu evaluieren laufen derzeit etwa 20 klinische Studien bezüglich deren Sicherheit und Verträglichkeit. Lediglich eine dieser klinischen Studien beinhaltet ein microRNA (miRNA) Therapeutikum, welches von der dänischen Firma Santaris Pharma entwickelt wurde. SPC3649 (miravirsin) inhibiert die miRNA-122 (miR-122)¹⁹⁵. Einige andere miRNA-Therapeutika befinden sich jedoch derzeit in vorklinischen Studien und zeigen vielversprechende Ergebnisse. Den Großteil derzeitiger RNAi-Therapeutika in klinischen Studien stellen siRNAs dar, die überwiegend innerhalb der Krebstherapie bzw. in verschiedenen degenerativen Erkrankungen getestet werden. Innerhalb der Infektionsforschung konnten hinsichtlich RSV-Viren bereits zwei Phase 1 Studien erfolgreich in gesunden Probanden abgeschlossen werden¹⁹⁶. Basierend darauf evaluiert Alnylam Pharmaceuticals (Cambridge, MA, USA) aktuell in einer klinischen Studie der

Phase 2b die anti-RSV-Aktivität sowie die Verträglichkeit und Sicherheit von ALN-RSV01 in erkrankten Probanden¹⁹⁷.

1.3 Genregulation durch nichtkodierende RNAs

1.3.1 *Small-interfering RNA* and *microRNA*

Nichtkodierende RNAs sind RNAs, welche keine Proteine kodieren. Bevor die Rolle der nichtkodierenden Genomregionen erforscht wurde, sah man sie fälschlicherweise zunächst als nichtfunktionelle Einheiten an¹⁹⁸. Durch die Entwicklung neuartiger molekularbiologischer Technologien war es im Zuge der Genomsequenzierung möglich, neue Klassen nichtkodierender regulatorischer Elemente zu identifizieren. Die Bedeutung und Funktionen dieser nichtkodierenden RNAs wurden bedeutsamer als ursprünglich erwartet, als sich zeigte, dass sie über die Modulation der Genexpression Einfluss auf die Ausprägung des Phänotyps nehmen können^{199,200}. Basierend auf der Länge ihrer Sequenz unterscheidet man zwischen langen (>200nt) und kurzen (< 200 nt) nichtkodierenden RNAs. Zu den kurzen nichtkodierenden RNAs zählen unter anderem siRNAs und miRNAs²⁰¹, die sich wie **Tabelle 4** zeigt, bezüglich ihrer morphologischen und funktionellen Eigenschaften unterscheiden. Beide Typen kurzer nichtkodierender RNAs spielen eine besondere Rolle bei der Genregulation und stehen daher im Interesse zahlreicher Untersuchungen²⁰². Das therapeutische Potential dieser Moleküle konnte bereits für verschiedene Krankheiten nachgewiesen werden, darunter Krebs und Infektionskrankheiten²⁰³⁻²⁰⁵.

Tabelle 3: Eigenschaften der siRNAs und miRNA (modifiziert nach²⁰²).

	siRNA	miRNA
Prozessierung durch Drosha im Nukleus	entfällt	Polycistronisches Primär-Transkript (pri-miRNA) wird von RNase III (Drosha) in Vorläufer miRNA (pre-miRNA) gespalten
Prozessierung durch Dicer im Zytoplasma	Doppelsträngige RNA (30-100 bp)	Vorläufer miRNA (pre-miRNA) 70-100 bp lang mit Nichtübereinstimmungen, Hairpinstruktur
Struktur	RNA-Duplex aus 21-23 Nukleotiden mit jeweils 2 Nukleotiden-Überhang am 3' Ende	RNA-Duplex aus 19-25 Nukleotiden mit jeweils 2 Nukleotiden-Überhang am 3' Ende
Komplementarität	Vollständig Komplementarität	Unvollständige Komplementarität
Mechanismus der Genregulation	Endonukleolytische Spaltung der mRNA	Translationsrepression Degradation von mRNA
Ziel-mRNA	Eine	Mehrere (über 100 gleichzeitig)
Anwendung	Therapeutisches Mittel	Therapeutisches Mittel Diagnostik und Biomarker

Im Vergleich zu konventionellen kleinen therapeutischen Molekülen bieten siRNAs und miRNAs den Vorteil der spezifischen, personalisierten Therapiemöglichkeit²⁰⁶. Darüber hinaus können theoretisch gegen alle Gene zielgerichtet therapeutische siRNAs designt werden.

1.3.2 RNA-Interferenz

Bei der RNA-Interferenz (RNAi) handelt es sich um einen natürlich vorkommenden, zellulären Prozess, welcher eine wichtige Rolle bei der Regulierung der Genexpression spielt und durch die sequenzspezifische Bindung an die mRNA zum Translationsstop bzw. zur Degradation der mRNA führt²⁰⁷. Der Mechanismus der RNAi wurde erstmals im Jahr 1998 von Fire und Mello beschrieben. Sie beobachteten, dass die Injektion kleiner Mengen von dsRNA verglichen mit der Injektion großer Mengen von Antisense-Transkripten in *Caenorhabditis elegans* ein stärkeres *Silencing* der Genexpression bewirkte²⁰⁸. Dieser Vorgang konnte 2001 auch für Säugetiere nachgewiesen werden²⁰⁹. Prinzipiell verläuft die RNAi nach einem definierten Muster. Dafür wird dsRNA entweder von zellulären Genen transkribiert oder von außen in die Zellen eingeführt (**Abb. 5**). Diese dsRNAs werden vom Ribonuklease (RNase) III-like Enzym, welches auch als *Dicer* bezeichnet wird, im Zytoplasma zu doppelsträngigen siRNAs prozessiert. Die 21-23 nt langen siRNAs interagieren mit dem sogenannten *RNA induced silencing complex* (RISC) und aktivieren diesen. RISC ist ein Multiproteinkomplex, der unter anderem die Endonuklease *Argonaute 2* (AGO2) enthält, welche den *passenger*-Strang vom Leitstrang der dsRNA trennt und abbaut. Der Leitstrang assoziiert mit dem RISC und erhält so seine Spezifität. Dadurch kann RISC über die Sequenz des Leitstranges spezifisch an komplementäre Sequenzen in der mRNA binden. AGO2 schneidet dann in der Mitte der hybridisierten Sequenz die Ziel mRNA, so dass spezifisch ein Gen stillgelegt wird (**Abb. 5**)^{207,210}.

Die durch die miRNAs vermittelte Stilllegung von Genen verläuft ähnlich zu der von siRNAs posttranskriptional. MiRNA-Gene werden im Zellkern mittels Polymerase II transkribiert, es entstehen lange ds *stem-loop* Strukturen, die sogenannten primären miRNAs (pri-miRNAs). Die pri-miRNAs werden durch den Drosha-Komplex in 70-100 nt lange Duplexstrukturen prozessiert, den *precursor* miRNAs (pre-miRNAs). Diese pre-miRNAs werden durch das Transportprotein Exportin-5 über die Poren der Kernmembran in das Zytoplasma transportiert, wo diese durch den *Dicer*-Komplex zu 18-25 nt langen Fragmenten prozessiert werden. Der miRNA-Duplex assoziiert mit RISC zu miRISC. Im Anschluss wird das miRNA-Duplex entwunden und der *passenger*-Strang über AGO2 abgetrennt. Der aktivierte miRISC kann nun spezifisch an die Ziel-mRNAs binden. Dabei bindet miRISC bevorzugt Zielstrukturen am 3-Ende (3'UTR) innerhalb der mRNA und führt über den RNAi-Mechanismus zum Abbau der mRNA bzw. zum Translationsabbruch. Bei einer vollständigen Komplementarität zwischen der mRNA-Sequenz und miRISC kommt es zum Abbau der mRNA, während die in Säugerzellen häufiger auftretende unvollständige Komplementarität zum Translationsabbruch führt^{211,212}. Seltener können auch die 5'UTR^{213,214} bzw. proteinkodierende Bereiche^{215,216} Bindungsstellen darstellen. So

zeigte Duursma *et al.*, dass die miRNA-148 an die für das humane DNA-Methyltransferase 3b (DNMT3b)-Protein kodierende Region binden kann²¹⁵.

Bislang wurden mehr als 1000 zelluläre miRNAs gefunden, die etwa 30% aller tierischen Gene posttranskriptional regulieren²¹¹. Diese Regulation betrifft zahlreiche biologische Mechanismen, einschließlich Proliferation, Differenzierung, Apoptose sowie die pathogeninduzierte Immunantwort. Dabei wirken einige zelluläre miRNAs direkt auf die virale Replikation. Beispielsweise begünstigt die spezifisch in der Leber exprimierte zelluläre miRNA-122 die Replikation des Hepatitis C-Virus²¹⁷, wohingegen das Humane Immunodefizienz Virus-1 (HIV-1) aktiv die Expression des polycystronischen miRNA Clusters miRNA-17/92 unterdrückt um effizient replizieren zu können²¹⁸. Nelson *et al.* zeigten, dass die CVB3-Infektion eine verstärkte Expression der miRNA-21 bewirkt, was zu einer Degradation von Desmin und so zu einer Zerstörung der Desmosomen in HL-1-Zellen und in den Kardiomyozyten männlicher A/J-Mäuse führte²¹⁹. Auch die Gruppe um Tong *et al.* zeigte den Einfluss einer miRNA auf die Pathogenität von CVB3 in Balb/C-Mäusen²²⁰. Hier wurde nachgewiesen, dass die miRNA-10a* (*passenger* Strang des miRNA-Duplex, auch als *star strand* bezeichnet) sich gegen die kodierende Sequenz der 3D-Polymerase richtet, was zu einer positiven Genregulation und so zu einer verstärkten Biosynthese des Virus führte²²⁰. In CVB3 infizierten Mäusen verstärkte die miRNA-155 die überschüssige inflammatorische Immunantwort und somit die Schädigung des Myokards. Die Inhibierung der miRNA-155 wiederum, resultierte in einer geringeren Schädigung des Myokards in der akuten Phase der Myokarditis in den Mäusen. Daher eignet sich die miRNA-155 als potentiell therapeutisches Mittel zur Regulation der CVB3 induzierten Myokarditis.²²¹ Wiederum kodieren einige dsDNA Viren, wie das Herpes Simplex Virus-1²²² oder das Epstein-Barr-Virus²²³, miRNAs, welche die virale als auch die zelluläre Genexpression regulieren können.

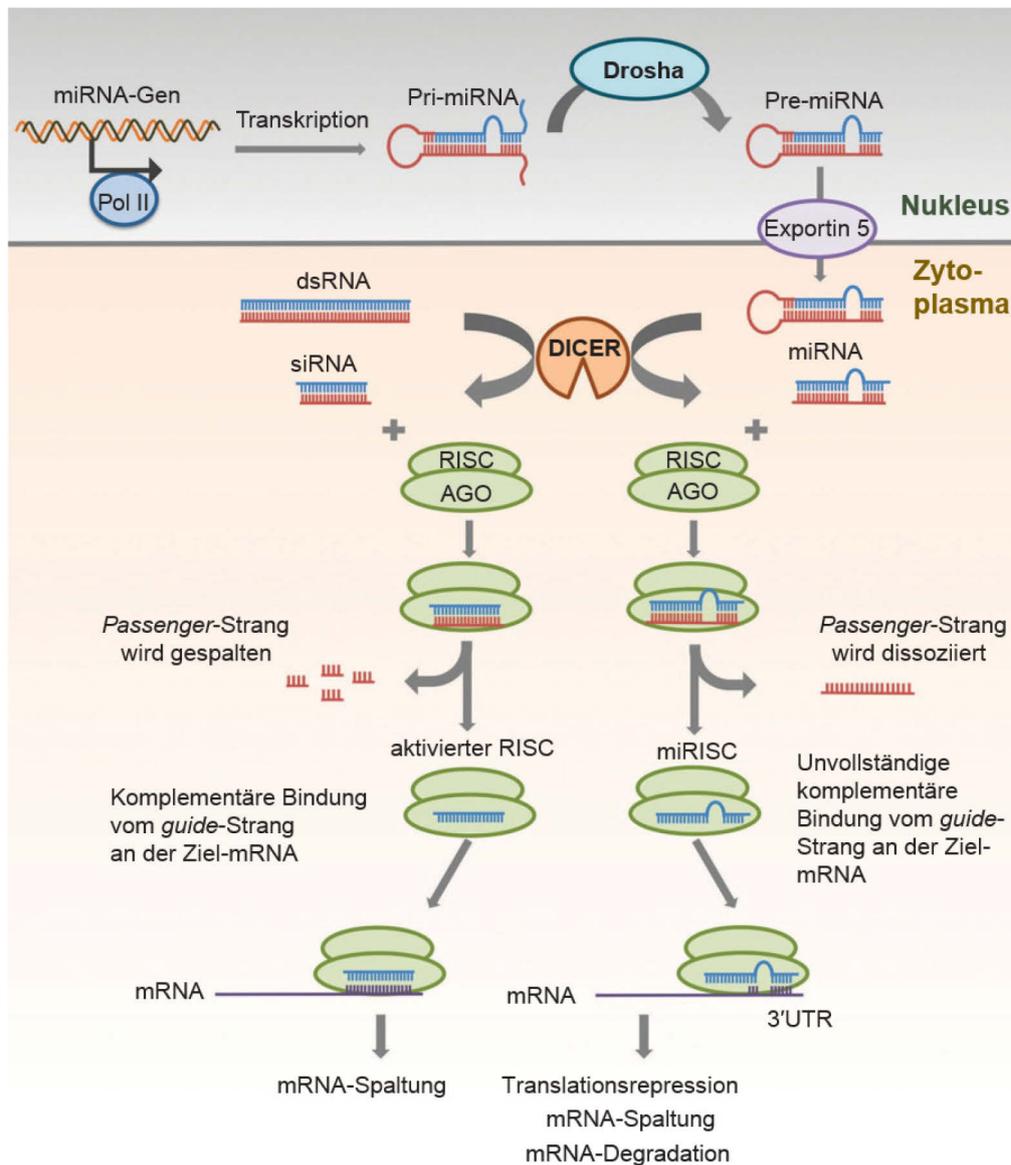


Abbildung 5: Mechanismus der RNA-Interferenz.

Schematische Darstellung des RNA-Interferenz Mechanismus modifiziert nach²⁰². [miRNA: microRNA, siRNA: *small-interfering* RNA; Pri-miRNA: primäre miRNA, Pre-miRNA: *precursor* miRNA; ds: doppelsträngig, DICER: Ribonuklease (RNase) III-like Enzym; RISC: *RNA induced silencing complex*; AGO: Argonaute 2 (Endonuklease); UTR: Nichttranslatierte Region, mRNA: *messenger* RNA]

1.3.3 Insertion von miRNA-Zielsequenzen zur Regulation der viralen Pathogenese bzw. des viralen Tropismus

Innerhalb der letzten Jahre etablierte sich die Insertion sogenannter artifizieller miRNA-Zielsequenzen (*target sequences*, TS) in ein Transgen als vielversprechende Strategie innerhalb verschiedener gentherapeutischer Ansätze²²⁴. Durch die Bindung der miRNAs an die inserierten miRNA-TS kommt es zu einer posttranskriptionalen Stilllegung des entsprechenden mRNA-Transkriptes, gegen das sie gerichtet sind. Diese Methode der Genregulation basiert auf dem in Kapitel 1.3.2. beschriebenen

Mechanismus der RNAi^{225,226}. Dabei werden die miRNAs herkömmlicherweise aus der pri-miRNA prozessiert, welche über haarnadelförmige Faltung *stem-loop* Strukturen ausbildet. Die pri-miRNA wird über RNase-Proteine im Nukleus als auch im Zytosol in kurze RNA-Duplexstrukturen, bestehend auf Leit- und Folgestrang, prozessiert^{212,227-229}. Der Leitstrang wird in RISC integriert, während der Folgestrang, in der Literatur auch als miRNA* bezeichnet, abgebaut wird²³⁰. Alternativ können jedoch auch beide Stränge der RNA-Duplex zu funktionellen reifen miRNAs werden²³¹⁻²³³. Die miRNA assoziiert im RISC mit einem der AGO-Proteine und führt über Basenpaarung mit der entsprechenden mRNA zur Repression der Proteinsynthese bzw. aktivieren einige miRNAs auch die Translation der entsprechenden mRNA^{211,234}. Während sich die TS in Pflanzen überwiegend in proteinkodierenden Regionen befinden, liegen sie in Tieren meist als sich wiederholende Sequenzfolgen in der 3'UTR der mRNA^{215,235,236}. Die Spezifität der Bindung von miRNA und mRNA beruht auf der perfekten Übereinstimmung zwischen der *seed* Sequenz der miRNA und der entsprechenden mRNA. Die *seed*-Region ist eine konservierte Sequenz, welche sich an Position 2-7 oder 2-8 des 5'-Endes der miRNA befindet^{211,236,237}. MiRNAs, welche die gleiche *seed*-Sequenz besitzen gehören zur selben miRNA-Familie und regulieren die gleichen mRNA-Transkripte^{235,238}. Neben der Übereinstimmung der *seed*-Sequenz wird in Tieren die miRNA-mRNA-Interaktion durch die Nichtübereinstimmung zwischen den Nukleotiden an Position 9-12 am 5'-Ende der miRNA reguliert, welche wahrscheinlich die AGO2-vermittelte Spaltung der entsprechenden mRNA verhindern^{239,240}. Zudem reicht die Übereinstimmung der *seed*-Sequenz der miRNA mit der entsprechenden mRNA allein nicht zwangsläufig für die Genrepression aus, so dass zusätzlich eine Komplementarität im Zentrum oder im 3'-Bereich der miRNA zur Stabilisierung der miRNA-Bindung erforderlich ist. Durch suboptimale Übereinstimmung in der *seed*-Region werden insbesondere Komplementaritäten der Nukleotide an Position 13-16 der miRNA bedeutend^{235,239}. Zusätzlich gilt, dass eine Adenosin-Uracil-reiche Nukleotidsequenz in der Nähe der Zielsequenz die Repression verstärkt²³⁹. Auch wenn für die meisten TS-vermittelten gentherapeutischen Ansätze eine perfekte Komplementarität zwischen TS und miRNA erforderlich ist, zeigten beispielsweise die Studien von Geisler *et al.* und Denzler *et al.*, dass eine nicht perfekte Übereinstimmung zwischen TS und miRNA eine verstärkte Repression verursachen^{241,242}.

Durch die Insertion geeigneter miRNA-TS in ein Transgen kann so die Expression der entsprechenden mRNA durch über den RNAi-Mechanismus supprimiert bzw. reguliert werden. Normalerweise vermittelt der Leitstrang der miRNA die Genrepression, sodass die entsprechende artifizielle miRNA-TS in die jeweilige Expressionskassette des Transkripts inseriert wird. Kim *et al.* zeigten jedoch, dass auch der passenger Strang der miRNA zur Regulation der Genexpression befähigt ist²⁴³.

Die Wirksamkeit der miRNA-regulierten Transgenexpression hängt von unterschiedlichen Faktoren ab. So beeinflussen die zell- bzw. gewebespezifische Expression der miRNAs^{238,244} sowie das Expressionslevel der jeweiligen miRNA²⁴⁵ den Erfolg der Regulation. Generell gilt, dass stärker exprimierte miRNAs zu einer stärkeren Suppression der Zielsequenz führen²⁴⁶, dennoch verläuft die Relation zwischen miRNA-Expression und der Repressionseffektivität nicht linear²⁴⁷. Brown *et al.*

definierten, dass mindestens 100 Kopien der entsprechenden miRNA / pg sRNA nötig sind, um die Repression des mit TS modifizierten Transgens zu erzielen²⁴⁸. Wiederum besitzt nicht zwangsläufig jede stark exprimierte miRNA den gleichen Effekt auf die Transgenexpression bzw. können unterschiedlich stark exprimierte miRNA teilweise den gleichen Repressionseffekt aufweisen²⁴⁷. Dennoch wird die entsprechende miRNA idealerweise stark in dem Zielgewebe exprimiert in welchem das Transgen reprimiert werden soll und nur schwach bis gar nicht in Geweben wo dessen positive Expression gewünscht ist²⁴⁹.

Neben der Auswahl der geeigneten miRNA beeinflusst die Anzahl der Sequenzwiederholungen^{241,250} der inserierten miRNA-TS bzw. die Kombination unterschiedlicher miRNA-TS^{241,251} die Effektivität des De-Targetings. MiRNA-TS sollten vornehmlich in einer nicht zur Ausbildung von Sekundärstrukturen neigenden Region des Transgens inseriert werden²⁵². Doch auch wenn die 3'UTR weniger zur Ausbildung besagter Strukturen neigt, wurden auch in der 5'UTR erfolgreich miRNA-TS inseriert^{253,254}. Zusätzlich zu dem bereits erwähnten positiven Effekt Adenosin-Uracil-reicher Regionen für die Insertion von miRNA-TS demonstrierten Grimson *et al.*, dass deren Insertion in unmittelbarer Nähe eines Stopcodons wenig effektiv ist²³⁹. Mehrere Studien zeigten, dass eine Erhöhung der Kopienzahl der inserierten miRNA-TS bis zu einer bestimmten Anzahl zu einer Verstärkung der Repression führt. In HuH7-Zellen erhöhte sich der Effekt der Transgenrepression durch die miRNA122a um etwa 12 % bei der Erhöhung der miRNA-TS-Anzahl von eins auf drei. Wiederum verstärkte sich der Effekt nur um knapp 3 % wenn sechs miRNA-TS inseriert wurden²⁴⁶. Auch bei der Anzahl der miRNA-TS spielt die Zielzelle eine Rolle für die Effektivität der Transgenrepression. In Thymozyten unterschied sich die Effektivität der Repression zwischen zwei und vier inserierten miRNA-181-TS nicht, wohingegen in peripheren T-Zellen die Repression durch vier miRNA-181-TS verstärkt wurde²⁵⁵. Da zu hohe Kopienzahlen der inserierten miRNA-TS zu unerwünschten Effekten wie Übersättigung oder der durch die Ziel-RNA vermittelten Degradation der entsprechenden miRNA führen können²⁵⁶⁻²⁵⁸, kann die Insertion von miRNA-TS verschiedener miRNAs die Wirksamkeit der Repression verstärken^{248,251}. Insbesondere in Vektoren mit einem sehr kleinen Genom, die in ihrer Verpackungsgröße limitiert sind, kann der Einsatz multipler miRNA-TS problematisch sein²⁵⁹⁻²⁶¹. Zudem erhöht der Einsatz zu vieler miRNA-TS die mögliche Ausbildung von Sekundärstrukturen, welche so die Zugänglichkeit der miRNA-TS zu RISC unterbinden²⁶². Weitere Punkte, welche die Wirksamkeit der miRNA-TS-Insertion beeinflussen, sind die Position der Insertion in das Genom bzw. in das Transkript sowie der Abstand zwischen den mehrfach inserierten miRNA-TS-Kopien²⁶³. Auch wenn gezeigt wurde, dass die Insertion unmittelbar aufeinanderfolgender perfekt komplementärer miRNA-TS sehr wirksam sein kann^{264,265}, kam es bei nicht perfekter Übereinstimmung zu sterischen Hinderungen bei der Bindung und somit zu einer Verringerung der Repression^{265,266}. Zu lange Sequenzen zwischen den miRNA-TS-Kopien können jedoch zur Ausbildung von Sekundärstrukturen führen. Prinzipiell gelten drei bis sechs miRNA-TS-Kopien mit 4-10 Nukleotiden zwischen den

einzelnen Kopien als empfehlenswert, jedoch ist bei der Insertion von miRNA-TS von unterschiedlichen miRNAs eine geringere Kopienzahl ausreichend²²⁴.

Brown *et al.* konnten 2007 erstmals zeigen, dass Transgene, denen miRNA-TS in die 3'UTR inseriert wurden von den korrespondierenden miRNAs effizient abgebaut wurden²⁴⁸. Dafür inserierten sie in ein GFP-Konstrukt TS, welche von der spezifisch in humanen, embryonischen Stammzellen exprimierten miRNA-372 erkannt werden. Ausschließlich während differenzierter Stadien, in denen die miRNA-372 nicht exprimiert wird, konnte GFP detektiert werden²⁰⁸. Um *off-target* Effekte in gesunden Geweben zu vermeiden bzw. um lediglich ausgewählte Zell- bzw. Gewebetypen zu adressieren, ist es bei der miRNA vermittelten Suppression einer mRNA entscheidend, eine für die jeweilige Anwendung (Krankheit, Gewebe, Differenzierungsgrad etc.) spezifische miRNA auszuwählen. Neben der Auswahl solcher natürlich vorkommender miRNAs zeigten Hirose *et al.* kürzlich das Potential der Kombination aus TS-vermittelter Suppression und miRNA-responsiver sich wiederholender kurzer palindromischer Sequenzen, den *clusterd regularly interspaced short palindromic repeats* (CRISPR) und den CRISPR-assoziierten Systemen (Cas) für die Regulation gentherapeutischer Modulationen. Sie inserierten TS für die miRNA-21 bzw. für die miRNA-302 in die 3'UTR der Cas9-mRNA (miRNA-Cas9 switch) und zeigten in HeLa-Zellen (miRNA-21 positiv) sowie in humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (miRNA-302 positiv) zur regulierten, zelltypspezifischen Attenuierung der Cas9-Aktivität in heterogenen Zellpopulationen²⁶⁷. Für eine Vielzahl gentherapeutischer Anwendungen, wie beispielsweise die Ursachenforschung von Erbkrankheiten, ist es nötig, eine spezifische Zellpopulation zu adressieren, so dass die gewählte miRNA spezifisch für deren Abstammung- bzw. Differenzierungsstatus sein muss²⁴⁸. Induzierte pluripotente Stammzellen ermöglichen die gezielte Analyse krankheitsspezifischer Zellen bzw. den Einsatz autologer Zellen für die Behandlung degenerativer Erkrankungen²⁶⁸. Basierend auf der differentiellen Expression der reifen miRNA-let7a in pluripotenten und sich differenzierenden bzw. differenzierten Zellen konnten mittels eines lentiviralen Systems, welches auf der Insertion eines Fusionskonstruktes aus miRNA-let7a-TS und GFP basierte, patientenspezifisch induzierte pluripotente Stammzellen isoliert werden. Potentiell ermöglicht dieser Ansatz zudem die verlängerte Aufrechterhaltung der Pluripotenz²⁶⁸. Ein weiteres Anwendungsfeld der miRNA-TS vermittelten Transgenregulation stellt die Regulation des Tropismus tumorspezifischer onkolytischer Viren dar²⁶⁹. Dabei nutzt man die Tatsache, dass virale Proteine zu einer Inflammation in den entsprechenden Zellen und deren Tod führen können. Durch den Einsatz tumorspezifischer Viren kann so der Tod der entarteten Krebszellen vermittelt werden. Der Einsatz von miRNA-TS ermöglicht dabei die kontrollierte Replikation der onkolytischen Viren, ohne dass diese durch das wirtseigene Immunsystem attenuiert werden²⁷⁰. Onkolytische Adenoviren welche durch die Insertion von miRNA-E1ATS modifiziert wurden, zeigten in murinen Hirntumormodellen eine hohe antitumorale Aktivität und konnten gleichzeitig lang und effektiv in den Gliomen replizieren²⁷¹. Die Modifikation onkolytischer Adenoviren mittels miRNA-TS-Insertion wurde unter anderem für die konditionierte Replikation in der Leber (miRNA-122a²⁵³, miRNA-199a²⁷²), im Pankreas (miRNA-216a, miRNA-

148a²⁷³) sowie in diversen weiteren Strategien verwendet²²⁴. Auch in anderen onkolytischen Viren, wie dem Herpes Simplex Virus²⁷⁴ oder dem Vaccinia Virus²⁷⁵, konnte durch die Insertion von entsprechenden miRNA-TS die virale Pathogenität für den Wirt reduziert werden, ohne dabei das onkolytische Potential zu verringern. Zudem kann der Einsatz von miRNA-TS zur Erhöhung der Sicherheit viraler Impfstoffe beitragen, was bereits mehrfach für Polioviren, Influenza A Viren oder aber Flaviviren nachgewiesen wurden²⁷⁶.

In Coxsackieviren wurde diese neue Technologie erstmals 2008 von Kelly *et al.* genutzt, um die Replikation eines Virus gewebsspezifisch zu supprimieren²⁰³. Hierzu wurden die miRNA-TS der muskelspezifischen miRNA-133 und miRNA-206 in die 3'UTR des Coxsackievirus A21 (CVA21)-Genom inseriert. Das rekombinante CVA21 wies typische Replikationseigenschaften in Zellen bzw. Geweben auf, welche die miRNA-133 und miRNA-206 nicht exprimierten. Hingegen replizierte das modifizierte CVA21 innerhalb des Muskelgewebes deutlich schlechter als der Wildtyp²⁰³. Die Untersuchung der CVB3 ausgelösten Myokarditis in Mäusen unterliegt dem von Tracy *et al.* beschriebenen Hypothese, dass auch kardiovirulente CVB3-Stämme keine Myokarditis ohne eine vorgehende Pankreatitis verursachen können⁹⁵. Dieser Sachverhalt limitiert die Aussagekraft der in Mäusen generierten Befunde, da CVB3 induzierte Myokarditen im Menschen keine apparente Pankreatitis vorhergehen muss. Verschiedene Studien zeigten, dass sich die miRNA-Expressionsmuster von Herz und Pankreas während der CVB3-Infektion in Mäusen unterscheiden. Durch die Insertion organspezifischer miRNA-TS in den entsprechenden CVB3-Stamm gegen miRNAs, welche verstärkt im Pankreas, im Herzen jedoch kaum exprimiert werden, kann so eine gezielte Veränderung des CVB3-Tropismus im Mausmodell erreicht werden. Dadurch ist es möglich, den Erregertropismus im murinen System an den humanen anzugleichen und eine Myokarditis ohne Anwesenheit der Pankreatitis zu untersuchen.

1.4 Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin pankreasattenuiertes CVB3 zu generieren, um damit ein CVB3-Maus-Myokarditismodell zu etablieren und dieses auch hinsichtlich tierschutzrechtlicher Aspekte weiter zu entwickeln. Entgegen der CVB3-Infektion im Menschen stellt im murinen Organismus nicht das Herz, sondern das Pankreas, das für die CVB3-Infektion suszeptibelste Organ dar. Verschiedene klinische Symptome, wie der starke Gewichtsverlust, das schmerzhaftes Hochziehen des Bauches sowie schnell auftretende Todesfälle können als direkte Folge der virusbedingten akuten Pankreatitis angesehen werden. Diese fulminante Ausprägung der Pankreatitis stellt für die Tiere eine extreme Belastung dar, welche im humanen Organismus in der Form nicht auftritt¹¹⁶.

Für die Entwicklung von pankreasattenuiertem CVB3 sollten miRNA-TS in das CVB3-Genom inseriert werden, welche komplementär zu pankreasspezifisch exprimierten miRNAs sind. Binden diese miRNAs an die inserierten CVB3-miRNA-TS, induziert dies im Pankreas den Abbau des CVB3-Genoms über den Mechanismus der RNAi. Im Herzen hingegen erfolgt aufgrund fehlender Expression

dieser miRNAs keine Degradation des CVB3-Genoms, so dass in diesem Organ eine uneingeschränkte Virusvermehrung stattfindet (**Abb. 6**).

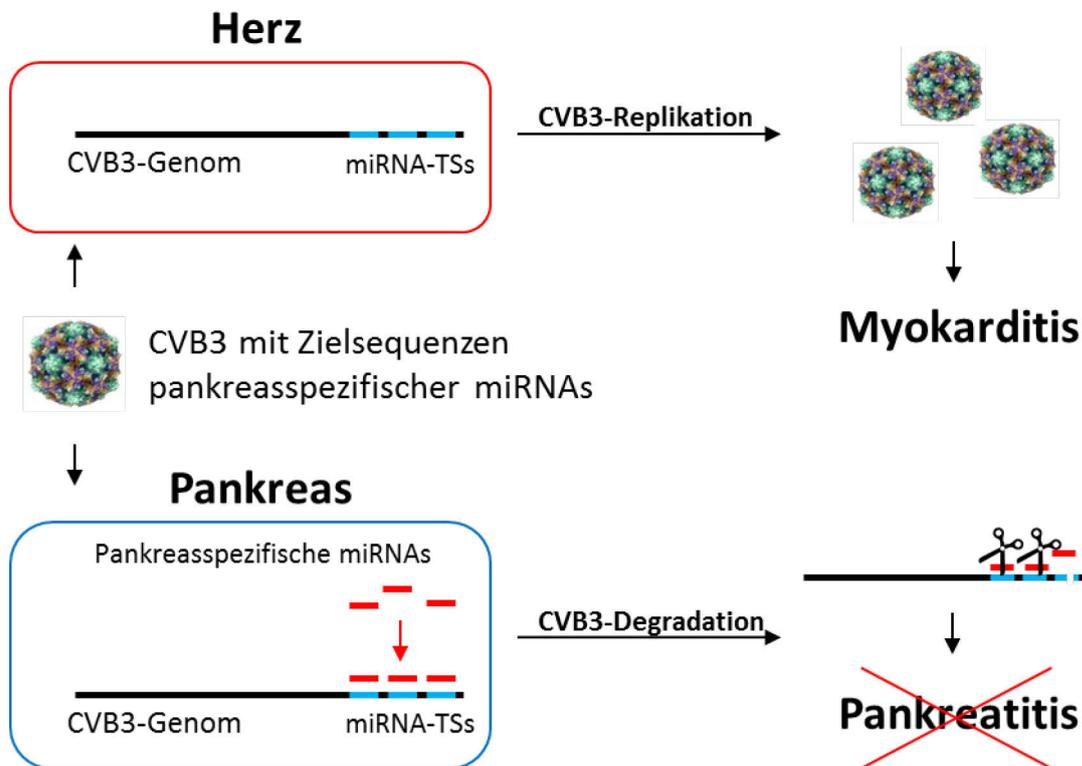


Abbildung 6: Insertion pankreasspezifischer miRNA-Target Sites in das CVB3-Genom modifiziert den viralen Tropismus im Mausmodell.

Replikationseigenschaften eines CVB3, welches mit miRNA-TS pankreasspezifischen miRNAs ausgestattet ist. CVB3 die miRNA-TS pankreasspezifische miRNAs besitzen, können nicht im Pankreas replizieren. Im Herzen hingegen bleibt ihre Replikation unbeeinflusst.

- 1) Im Fokus dieser Arbeit stand zunächst die Identifikation von miRNAs, welche im Gesamtpankreasgewebe, insbesondere im exokrinen Pankreas, hohe Expressionslevel aufweisen und gleichzeitig im Herzgewebe gering bis gar nicht exprimiert werden. Dies sollte mittels Affymetrix-miRNA-Chip-Analyse sowie qRT-PCRs erfolgen. Anschließend sollten, basierend auf den ausgewählten miRNAs, entsprechende miRNA-TSs in das Genom des CVB3-Stammes rCVB3.1 inseriert werden. Die Insertionen sollten für den CVB3-Plus -bzw. CVB3-Minusstrang in das 5'- bzw. 3'-Ende des CVB3-Genoms erfolgen, um zu überprüfen, welche Insertionsstelle die Virusreplikation am effektivsten supprimiert.
- 2) Daran anschließend sollte das Replikationsverhalten der generierten CVB3-Varianten sowie die Effizienz der Inhibierung mittels der inserierten miRNA-TS *in vitro* in verschiedenen Zelllinien untersucht und quantifiziert werden.

- 3) Die *in vitro* evaluierte, mittels miRNA-TS modifizierte CVB3-Varianten sollten *in vivo* auf ihre Effizienz überprüft werden. Dafür sollte zunächst mittels einer Dosisescalationsreihe die erforderliche initiale Viruslast ermittelt werden. Für die Etablierung und Optimierung des Modells sollte der *Outbred* Mausstamm NMRI verwendet werden. Zusätzlich sollten ausgewählte Experimente an dem *Inbred*-Stamm Balb/C durchgeführt werden. Um objektive Aussagen über die Auswirkungen der CVB3 induzierten Myokarditis hinsichtlich kardialer Dysfunktionen zu treffen, sollten hämodynamische Messungen der kardialen Funktionsparameter durchgeführt werden. Ziel dieses Teilabschnittes war es in zwei Mausstämmen zu überprüfen, ob die *in vitro* evaluierte CVB3-miRNA-TS-Variante *in vivo* eine akute Myokarditis induzieren kann, ohne dass die Mäuse eine Pankreatitis ausbilden.

- 4) In weiteren *in vivo* Versuchen sollte zudem untersucht werden, ob das pankreasattenuierte CVB3 auch eine chronische Myokarditis induziert. Dafür sollte ein 28-tägiges Infektionsmodell (chronisches CVB3-Modell) in NMRI-Mäusen etabliert und entsprechend der für das akute Modell eingesetzten Analysemethoden validiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Tabelle 4: Geräte.

<i>Gerätename</i>	<i>Hersteller</i>
Autoklav Laboklav MV80	SHP Steriltechnik AG, Detzel Schloss, D
Advanced Centrifuge J-E	Beckman Coulter, Krefeld, D
Advanced Primus 25 Thermal Cycler	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
CO ₂ -Inkubator HERAcell® 240i	Thermo Scientific, Karlsruhe, D
CO ₂ -Inkubator MCO-20Aic	Sanyo, München, D
Elektrophoreseeinheit PerfectBlue Mini M	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
Elektrophoreseeinheit X-Cell SureLock	Life Technologies, Darmstadt, D
Flaschenfilter 0,22 und 0,45 µm	Millipore, Billerica, Massachusetts, USA
Fluoreszenzmikroskop Observer Z1	Zeiss, Berlin, D
Geldokumentation UV Solo TS	Biometra-Analytik Jena, Jena, D
Gewebehomogenisator VDI 12	VWR International GmbH, Darmstadt, D
Mikroskop Primo Vert	Zeiss, Berlin, D
NanoDrop 2000	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
PALM Laser Microbeam und Pressure Catapulting	Carl Zeiss Microimaging GmbH, Berlin, D
PCR Thermocycler T Personal	Biometra, Göttingen, D
Reaktionsgefäße für 0,5 ml, 1,5 ml	Eppendorf, Köln, D
Schüttelinkubator 37 °C (Typ 3032-3033)	GFL, Burgwedel, D
Sterilbank MSC Advantage 1.8	Thermo Scientific, Karlsruhe, D
Sterilbank MSC 2020 1.2	Thermo Scientific, Karlsruhe, D
Thermomixer Comfort 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg, D
Tischzentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg, D
Tischzentrifuge Heraeus Fresco 17	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, D
Tischkühlzentrifuge Sigma 3K30	DJLabcare, Buckinghamshire, England
TriStar2 Multimode Reader LB942	Berthold Technologies, Bad Wildbad, D
Ultrazentrifuge LE80	Beckman Coulter, Krefeld, D
Ultrazentrifuge Optima L-90K	Beckman Coulter, Krefeld, D
Vortexer (Typ REAX top)	Heidolph Instruments, Schwabach, D
V-650 Spectrophotometer	Jasco Inc., Easton, Pennsylvania, USA
Wasserbad 37 °C (Typ F4391)	Haake, Karlsruhe, D
Wasserbad 56 °C, 60 °C (Typ 1002-1012)	GFL, Burgwedel, D
Wipptisch (Typ Rocking Platform WT15)	Biometra, Göttingen, D
Ultraturrax	IKA®-Werke GmbH, Staufen, D

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 5: Verbrauchsmaterialien.

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
Einweg-Kanülen (0,3 und 0,45 mm)	BD Microlance™ 3, Heidelberg, D
Einweg-Pipetten, serologisch (2, 5, 10 und 25 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
Einwegskalpell	B Braun, Hessen, D
Einweg-Spritzen (1 ml)	H. Rotert GmbH & Co. KG, Bad Iburg, D
Kryoröhrchen (1,8 ml)	VWR International GmbH, Darmstadt, D
MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, D
Mikrotiterplatten, 96 well	Berthold Technologies GmbH, D
Parafilm	Pechiney, GmbH, Düsseldorf, D
Petrischalen (10 cm)Ø	VWR International GmbH, Darmstadt, D
Pipettenspitzen, gestopft (1000, 200, 10 µl)	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, D
Reaktionsgefäße (0,25, 0,5, 1 und 2 ml)	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, D
Zellkulturflaschen (25; 75 und 175 cm ²)	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, D
Zellkulturplatten (24, 12 und 6 Vertiefungen)	VWR International GmbH, Darmstadt, D
Zellkulturschalen (10 cm Ø)	VWR International GmbH, Darmstadt, D
Zentrifugenröhrchen (15 und 50 ml)	VWR International GmbH, Darmstadt, D

2.1.3 Chemikalien

Tabelle 6: Chemikalien.

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
Agarose (universal)	Rapidozym, Berlin, D
Bovines Serumalbumin (BSA)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Bromphenolblau (BPB)	Sigma-Aldrich, München, D
DEPC-gereinigtes Wasser	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, D
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Sigma-Aldrich, München, D
Agarose (universal)	Rapidozym, Berlin, D
Bovines Serumalbumin (BSA)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Bromphenolblau (BPB)	Sigma-Aldrich, München, D
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Sigma-Aldrich, München, D
DEPC-gereinigtes Wasser	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, D
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Sigma-Aldrich, München, D
dNTPs	Rapidozym, Berlin, D
DNA Loading Dye (6x)	Fermentas, St. Leon-Rot, D
Eagle-Medium Pulver (Gibco™ Essential Medium)	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, D
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, München, D
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Fötale Kälberserum (FKS)	C.C. Pro, Oberdorla, D
Hepes (N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid)	Sigma-Aldrich, München, D

INT (2-(4-Iodphenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyltetrazoliumchlorid)	VWR International GmbH, Darmstadt, D
Iso-Propanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Kristallviolett	Sigma-Aldrich, München, D
L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
LB-Agar	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
LB-Medium	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Lipofectamin 2000	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, D
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Fermentas, St. Leon-Rot, D
MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid)	VWR International GmbH, Darmstadt, D
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt, D
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt, D
Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich, München, D
NEAA (Non-Essential Amino Acids Solution) 100x	Life Technologies GmbH, Darmstadt, D
Noble-Difco Agar	Becton Dickinson, Heidelberg, D
PBS 1x	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich, München, D
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Polyethylenimin, PEI	Polysciences Europe, Hirschberg, D
Paraformaldehyd (PFA)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Penicillin/Streptomycin	BIOCHROM AG
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Polyethylenimin, PEI	Polysciences Europe, Hirschberg, D
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Triton-X-100	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Trypsin 0,25 %/EDTA	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D

2.1.4 Puffer und Lösungen

Tabelle 7: Puffer und Lösungen.

<i>Bezeichnung</i>	<i>Zusammensetzung</i>
2x MTT-INT-Färbelösung	100 ml 1x PBS 60 µl Essigsäure 150 mg INT 600 mg MMT
Lysepuffer	20 mM TRIS/HCl, pH 8.0 140 mM NaCl 1 mM EDTA 1% Triton X-100, 1% Protease-Inhibitor 1% Phosphatase-Inhibitor

PBS-Puffer, 1x	10x 100 ml PBS-Puffer Aqua bidest. Ad 1L
TAE-Puffer, 50x	242 g Tris 57 ml Eisessig 100 ml EDTA (0,5 M; pH 8,0) Aqua bidest. ad 1,0 L
TAE-Gelpuffer, 1x	2 ml 50x TAE-Puffer Aqua bidest. ad 100 ml
Tris-HCl (1 M; pH 7,5)	121,14 g Tris Aqua bidest. ad 0,9 L

2.1.5 Fest- und Flüssignährmedien

Tabelle 8: Verwendete Fest- und Flüssignährmedien.

<i>Bezeichnung</i>	<i>Zusammensetzung</i>
LB-Agar (Lennox; pH 7,5)	35 g Agar Aqua bidest. ad 1L, Autoklavieren
Difco-Agar	3,3 g Difco-Agar Aqua bidest. ad 100 ml, Autoklavieren
Eagle-Medium	9,61 g MEM-Pulver (Invitrogen 61100-087) 1,7 g Natriumhydrogencarbonat Aqua bidest. ad 750 ml 1% Penicillin-Streptomycin (P/S), steril filtrieren
LB-Medium (Lennox)	20 g Agar Aqua bidest. ad 1L, Autoklavieren

2.1.6 Zelllinien und Kulturmedien

Tabelle 9: Verwendete Zelllinien mit entsprechendem Kulturmedium und Zusätzen.

<i>Zelllinie</i>	<i>Beschreibung</i>	<i>Kulturmedium</i>
AR42J	Exokrines Pankreas, Ratte	RPMI 1640
EndoC-βH1	Pankreas, β-Zellen, Human	DMEM + β-Mercaptoethanol
HeLa	Zervixkarzinom, Human	MEM +1 % NEAA, 0,02 M Hepes
HEK293T	Embryonale Nierenzellen, Human	DMEM +1 % Natriumpyruvat
EMCM	Primäre embryonale Kardiomyozyten, Maus	DMEM
INS-1E	Pankreas, endokrin, β-Zellen, Ratte	RPMI 1640, 0,01 M Hepes
MIN6	Pankreas, endokrin, β-Zellen, Maus	DMEM +1 % Natriumpyruvat
PANC-1	Pankreas, epitheloid Karzinom, Human	MEM

Alle Medien wurden von der Firma Gibco bezogen und enthielten zusätzlich 10% FKS, 1% L-Glutamin und 1% Penicillin/ Streptomycin.

2.1.7 Bakterienstämme

Tabelle 10: Verwendete Bakterienstämme.

Bezeichnung	Herkunft
<i>E.coli</i> XL-10 Gold	Stratagene, Kalifornien, USA

2.1.8 Plasmide

Tabelle 11: Verwendete Plasmide.

Bezeichnung	Größe	Expression/Insert	Hersteller
psiCHECK2-amiR-Hexon	6300	Dual Luciferase und HexonTS	Schaar <i>et al.</i> ²⁷⁷
psiCHECK2-amiR-375TS	6356	Dual Luciferase und miRNA375TS	AG Fechner
pCMV-MIR-GFP	6200	GFP	OriGene
pCMV-MIR-375-GFP	6300	miRNA-375 und GFP	OriGene
pCMV-MIR-216a-GFP	6300	miRNA-216a und GFP	OriGene
pMA-RQ-375(-)-39TS	2566	375(-)-39TS-Kassette (je 3x)	Lifetechnology
pMK-RQ-3 MCS	3311	Multiple Cloning Site (MCS)	Lifetechnology
pMK-RQ-5 MCS	3443	MCS	Lifetechnology
pscAAV-GFP	4839	GFP	Fechner <i>et al.</i> ²⁷⁸
pMKS1	10365	CVB3-cDNA	Slifka <i>et al.</i> ²⁷⁹ [A]
pMKS1-eGFP	11091	CVB3-cDNA, GFP	Feuer <i>et al.</i> ²⁸⁰ [A]
pBKCMV-H3	7565	CVB3-cDNA	Jena, D [B]
pMKS1-H3N	10319	CVB3-cDNA	[C]

[A] – Freundliche Gabe von Prof. Zhao-Hua Zhong, Department of Microbiology, Harbin Medical University, Harbin 150081, China.

[B] – Freundliche Gabe von A. Henke, Universitätsklinikum Jena, Institut für Virologie und antivirale Therapie, Jena, Deutschland²⁸¹.

[C] – In dieser Arbeit hergestellt.

2.1.9 Viren

Tabelle 12: Verwendete Viren.

Plasmid	Virusbezeichnung	Virustiter [pfu/ml]
pMKS1	rCVB3.1	1,2 x 10 ⁸
pMKS1-eGFP	eGFP-CVB3	1,1 x 10 ⁸
pMKS1-3'-375TS(+)	CVB3-375TS(3+)	9,4 x 10 ⁷
pMKS1-3'-375TS(-)	CVB3-375TS(3-)	1,2 x 10 ⁸
pMKS1-5'-375TS(+)	CVB3-375TS(5+)	4,4 x 10 ⁷
pMKS1-5'-375TS(-)	CVB3-375TS(5-)	2,7 x 10 ⁷
pMKS1-3'-39TS(+)	CVB3-39TS(3+)	1,7 x 10 ⁸
pMKS1-5'-39TS(+)	CVB3-39TS(5+)	4,2 x 10 ⁷
pMKS1-H3N-375TS	H3N-375TS	2,3 x 10 ⁸
pMKS1-H3N-39TS	H3N-39TS	2,9 x 10 ⁸
pMKS1-H3N	H3N	3,1 x 10 ⁸
pBKCMV-H3	H3	4,4 x 10 ⁸

2.1.10 Enzyme

Tabelle 13: Enzyme

<i>Enzym</i>	<i>Hersteller</i>
Alkalische Phosphatase	Boehringer, Mannheim, D
DNase I	Promega, Mannheim, D
DNA-Polymerase I (Klenow)	New England Biolabs, Schwalbach, D
OptiTherm-DNA-Polymerase	Rapidozym, Berlin, D
Pfu Ultra Polymerase	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, D
Proteinase K	Boehringer, Ingelheim, D
T4 DNA-Ligase	New England Biolabs, Schwalbach, D
T4 DNA-Polymerase	New England Biolabs, Schwalbach, D
Trypsin 0,25 %/EDTA	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D

2.1.11 Restriktionsenzyme

Tabelle 14: Restriktionsenzyme zuzüglich Schnittstelle und Inkubationstemperatur.

<i>Restriktionsenzym</i>	<i>Schnittstelle</i>	<i>Inkubations- temperatur [°C]</i>	<i>Hersteller</i>
AdeI	CACNNN/GTG GTG/NNNCAC	37	New England Biolabs (NEB)
BamHI	G/GATCC CCTAG/G	37	NEB
EcoRI	G/AATTC CTTAA/G	37	NEB
EcoRV	GAT/ATC CTA/TAG	37	NEB
HincII	GTPy/PuAC CAPu/PyTG	37	NEB
HindIII	A/AGCTT TTCGA/A	37	NEB
KpnI	GGTAC/C C/CATGG	37	NEB
MunI	C/AATTG GTTAA/C	37	NEB
NdeI	CA/TATG GTAT/AC	37	NEB
NotI	GC/GGCCGC CGCCGG/CG	37	NEB
PmeI	GTTT/AAAC CAAA/TTTG	37	NEB
PvuII	CAG/CTG GTC/GAC	37	NEB
SacI	GAGCT/C C/TCGAG	37	NEB
SfiI	GGCCGGAG/AGGCC CCGGC/CTCTCCGG	50	NEB

SmaI	CCC/GGG GGG/CCC	37	NEB
SmiI	ATTT/AAAT TAAA/TTTA	37	NEB
StuI	AGG/CCT TCC/GGA	37	NEB
XbaI	TCC/GGA AGATC/T	37	NEB
XhoI	T/CTAGA GAGCT/G	37	NEB

2.1.12 Reaktionssysteme und Kits

Tabelle 15: Reaktionssysteme und kommerzielle Kits

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
Cell Proliferation Kit (XTT)	Roche Diagnostics, Mannheim, D
Cy3-siRNA-Kontrolle	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, D
Dual-Luciferase Reporter System	Promega, Mannheim, D
EvaGreen Master Mix	Bio-Rad Laboratories, München, D
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Life Technologies GmbH, Darmstadt, D
High Pure Viral RNA Kit	Roche Diagnostics, Mannheim, D
microRNA Expression Plasmids (miRNA-216a, 375)	OriGene, Rockville, USA
miScript microRNA-375 Mimics (192764381)	Qiagen, Hilden, D
miScript Control siRNA (191164157)	Qiagen, Hilden, D
microRNA TaqMan Assay	ThermoFischer GmbH, Schwerte, D
peqGOLD Plasmid Mini Kit	VWR International GmbH, Darmstadt, D
mirVana microRNA Isolation Kit	Life Technologies GmbH, Darmstadt, D
Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden, D
Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden, D
Mouse IL-6: Mm00446190_m 1	Life Technologies GmbH, Darmstadt, D
Mouse IFN- γ : Mm00801778_m 1	Life Technologies GmbH, Darmstadt, D
Mouse TNF- α : Mm0043258_m 1	Life Technologies GmbH, Darmstadt, D
Polyethylenimine MAX 4K (PEI Max)	Polysciences, Warrington, USA
QIAEX® II Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden, D
T7 Transkriptionskit	Roboklon, Berlin, D
TRIzol® Reagent	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, D

2.1.13 DNA- und Proteingrößenstandards

Tabelle 16: DNA- und Proteingrößenstandards.

<i>Bezeichnung</i>	<i>DNA/Protein]</i>	<i>Hersteller</i>
100 bp Marker	DNA	NEB
2-Log DNA Ladder (0,1 – 10.0 kb)	DNA	NEB
Magic Mark XP (20-220 kDa)	Protein	ThermoFisher

2.1.14 Antibiotika

Tabelle 17: Antibiotika, verwendete Konzentrationen und Lösungsmittel.

<i>Antibiotikum</i>	<i>Stammlösung</i>	<i>Lösungsmittel</i>	<i>Endkonzentration</i>
Ampicillin	10 mg/ml	DEPC H ₂ O	10 µg/ml
Neo/Kanamycin	100 mg/ml	DEPC H ₂ O	100 µg/ml
Penicillin/ Streptomycin	5000 µg/ml	DEPC H ₂ O	10 µg/ml

Alle Antibiotika wurden von der Firma Sigma bezogen.

2.1.15 Antikörper

Tabelle 18: Antikörper.

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
CVB3-VP1	Merja Roivainen National Institute for Health and Welfare, Helsinki, Finland
γ-Tubulin	Sigma-Aldrich, München, D
eIF4G	Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA

2.1.16 Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Primern sind in Tabelle 19 aufgeführt und wurden von der Firma Life Technologies, Darmstadt, synthetisiert. Die lyophilisierten Primer wurden in DEPC H₂O gelöst, so dass die Endkonzentration 100 µM betrug

Tabelle 19: Verwendete Oligonukleotide.

<i>Primername</i>	<i>Nukleotidsequenz [5'-3']</i>	<i>Bemerkung</i>
CVB3 primer 0s	ctc act ata ggg cga att g	Genom-Sequenzierung
CVB3 primer 0as	gtt act tct aag tta cag t	Genom-Sequenzierung
CVB3 primer 1s	tta aaa cag cctg tgg gtt	Genom-Sequenzierung
CVB3 primer 1as	tta acc tct ctc aag cta a	Genom-Sequenzierung
CVB3 primer 2s	tta tat atc tct ttg ttg g	Genom-Sequenzierung
CVB3 primer 2as	gtg ttg ttt agc gtt geg c	Genom-Sequenzierung
CVB3 primer 3s	gta gtg tgt gta ccg gaa g	Genom-Sequenzierung
CVB3 primer 3as	acc aat ggg tgt aat agt t	Genom-Sequenzierung
CVB3 primer 4s	ttc agt cgg acg ctc cta g	Genom-Sequenzierung
CVB3 primer 4as	att cta gct ttc tcc taa g	Genom-Sequenzierung
CVB3 primer 5s	tgg gta ata aca cca cga c	Genom-Sequenzierung
CVB3 primer 5as	tac acc gac atc tgg cta t	Genom-Sequenzierung
CVB3 primer 6s	gag cac gac cac agc aca t	Genom-Sequenzierung
CVB3 primer 6as	ttc cct gac ctc agg taa	Genom-Sequenzierung
CVB3 primer 7s	aat tca ttg agt ggc tca a	Genom-Sequenzierung
CVB3 primer 7as	tga ctg ggc aac act ctt c	Genom-Sequenzierung
CVB3 primer 8s	aca tgc caa tgt cag tga a	Genom-Sequenzierung
CVB3 primer 8as	ttg tac cat cct tat cca	Genom-Sequenzierung
CVB3 primer 9s	gta ggc gtg ctg gac gct a	Genom-Sequenzierung
CVB3 primer 9as	taa ggg taa cct gca ctc g	Genom-Sequenzierung

CVB3 primer 10s	tga agg cct tga ggc tct t	Genom-Sequenzierung
CVB3 primer 10as	tta atcc ata gtc ctt gc	Genom-Sequenzierung
CVB3 primer 11s	cca tag atg cgt ctt tgc t	Genom-Sequenzierung
CVB3 primer 11as	ccg ttg tct agt tgc gtt	Genom-Sequenzierung
CVB3 forward	ccc tga atg cgg cta atc c	CVB3-Quantifizierung
CVB3 reverse	att gtc acc ata agc agc ca	CVB3-Quantifizierung
CVB3- Sonde	5'FAM- tgc agc gga acc g - MGB	CVB3-Quantifizierung
18 S rRNA forward	cgc ggt tct att ttg ttg gt	18 S rRNA-Quantifizierung
18 S rRNA reverse	agt cgg cat cgt tta tgg tc	18 S rRNA-Quantifizierung
CVB3-3MCS	att aac cct cac act aaa ggg a	Insert-Überprüfung
CVB3-5MCS	tta tat atc tct ttg ttg g	Insert-Überprüfung

2.1.17 Software

Alle in dieser Arbeit verwendeten Programme sind in der Tabelle 20 dargestellt.

Tabelle 20: Verwendete Software-Programme.

<i>Programm</i>	<i>Bezugsquelle</i>
BLAST/ Phi-Blast	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
GATC Viewer	GATC Biotech AG, Konstanz, D
Gene Construction Kit 4.0	Textco BioSoftware, Inc., Raleigh, USA
GraphPad Prism 5	GraphPad Software Inc., La Jolla, USA
NEB Cutter	http://www.labtools.us/nebcutter-v2-0/
MicroRNA.org	MicroRNA.org
Microsoft Office	Microsoft, Redmond, USA
PubMed	https://www.ncbi.nlm.nih.gov

2.2 Methoden

2.2.1 Mikrobiologische Methoden

2.2.1.1 Anzucht von Bakterien aus Bakterienstocks

Alle in der Arbeit verwendeten Bakterienstämme wurden aus der Stammsammlung der AG Fechner (FG Angewandte Biochemie, Institut für Biotechnologie, TU Berlin) auf Luria-Bertani-Medium (LB-Medium) überimpft. Für Großpräparationen wurden die bei -80°C gelagerten Bakterienstocks aufgetaut, 2-3 ml LB-Medium mit 5 μl der Stocklösung angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Im Anschluss wurden damit größere Mengen (200-500 ml) in einem Verhältnis von 1:1000 angeimpft und erneut bei 37°C so lange schüttelnd bei 120 rpm inkubiert bis eine OD (595 nm) von 0,6 erreicht wurde.

2.2.1.2 Herstellung chemisch-kompetenter Bakterien

Zur Herstellung chemisch-kompetenter Bakterien wurden 2 μl eines *E. coli* X-Gold-Stocks in 2 ml antibiotikafreies LB-Medium überführt und über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert. Anschließend wurde mit dieser Übernachtskultur 250 ml antibiotikafreies LB-Medium angeimpft und so lange bei 37°C schüttelnd inkubiert, bis die Kultur eine OD (595 nm) von 0,5 erreicht hatte. Anschließend wurden die Bakterien in vorgekühlte Zentrifugenröhrchen überführt, 10 min auf Eis inkubiert und bei 3000 g (4°C) für 5 min pelletiert. Das Pellet wurde in 50 ml eiskalter 0,1 M MgCl_2 -Lösung resuspendiert und bei 3000 g (0°C) für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde ein weiteres Mal in 50 ml einer eiskalten 0,1 M CaCl_2 -Lösung gelöst, 20 min auf Eis inkubiert und für 5 min bei 3000 g (0°C) zentrifugiert. Daraufhin wurde das Pellet vorsichtig in 5 ml eiskalter 0,1 M CaCl_2 -Lösung, welche mit 14 % Glycerin versetzt war, resuspendiert, in 50 μl Aliquots aufgeteilt, anschließend bei -80°C eingefroren und dort bis zum Gebrauch gelagert.

Im Anschluss wurden die chemisch-kompetenten Bakterien quantifiziert und auf ihre Reinheit überprüft. Dazu wurden die Bakterien auf Agar-Platten mit Antibiotikum ausplattiert. Um Kontaminationen auszuschließen zu können wurden die chemisch-kompetenten Bakterien zusätzlich auf antibiotikafreien Agar-Platten ausplattiert, ohne Antibiotikum ausplattiert. Die Quantifizierung erfolgte auf Agar-Platten ohne Antibiotika. Bei einer Kolonienzahl von >250 wurden die chemisch-kompetenten Bakterien verwendet.

2.2.1.3 Herstellung von Bakterienstocks

800 μl des sterilen LB-Mediums, welches die transformierten Bakterien enthält, wurden mit 800 μl steril filtriertem 60% igen Glycerin vermischt und anschließend bei -80°C gelagert.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Konzentrationsbestimmung von DNA- und RNA

Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der DNA- und RNA-Proben erfolgte über das Nanodrop 2000 Spektrophotometer. Die Konzentration der DNA-Proben wurde nach der Formel: $\text{Absorption} = 1 \hat{=} 50 \text{ ng}/\mu\text{l}$ (für RNA $1 \hat{=} 40 \text{ ng}/\mu\text{l}$) bestimmt. Die Reinheit der Proben wurde mittels eines Quotienten aus Absorption bei 260 nm geteilt durch die Absorption bei 280 nm berechnet. Bei reinen DNA-Proben sollte dieser zwischen 1,8 und 2,0 liegen und bei reinen RNA-Proben größer als 2,0 sein.

2.2.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Präparation kleiner DNA Mengen (2-3 ml) erfolgte mit dem peqGOLD Plasmid Mini Kit der Firma PeqLab nach Herstellerangaben. Für größere Massenkulturen (200-500 ml) wurden die Midi- bzw. Maxi-Kits der Firma Qiagen entsprechend Herstellerangaben verwendet.

2.2.2.3 DNA-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte in 0,8-2 %-igen Agarosegelen (versetzt mit Ethidiumbromid (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$)) in 1 x TAE Laufpuffer bei einer Spannung von 70-130 V. Hierbei wurden 0,8-1,3 % ige Agarosegele u. a. zur Auftrennung von Plasmiden verwendet und 2 % ige Agarosegele zur Auftrennung kleinerer PCR-Fragmente (> 1000 bp). Die Agarose wurde in 1 x TAE Laufpuffer gelöst und bei 600 W in der Mikrowelle aufgekocht. Als DNA-Größenstandard wurde der 2-Log DNA Marker verwendet.

2.2.2.4 Restriktionsverdau

Die Fragmentierung der DNA-Sequenzen erfolgte mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen, welche Palindromstrukturen mit einer Länge von 4 bis 8 bp in der DNA erkennen und sie in dieser Erkennungssequenz schneiden. Dabei können Fragmente mit glatten (*blunt-ends*) oder kohäsiven (*sticky-ends*) Enden entstehen. Alle in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme und deren Erkennungssequenzen sind in Tabelle 14 aufgeführt. Die Zusammensetzung eines Restriktionsansatzes (25 μl) gestaltete sich wie folgt:

x μl	DNA (500 ng)
0,5 μl	Restriktionsenzym
2,5 μl	10x SmartCut-Puffer
	add 25 μl mit DEPC H ₂ O

Die Reaktion erfolgte bei 37° C für 2 h.

2.2.2.5 Extraktion der DNA aus Agarosegelen

DNA-Fragmente wurden aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit dem Gelextraktions-Kit der Firma Qiagen (QIAquick Gel Extraction Kit) entsprechend Herstellerangaben extrahiert. Um die

Ausbeute und Konzentration der DNA zu erhöhen wurde der Elutionspuffer auf 50° C erwärmt, das Elutionsvolumen von 50 µl auf 25 µl verringert und die Inkubationsdauer vor Eluation der DNA von 2 min auf 10 min erhöht.

2.2.2.6 Ligation der Fragmente

Die Ligation der DNA-Fragmente erfolgte mit Hilfe der T4 Ligase. Die Zusammensetzung eines Ligationsansatzes (20 µl) gestaltete sich wie folgt:

1 µl	T4 Ligase
2 µl	T4 Ligase-Puffer
x µl	Insert (300 ng)
<u>x µl</u>	<u>Plasmidbackbone (100 ng)</u>
	add 20 µl mit DEPC H ₂ O

Das Verknüpfen der Fragmente mit Überhängen (*sticky ends*) erfolgte bei Raumtemperatur (RT) für 15 min, Fragmente mit glatten Enden (*blunt ends*) wurden ebenfalls bei RT jedoch für 2 h inkubiert. Das Verhältnis von Backbone zum Insert lag zwischen 1:3 und 1:12.

2.2.2.7 Transformation chemisch kompetenter Zellen

50 µl chemisch-kompetenter Bakterien (*E. coli*, X-Gold) wurden auf Eis aufgetaut und mit 1-5 µl des Plasmid-enthaltenden Transformationsansatzes (Kapitel 2.2.2.6) gemischt. Die Suspension wurde für 30 min auf Eis inkubiert, danach eine Minute lang bei 42° C erhitzt und anschließend für 2 min auf Eis gestellt. Danach wurden 500 µl antibiotikafreies LB-Medium zugegeben und die Suspension 45 min bei 37° C schüttelnd (300 rpm) inkubiert. 50-200 µl des generierten Ansatzes wurden auf LB-Agar-Platten mit Antibiotikum (Penicillin oder Kanamycin) (1 mg/ml) ausplattiert und über Nacht bei 37° C im Brutschrank inkubiert.

2.2.2.8 Generierung von CVB3-cDNA-Klonen

Den Ausgangspunkt der Versuche innerhalb dieser Arbeit bildeten folgende drei Basisplasmide, welche drei verschiedene Varianten eines infektiösen CVB3-cDNA-Klons beinhalten:

1. pMKS1:

Das pMKS1-Plasmid, welches die cDNA eines infektiösen CVB3 enthält, wurde uns freundlicherweise von Prof. Lindsay Whitton, Scripps Research Institute, La Jolla, California, USA zu Verfügung gestellt.¹⁰ Das Plasmid enthält zusätzlich 39 bp einer Klonierungssequenz, welche sich unmittelbar *downstream* vom Startsignal des CVB3-Polyproteins im 5'-Bereich des CVB3 befindet, und die Insertion von weiteren Fremdsequenzen ermöglicht.²⁷⁹ Das CVB3-Genom basiert auf der CVB3-Variante H3.

2. pMKS1-eGFP:

Das Plasmid entspricht dem Plasmid pMKS1 und enthält zusätzlich die cDNA des *green fluorescent protein* (GFP), welches in die oben erwähnte Klonierungssequenz inseriert wurde²⁸⁰. Dieses Plasmid wurde uns von Zhao-Hua Zhong, Department of Microbiology, Harbin Medical University, Harbin, China zur Verfügung gestellt. Das Plasmid bildet nach Transfektion ein CVB3, welches GFP exprimiert. Diese Variante diente dem Transfektions -bzw. Infektionsnachweis.

3. pBKCMV-H3:

Das CVB3-H3-Plasmid wurde uns von Prof. Dr. A. Henke, Institute of Virology and Antiviral Therapy, Jena University Hospital, Friedrich Schiller University Jena zur Verfügung gestellt. Das Plasmid enthält die CVB3-cDNA eines kardiotropen CVB3²⁸¹. Es diente als Grundlage zur Herstellung von pMKS1²⁷⁹.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde ein weiteres CVB3-cDNA-Plasmid mit dem Namen pMKS1-H3N hergestellt. Dieses basiert auf dem Plasmid-Backbone von pMKS1, in welches die CVB3-H3 cDNA aus dem pBKCMV-H3 Plasmid inseriert wurde.

2.2.2.8.1 Klonierung der MCS in das pMKS1-Plasmid

Im Plasmid pMKS1 waren lediglich die beiden Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Cla*I geeignet, um die Insertion einer MCS in die 3'UTR des CVB3 Genoms vornehmen zu können. Daher wurde der Bereich zwischen diesen Restriktionsschnittstellen von der Firma Life Technologies komplett zusammen mit MCS, welche vier Restriktionsschnittstellen (*Asi*sI, *Xba*I, *Nde*I und *Pme*I) enthielt, synthetisiert. Die MCS wurde unmittelbar nach dem Stopcodon des CVB3-Polyproteins in der 3'UTR des Virusgenoms inseriert.

Da die *Bam*HI-Schnittstelle zweimal im pMKS1-Plasmid vorhanden war, wurde diese mit dem Restriktionsenzym *Sac*I geschnitten und darauffolgend religiert, um so eine der beiden *Bam*HI-Schnittstellen zu entfernen. Das synthetisierte Fragment mit der 3'-MCS wurde über *Bam*HI und *Cla*I aus dem Plasmid pMK-RQ herausgeschnitten und mittels Ligase in das verkleinerte pMKS1-Plasmid (pMKS1-*Sac*I) religiert, wodurch das Plasmid pMKS1-*Sac*I-3'MCS entstand. Im nächsten Schritt wurde die 3'-MCS aus dem Plasmid pMKS1-*Sac*I-3'MCS über *Stu*I und *Cla*I herausgeschnitten und anschließend in das pMKS1 kloniert (**Abb. 7**). Das daraus resultierende Plasmid erhielt die Bezeichnung pMKS1-3'MCS (**Abb. 8**).

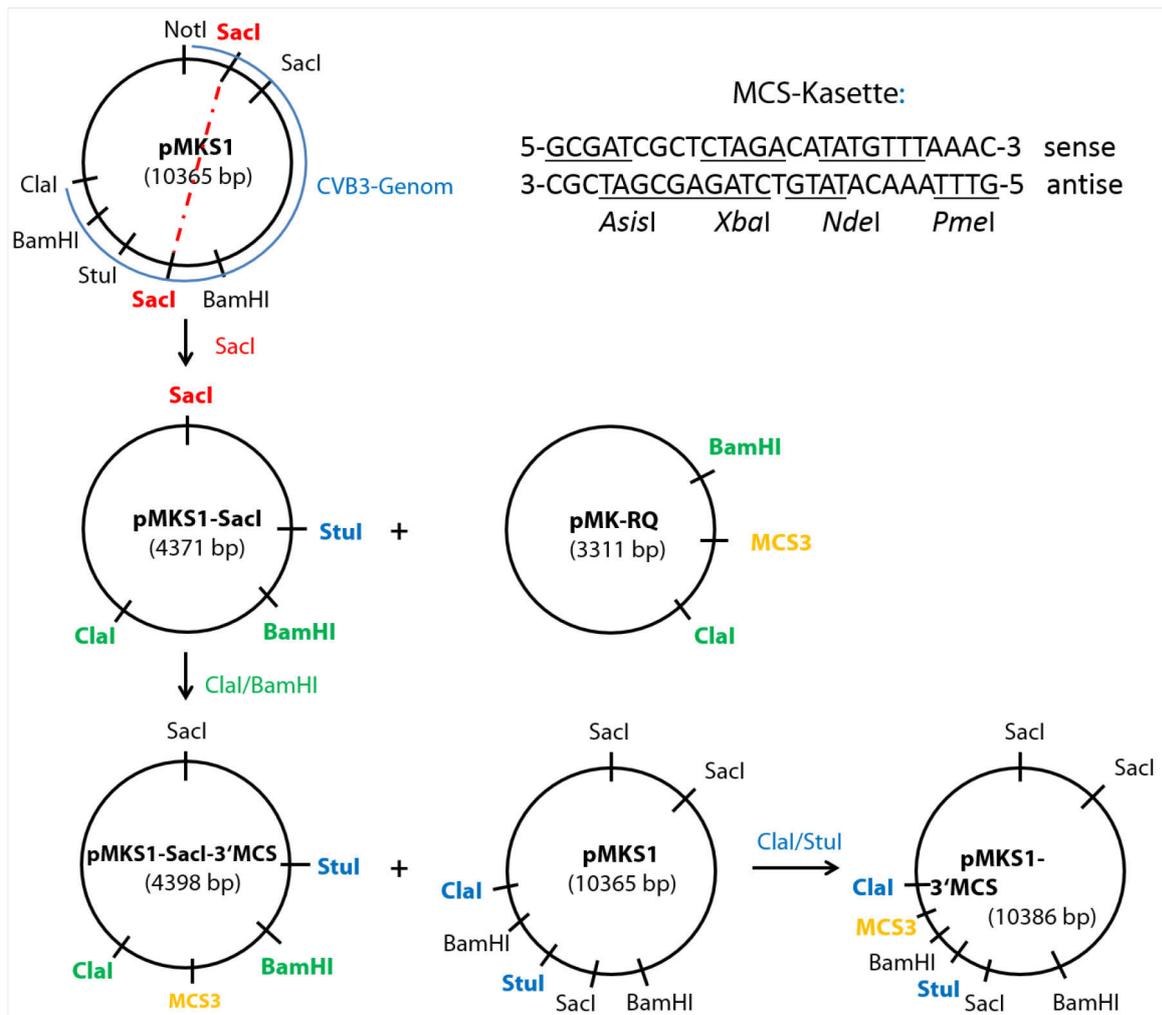


Abbildung 7: Klonierung der MCS in das 3'-Ende des CVB3-Genoms im pMKS1-Plasmid.

[MCS: multiple cloning site]

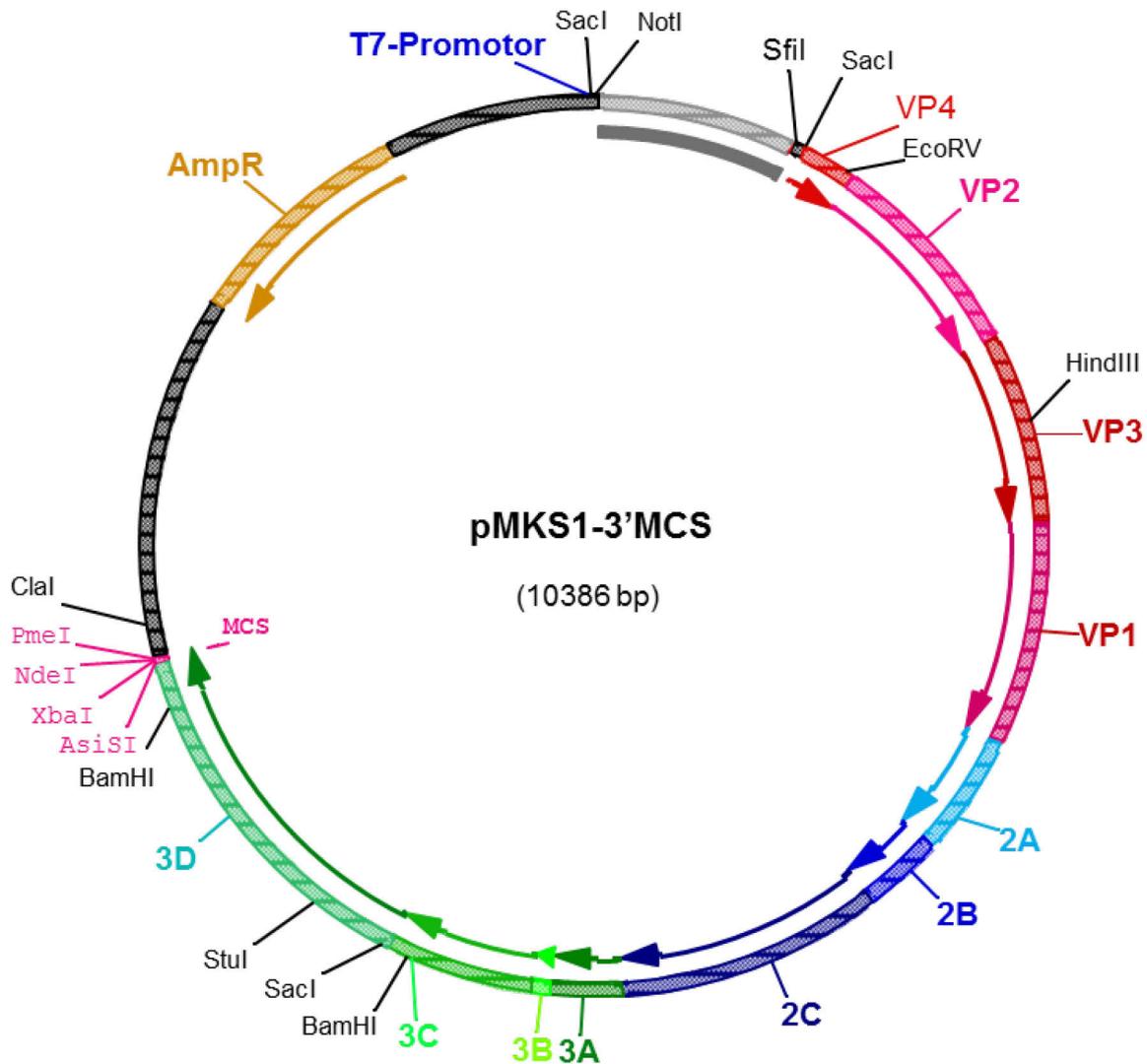


Abbildung 8: Darstellung des pMKS1-3'MCS-Plasmids mit der MCS am 3'-Ende mit den Restriktionsschnittstellen *AsiSI*, *XbaI*, *NdeI* und *PmeI*.

Das CVB3-Genom befindet sich zwischen den *NotI*- und *Clal*-Restriktionsschnittstellen in dem pMKS1-Plasmid. [MCS: multiple cloning site]

2.2.2.8.2 Klonierung der miRNA-375TS in das 3'-Ende des CVB3-Genoms

Der Versuch 100 bp lange Fragmente, die drei Kopien der miRNA-375Ts enthielten (gewonnen aus dem pMK-RQ-375TS, synthetisiert von der Firma Life Technologies) in die MCS des pMKS1-3'MCS-Plasmids direkt zu klonieren, war nicht erfolgreich. Aus diesem Grund wurden die 3x miRNA-375TSs(+) über *AsiSI* und *PmeI*-Restriktionsschnittstellen aus dem Plasmid pMK-RQ-375TS in das Plasmid pMK-RQ (3311bp) mit der 3'-MCS kloniert (**Abb. 9**).

Das Fragment wurde anschließend über *BamHI* und *Clal* aus dem pMK-RQ herausgeschnitten und mittels Ligase in das Plasmid pMKS1-*SacI* inseriert. Im letzten Schritt wurde das Fragment mit der MCS und den 3x 375TSs über *Stul* und *Clal* in das pMKS1-Plasmid zurück kloniert (**Abb. 7**).

Das erhaltene Plasmid enthält in der MCS drei Kopien der miRNA-375TS, die je durch 6 bp *Spacer* voneinander getrennt sind. Das Plasmid wurde mit pMKS1-375TS(3+) bezeichnet. Das Plus (+)

kennzeichnet, dass die miRNA375-TS nach Bildung des CVB3 in der (+)-Strang-RNA des viralen Genoms ((+)-Orientierung) vorliegt und von der nativen miRNA-375 gebunden werden kann. Das Minus kennzeichnet, dass die miRNA375-TS in der (-) RNA des viralen Genoms ((-)-Orientierung) vorliegt, welche im Verlauf der CVB3-Replikation als Matrize für die Synthese der CVB3-Plusstränge dient.

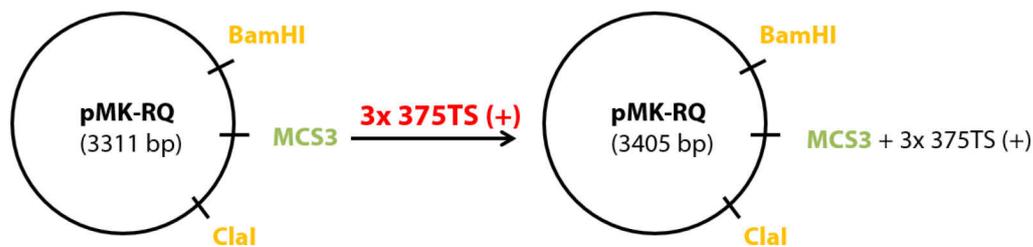


Abbildung 9: Klonierung von drei miRNA-375TS in das Fragment mit der MCS in das 3'-Ende des CVB3-Genoms.

[MCS: *multiple cloning site*]

2.2.2.8.3 Klonierung der MCS in das 5'-Ende des CVB3-Genoms

Für die Klonierung der MCS in das 5'-Ende des CVB3 Genoms wurde die Restriktionsschnittstelle *SfiI*, die sich unmittelbar stromab des Startsignals des CVB3-Polyproteins, im 5'-Bereich des CVB3 im Plasmid pMKS1 befindet, ausgewählt, da die Insertion von Fremdsequenzen an dieser Stelle vom Virus toleriert wird. Dazu wurden zwei Primer-Paare mit Basenüberhängen synthetisiert, welche miteinander hybridisiert wurden. Die Basenüberhänge (unterstrichen) entsprechen denen der *SfiI*-Schnittstelle, die restliche Sequenz beinhaltet die Restriktionsschnittstellen *AsiSI*, *XbaI*, *NdeI* und *PmeI*, so dass nach dem Ligieren die *SfiI*-Schnittstellen zerstört werden. Die MCS am 5'-Ende des CVB3-Genoms beinhaltet die gleichen Restriktionsschnittstellen wie die MCS am 3'-Ende (**Abb. 7**). Das erhaltene Plasmid wurde mit pMKS1-5'MCS bezeichnet.



2.2.2.8.4 Klonierung der miRNA-375TS in das 5'-Ende des CVB3-Genoms

Wie bereits bei der Klonierung der miRNA-375TS in das 3'-Ende des CVB3-Genoms, wurde ein Fragment des pMKS1-5'MCS-Plasmids mit dem cDNA-Klon, welches am 5'-Ende eine MCS besitzt, über die Restriktionsenzyme *NotI* und *EcoRV* rausgeschnitten und in ein kleineres Plasmid (pMK-RQ) kloniert (**Abb. 10**). In das erhaltene pMK-RQ-5'MCS-Plasmid wurden drei Kopien der miRNA-375TS über *AsiSI* und *PmeI* inseriert. Aus dem erhaltenen pMK-RQ-5'-375TS-Plasmid wurde das Fragment über *NotI* und *EcoRV* wieder in das pMKS1 zurück kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit pMKS1-375TS(5+) bezeichnet.

Auf diese Weise wurden drei Kopien der miRNA-375TS für den CVB3-Plus -bzw. CVB3-Minusstrang entweder in das 3'-oder 5'-Ende des pMKS1-Plasmids inseriert (**Abb. 11**).

Darüber hinaus wurden auch drei Kopien der miRNA-39TS für den CVB3-Plusstrang über *AsiSI* und *PmeI* in die beiden Plasmide pMKS1-3'MCS und pMKS1-5'MCS integriert (pMKS1-39TS(3+) und pMKS1-39TS(5+)), welche zur Herstellung von Kontrollviren dienten.

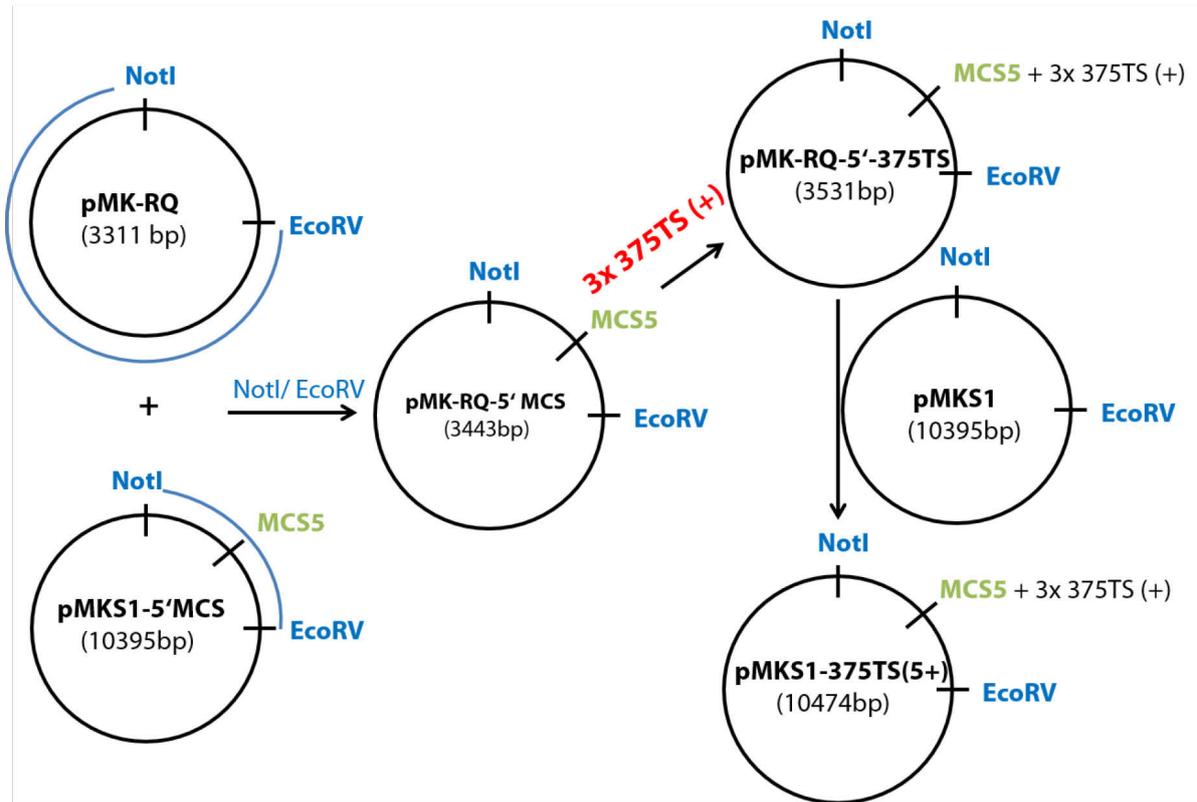


Abbildung 10: Klonierung der TS-Sequenzen am Beispiel der miRNA-375TS, die dreifach in das 5'-Ende des pMKS1-Plasmids inseriert wurden.

[MCS: multiple cloning site]

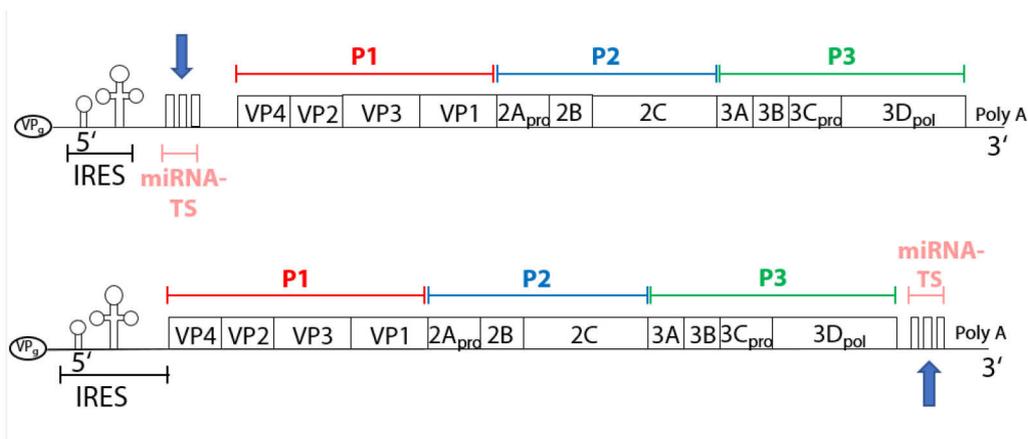


Abbildung 11: Insertionsstellen der miRNA-375TS- sowie der miRNA-39TS-Sequenzen in das 5'- bzw. 3'-Ende des CVB3-Genoms.

Die Darstellung wurde modifiziert nach³⁴. [VP: Virales Protein, IRES: *internal ribosom entry site*; P: Protein, pol: Polymerase, Poly A: polyadenyliert; NTR: nichttranslatierte Region, TS: *target site*]

2.2.2.8.5 Klonierung des pMKS1 Plasmids

Das pMKS1-H3N-Plasmid besteht aus dem pMKS1-Backbone und dem Genom der kardiotropen CVB3-Variante H3, welches aus dem Plasmid pBKCMV-H3 gewonnen wurde. Dieses Plasmid wurde generiert, da die *Sfi*I-Schnittstelle am 5'-Ende des kodierenden Bereichs des CVB3-Genoms die Replikation von rCVB3.1 *in vivo* stark reduzierte. Die CVB3-cDNA im Plasmid pBKCMV-H3 entspricht der CVB3-cDNA im pMKS-1-Plasmid, nur, dass im pBKCMV-H3-Plasmid keine künstlich inserierte *Sfi*I-Restriktionsschnittstelle vorhanden ist. Das pBKCMV-H3-Plasmid enthält jedoch zwei *Cla*I-Restriktionsschnittstellen, sodass eine Insertion der TS über *Cla*I und *Stu*I (siehe nächster Abschnitt) nicht möglich wäre. Daher sollte die *Sfi*I-Restriktionsschnittstellen-freie CVB3-cDNA-Sequenz aus dem pBKCMV-H3-Plasmid in das pMKS1-Plasmid, welches nur eine *Cla*I-Restriktionsschnittstelle besitzt, kloniert werden. Hierzu wurden die Plasmide pMKS1 -und pBKCMV-H3 mit *Cla*I und *Not*I geschnitten und die aus dem Plasmid pBKCMV-H3 isolierte CVB3-H3 cDNA in den pMKS-1 Plasmidbackbone inseriert (**Abb. 12**). Das erhaltene Plasmid bekam die Bezeichnung pMKS1-H3N.

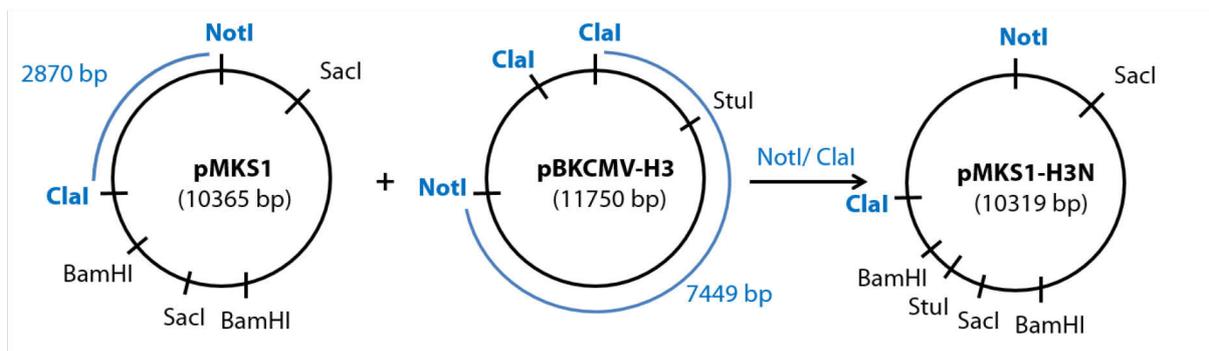


Abbildung 12: Generierung des pMKS1-H3N-Plasmids.

2.2.2.8.6 Klonierung von drei miRNA-375TS Kopien in das pMKS1-H3N Plasmid

Die drei Kopien der miRNA-375TS wurden aus dem pMKS1-375TS(3+)-Plasmid isoliert und in das pMKS1-H3N-Plasmid übertragen. Hierzu wurden beide Plasmide zunächst mit den Restriktionseendonukleasen *Cla*I und *Stu*I geschnitten, um so die drei miRNA-375TS Kopien aus dem Plasmid pMKS1-375TS(3+) zu isolieren. Im Anschluss wurde das über *Cla*I und *Stu*I geschnittene Plasmid pMKS1-H3N mit dem Insert, welches die drei Kopien der miRNA-375TS enthielt, re-ligiert (**Abb. 13**). Das erhaltene Plasmid erhielt die Bezeichnung pMKS1-H3N-375TS(3+).

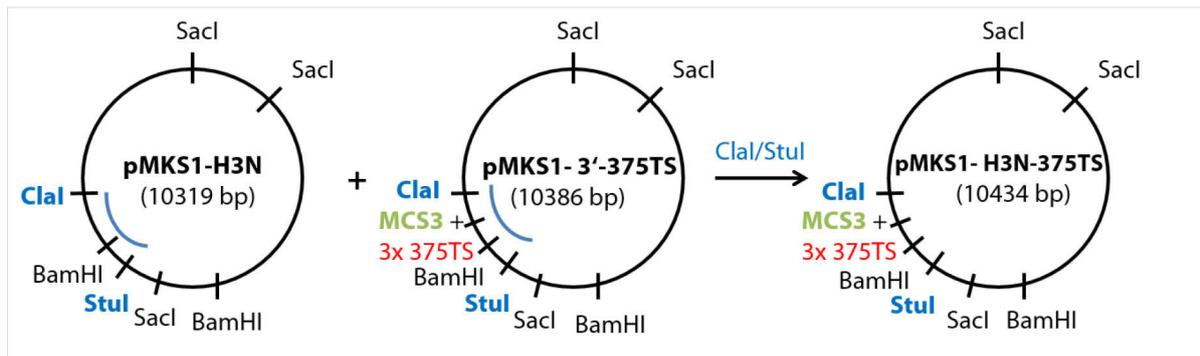


Abbildung 13: Klonierung von drei miRNA-375TS-Kopien in das pMKS1-H3N-Plasmid.

2.2.2.8.7 Klonierung von drei miRNA-375TS-Kopien in das psiCHECK2-Plasmid.

Die Klonierung der miRNA-375- und miRNA-39-TSs in die 3'UTR des psiCHECK2-Plasmids erfolgte über die Restriktionsschnittstellen *AsiSI* und *PmeI* unmittelbar *downstream* des *stop codons* der Renilla-Luciferase-cDNA (Abb. 14).

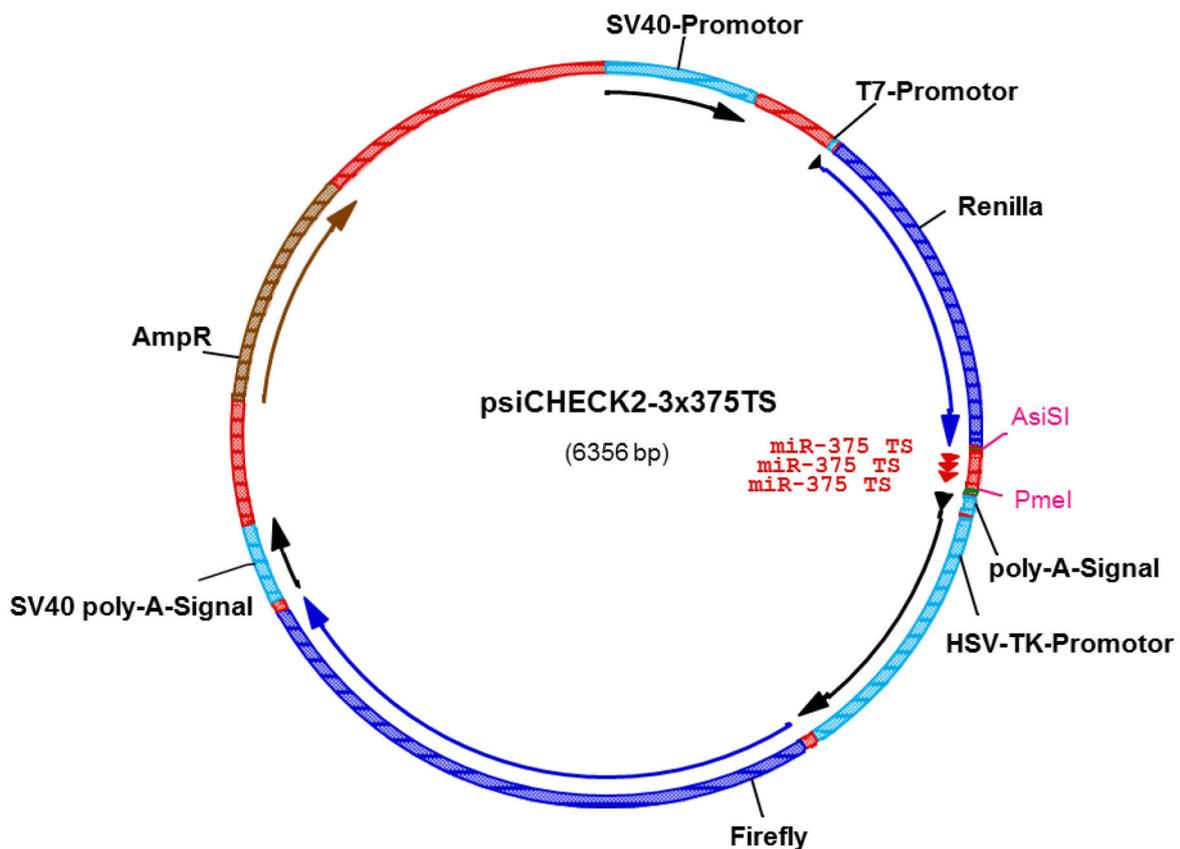


Abbildung 14: Klonierung von drei Kopien der miRNA-375TS in das psiCHECK2-Plasmid.

Auf die gleiche Weise wurde die Kontrolle mit der Hexon-TS über *AsiSI* und *PmeI* in das psiCHECK2-Plasmid kloniert.

2.2.2.9 Sequenzierung

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA bzw. PCR-Fragmenten erfolgte durch die Firmen LGC und SeqLab (Berlin, Deutschland). Dazu wurden in einem Gesamtvolumen von 15 µl, welche entweder 720 bis 1200 ng Plasmid-DNA bzw. 18 ng pro 100 bp des PCR-Produktes, sowie Primer (10 pmol/µl), beinhaltet an die jeweilige Firma geschickt. Die Sequenzierung erfolgte in beiden Richtungen (*sense* und *antisense*-Strang) (**Tab. 19**).

2.2.2.10 RNA-Extraktion

Für die Isolierung der Gesamt-RNA aus Zelllinien, Geweben und Viren wurde TRIzol® verwendet. Die Gewebestücke wurden in einem 5 ml Reaktionsgefäß in 2 ml 1x PBS mit dem Gewebehomogenisator VDI 12 homogenisiert. Alle Arbeitsschritte erfolgten auf Eis unter dem Abzug entsprechend Herstellerangaben. Die isolierte RNA wurde in DEPC-H₂O für 10 min bei 60° C gelöst und im Anschluss bei -80° C gelagert. Für die spätere Sequenzierung viraler RNA wurde diese mit dem High Pure Kit entsprechend Herstellerangaben isoliert. MiRNAs wurden mit Hilfe des mirVana miRNA Isolation Kits aus Zellen und Geweben entsprechend Herstellerangaben isoliert. Die Quantifizierung der RNA erfolgte mittels Nanodrop 2000.

2.2.2.11 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die detaillierte Untersuchung bestimmter Fragmente, sowie deren Klonierung bzw. die Sequenzierung eines DNA-Bereichs ist nur dann möglich, wenn diese in ausreichender Menge vorliegen. Daher wurden gegenläufige Primer generiert, welche sich jeweils vor bzw. hinter dem zu amplifizierenden Bereich anlagern. Beim ersten Schritt der PCR wurden die Proben für 5 min auf 95° C erhitzt, um Doppelstränge aufzutrennen. Im Anschluss erfolgte die Hybridisierung der Primerpaare, indem deren jeweilige optimale Annealing-Temperatur für 30 s konstant gehalten wurde. Die Primerpaare (**Tab. 19**) wurden so designt, dass sie sich in ihrer jeweiligen Annealing-Temperatur, die im Allgemeinen zwischen 50 und 65° C lag, nur minimal unterschieden. Im der darauffolgenden Elongation wurden die Proben für 30 s auf 72° C erhitzt. Die Amplifikation erfolgte in 40 Zyklen. Gemäß der verwendeten Taq-Polymerase der Firma Rapidozym entsprach die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes den Herstellerangaben. Das Ergebnis der Amplifikation wurde mittels Gelelektrophorese überprüft. Anschließend wurden amplifizierte Produkte aus dem Gel extrahiert und über Säulen aufgereinigt.

Die Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes (20 µl) gestaltete sich wie folgt:

1 µl *forward* Primer [10 µM]
1 µl *reverse* Primer [10 µM]
2 µl 10x Polymerase-Puffer
0,8 µl dNTPs (200 µM)
1 µl Taq-Polymerase (Rapidozym)
x µl DNA (500 ng)

add 20 µl DEPC-H₂O

2.2.2.12 cDNA-Synthese mittels Reverser Transkriptase-PCR

Vor der Synthese wurden die RNA-Proben entsprechend der Herstellerangaben mit dem Enzym DNase I behandelt gemäß dem unten aufgeführten Reaktionsschema. Für die reverse Transkription wurden 500 ng RNA eingesetzt, hierbei wurde für das Umschreiben der RNA in cDNA das High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit verwendet. Dabei erzeugt eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die Reverse Transkriptase, ein RNA/DNA-Hybrid. Generell wurden unspezifisch-bindende Random-Hexamer-Primer für die reverse Transkription eingesetzt. Für die reverse Transkription der miRNA wurden hingegen *stem-loop*-Primer und für die der 18S-rRNA spezifische 18S-rRNA Primer verwendet (**Tab.19**). Die Besonderheit der verwendeten *stem-loop*-Primer besteht darin, dass sie spezifisch nur an eine bestimmte miRNA mit 8 Basenpaaren am 3'-Ende binden. Im Verlauf der RT-PCR wird der *stem-loop*-Primer komplementär zur miRNA in 5'-3'-Richtung verlängert.

DNaseI-Verdau:

x µl	RNA-Probe
1 µl	DNase I
1 µl	DNase I-Puffer
<hr/>	
add 20 µl	DEPC-H ₂ O

Der DNaseI-Verdau wurde mit 1 µl Stopplösung bei 65 °C für 10 min inaktiviert.

RT-Ansatz (20 µl):

2 µl	10x RT-Puffer
0,8 µl	25x dNTPs
2 µl	10x RT Random Primer
1 µl	Multiscribe RT
x µl	RNA (500 ng)
<hr/>	
add 20 µl	DEPC-H ₂ O

RT-Programm:

Aktivierung	50 °C	2 min	40 Zyklen
Denaturierung	95 °C	10 min	
Denaturierung	95 °C	15 s	
Elongation	50 °C	1 min	

miRNA-RT-Ansatz (20 µl):

1,5 µl	10x RT-Puffer
3 µl	RT-Primer miRNA
3 µl	RT-Primer u6
0,15 µl	dNTPs (200 µM)
1 µl	RT
5 µl	RNA (50 ng)
<hr/>	
6,35 µl	DEPC-H ₂ O

RT-Programm:

Aktivierung:	50° C	2 min	40 Zyklen
Denaturierung:	95° C	10 min	
Denaturierung:	95° C	15 s	
Elongation:	50° C	1 min	

2.2.2.13 Quantifizierung von cDNA mittels quantitativer PCR

2.2.2.13.1 Quantifizierung von cDNA über TaqMan-Sonden

Die Quantifizierung der cDNA erfolgte mit Hilfe einer relativen quantitativen PCR (q-PCR). Diese ermöglicht es die Amplifikation einer cDNA-Sequenz spezifisch zu verfolgen. Für die Bestimmung der Expressionslevel der jeweiligen miRNA (Quantifizierung durchgeführt von Dr. Hazini, Angewandte Biochemie, TU Berlin) innerhalb der Gewebe oder Zelllinien wurde ein spezifischer miRNA TaqMan Assay (Bestandteil des mirVana-microRNA-Isolation Kit), für die Bestimmung der Expression der durch die CVB3-Infektion induzierten Level ausgewählter Zytokine und Interferone wurden entsprechende TaqMan-Genexpressions Assays der Firma ThermoFisher verwendet. Diese sogenannten TaqMan-Sonden basieren auf dem Mechanismus des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET).²⁸² Dabei wird ein als Donor bezeichneter kurzwelligerer Fluoreszenzfarbstoff angeregt und überträgt so Energie auf einen als Akzeptor bezeichneten langwelligeren Fluoreszenzfarbstoff, was in dessen hellerer Emission resultiert. Dies erfolgt ausschließlich, wenn sich Donor und Akzeptor nicht weiter als 10 nm voneinander entfernt befinden. Die TaqMan-Sonde ist ein Oligonukleotid, welches am 3'-Ende mit einem Quencher (Akzeptor) und an 5'-Ende mit dem Donor markiert ist. Durch die Hybridisierung der TaqMan-Sonde an die DNA-Sequenz, wird durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Polymerase infolge der Amplifikation das 5'-Ende der Taq-Man-Sonde abgespalten und durch die so resultierende Trennung von Donor und Akzeptor die bisher vom Quencher unterdrückte Fluoreszenz emittiert.

Die in cDNA umgeschriebene RNA bzw. miRNA (Kapitel 2.2.2.12) wurde mittels PCR unter Verwendung der TaqMan-Sonde quantifiziert, welche sich, zusammen mit den *forward* und *reverse* Primern für den *loop*, im Mastermix des miRNA TaqMan Assay Kits befand.

qPCR-Ansatz (20 µl):

cDNA (umgeschrieben aus miRNA):

10 µl	TaqMan® Universal Mastermix
1 µl	TaqMan®MicroRNA Assay (20x)
1.33 µl	cDNA (Produkt der miRNA-RT-PCR)
7.67 µl	DEPC-H ₂ O

RT-Programm:

Aktivierung:	50° C	2 min	40 Zyklen
Denaturierung:	95° C	10 min	
Denaturierung:	95° C	15 s	
Elongation:	50° C	1 min	

cDNA (umgeschrieben aus RNA):

10 µl	TaqMan™ Fast Advanced Master Mix
1 µl	TaqMan®Assay (20x)
2 µl	cDNA (Produkt der RNA-RT-PCR)
7 µl	DEPC-H ₂ O

RT-Programm:

Aktivierung:	50° C	2 min	40 Zyklen
Denaturierung:	95° C	10 min	
Denaturierung:	95° C	15 s	
Elongation:	50° C	1 min	

2.2.2.13.2 Quantifizierung des CVB3-Genoms über *EvaGreen*

Die Quantifizierung von CVB3 erfolgte mit Hilfe einer absoluten qPCR. Dafür wurde eine als Standard

dienende Verdünnungsreihe (1×10^6 - 1×10^1 Kopien/ng) des pMKS1-Plasmid erstellt anhand derer die jeweilige Plasmidkopienzahl berechnet wurde. Nach der Amplifikation konnte anhand der Ct-Werte des Standards die entsprechende DNA-Konzentration der CVB3 haltigen Proben bestimmt werden. Für diese Analyse wurde der Fluoreszenzfarbstoff *EvaGreen* verwendet, der sich wie auch SYBR-Green in doppelsträngige DNA einlagert woraus eine verstärkte Fluoreszenz resultiert, welche im gleichen Fluoreszenzbereiche wie die von SYBR-Green liegt. Im Gegensatz zu SYBR-Green weist *EvaGreen* jedoch eine niedrigere PCR-Inhibition auf und verursacht weniger Hintergrundsignal. Zudem ist *EvaGreen* sehr stabil und weder zytotoxisch noch mutagen²⁸³.

qPCR-Ansatz (20 μ l) mit *EvaGreen* (für CVB3 bzw. 18S):

2 μ l	cDNA
0,4 μ l	<i>forward</i> Primer [10 μ M]
1,2 μ l	<i>reverse</i> Primer [10 μ M]
10 μ l	<i>EvaGreen</i> Master Mix
add 20 μ l	DEPC-H ₂ O

PCR-Programm:

Aktivierung	50° C	2 min	40 Zyklen
Initiale Denaturierung	95° C	10 min	
Denaturierung	95° C	15 s	
Elongation	50° C	1 min	

2.2.2.14 Auswertung der relativen Quantifizierung

Um den Δ CT-Wert zu bestimmen, wurde vom ermittelte Ct-Wert der zu untersuchenden mRNA der entsprechende Referenz-Ct-Wert der 18S rRNA subtrahiert (Ct mRNA - Ct 18S rRNA). Die Expressionsstärke der mRNA in Relation zur 18S rRNA ergibt sich aus der Berechnung $2^{-\Delta Ct}$. Um den Expressionsunterschied zwischen zwei Proben zu bestimmen, wurde der $\Delta \Delta$ Ct-Wert (= $\Delta Ct_1 - \Delta Ct_2$) berechnet. Der relative Expressionsunterschied zwischen Probe 1 und 2 konnte dann anhand der Formel $2^{-\Delta \Delta CT}$ berechnet werden.

2.2.2.15 Laser Mikrodisektion

Die Laser-Mikrodisektion wurde nach der von Hvid H. beschriebenen Vorgehensweise von Prof. Dr. Robert Klopffleisch (Institut für Tierpathologie der Freien Universität Berlin) durchgeführt.²⁸⁴ Fünf bis sechs Pankreasschnitte mit einer Dicke von 8 μ m wurden auf einem mit Polyethylenaphthalat beschichteten Glasobjektträger fixiert. Nach der Fixierung mit 95 % Ethanol bei -30° C wurden die Schnitte mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt (H&E-Färbung) und in Diethylpyrocarbonat (DEPC)-Wasser gewaschen. Hämatoxylin dient zur Visualisierung der Zellkerne da es in wässrigen Lösungen mit Metallionen stark basische Chelate bildet, welche von sauren Zellstrukturen wie DNA oder RNA

gebunden werden. Der saure Farbstoff Eosin wird wiederum vorwiegend von basischen Plasmaproteinen gebunden und ermöglicht die Unterscheidung zwischen baso- und azidophilen Zellstrukturen. Die Proben wurden mit steigender Ethanolkonzentration (70, 95 und 99 %) dehydriert und bei RT getrocknet. Im Anschluss wurden die pankreatischen Gewebeprobe vom exokrinen Pankreas und der Langerhans-Inseln mittels PALM Laser und *Pressure Catapulting*-Verfahren voneinander getrennt. Das separierte Gewebe wurde in Eppendorfgefäße mit 30 µl Lysepuffer überführt.

2.2.2.16 Affymetrix miRNA-Chip-Analyse

Zunächst wurden die miRNAs über das mirVana miRNA Isolation Kit aus der Gesamt-RNA nach Herstellerangaben isoliert. Die anschließende Affymetrix miRNA-Chip-Analyse des pankreatischen Gewebes wurde von der Firma IKDT GmbH (Berlin, Deutschland) durchgeführt, um anhand dieser eine miRNA-Expressionsanalytik zu generieren.

Die Affymetrix GeneChip miRNA 3.0 Arrays beinhalten ein Setup aus 1789 humanen und 1188 murinen miRNAs und können zudem pre-miRNAs sowie humane kleine nukleäre RNAs (snoRNAs) und *small Cajal-body-specific* RNAs (scaRNAs) detektieren.

2.2.3 Zellbiologische Methoden

2.2.3.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Die Zellen wurden in T75-Zellkulturflaschen mit 12 ml Medium kultiviert. Die Umsetzung erfolgte bei etwa 95 % Konfluenz indem die Zellen einmal mit PBS gewaschen, anschließend mit 2 ml 0,25 Trypsin/EDTA bei 37° C abgelöst und in 10 ml Medium aufgenommen wurden. Ein Zentrifugationsschritt (5 min, 1000 rpm) trennte die sedimentierten Zellen vom Überstand. Das Zellpellet wurde in Kulturmedium gelöst und auf neue Zellflaschen bzw. Zellkulturplatten aufgeteilt. Der Austausch des Mediums, bzw. das Splitten der Zellen, erfolgte danach alle 2-3 Tage.

2.2.3.2 Einfrieren von Zellen

Da sich die Zellen durch die wiederholte Passagierung in ihren Eigenschaften verändern können, wurden Kryostocks der Zellen erstellt. Für die Herstellung eines Kryostocks wurden die Zellen bis zu einer Konfluenz von etwa 80 % kultiviert. Das Kulturmedium wurde abgesaugt, die Zellen einmal mit 1x PBS gewaschen, anschließend für wenige Minuten bei 37° C mit 0,25 % Trypsin/EDTA inkubiert, danach die Zellsuspension in ein 15 ml Reaktionsgefäß mit 10 ml Kulturmedium überführt und für 5 min bei 1000 rpm und 4° C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in FKS mit 5 % DMSO resuspendiert und in 1,5 ml Aliquots je Kryoröhrchen verteilt. Die Kryoröhrchen wurden in einer speziellen mit Isopropanol gefüllten Box (Abkühlung 1° C/min) für mindestens 24 h bei -80° C gelagert bevor sie für die Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff überführt wurden.

2.2.3.3 Kultivierung von Zellen aus Kryostocks

Die in flüssigem Stickstoff aufbewahrten Kryoröhrchen, mit gefrorenen Zellen, wurden im Wasserbad bei 37° C aufgetaut, in 10 ml des jeweiligen Zellkulturmediums aufgenommen und für 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert, um das im Einfriermedium enthaltene DMSO zu entfernen. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 12 ml frischem Kulturmedium resuspendiert und in T75-Zellkulturflaschen ausgesät. Der Wechsel des Mediums erfolgte am nächsten Tag.

2.2.3.4 Zellzahlbestimmung

Um in den Versuchen stets die gleiche Zellzahl einzusetzen, wurde die Zellzahl pro Milliliter bestimmt. Dafür wurde ein Volumen von 10 µl in Kulturmedium gelösten Zellen auf eine Neubauer-Zählkammer pipettiert und alle vier Quadranten, bestehend aus je 16 Kleinquadraten, unter dem Mikroskop ausgezählt. Die Zellzahl berechnete sich anhand folgender Formel:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{durchschnittliche Zellzahl aus 4 Quadranten} \times 10^4 \text{ (Kammerkonstante)}$$

Die gelösten Zellen wurden entsprechend in Kulturmedium verdünnt und ausgesät.

2.2.3.5 Transfektion eukaryotischer Zellen

Das Einbringen von Plasmid-DNA (Plasmide) bzw. freier RNA/ DNA in höhere eukaryotische Zellen wird als Transfektion bezeichnet. Für die Transfektion wurden verschiedene Transfektions-Reagenzien und Methoden verwendet.

Plasmide/ RNA:

In 24-Well-Platten wurden 150000 HEK293T-Zellen pro Well ausgesät und am nächsten Tag bei 70 %-ger Konfluenz mit 100 µl Transfektionsansatz je Well transfiziert. Für einen Transfektionsansatz wurden 800 ng Plasmid-DNA (abhängig vom Zellkulturgefäß) in ein Eppendorfgefäß vorgelegt und mit opti-MEM auf 50 µl aufgefüllt und gevortext. In ein separates Eppendorfgefäß wurden 1 µl PEI Max 40k (2 µg/µl) mit 49 µl opti-MEM vermischt und gevortext. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur (RT) wurden beide Ansätze miteinander vermischt und erneut gevortext. Nach erneuter Inkubation für 15 min bei RT wurden die Zellen transfiziert.

Zusätzlich zur miRNA-375 exprimiert das pCMV-MIR-375-GFP-Plasmid das grün fluoreszierende Protein (GFP). Die Transfektionseffizienz wurde 24 h nach der Transfektion mikroskopisch ausgewertet. Dazu wurde die Anzahl grünfluoreszierender Zellen (GFP wird über blaues Licht angeregt, Absorptionsspektrum zw. 395-475 nm; und emittiert grünes Licht, GFP-Emmissionsmaximum: 508 nm) im Verhältnis zur Gesamtzellzahl (visualisiert im Phasenkontrast) abgeschätzt. Lag die Transfektionseffizienz über 50 % wurden die Transfektionsversuche mit den Überexpressionsplasmiden fortgesetzt.

Transfektionsansatz mit PEI Max bzw. RNAiMAX: (Ansatz pro Well)

<u>Plasmid-DNA:</u>				<u>siRNA/ miRNA:</u>					
	1x				1x				
pDNA (800 ng)	μl	5 min	15 min	miRNA (10	3 μl	10 min	20 min		
opti-MEM	add 50 μl			μM)	47 μl				
PEI Max	1 μl	5 min			RNAiMAX	3 μl		10 min	
opti-MEM	49 μl				opti-MEM	47 μl			

siRNA/ miRNA-Mimics:

Für die Transfektion von miRNA-Mimics bzw. siRNAs wurden in 24-Well-Platten 180000 HeLa-Zellen pro Well ausgesät und am folgenden Tag bei 80 %-ger Konfluenz mit 50 μl Transfektionsansatz transfiziert. Als Transfektionsreagenz wurde Lipofectamine RNAiMAX nach Herstellerangaben verwendet. Die Endkonzentration der eingesetzten miRNA-Mimics bzw. siRNAs betrug 25 nM. Die Transfektionseffizienz wurde mit einer mit einem Fluorophor gelabelten siRNA (Cy3) überprüft.

Herstellung genomischer RNA von CVB3:

Die Transkription des CVB3-cDNA-Klons aus dem Plasmid pMKS1 erfolgte mit Hilfe des T7-Transkriptionskits. Die CVB3-cDNA befand sich *downstream* eines T7-Promotors. Dazu wurde zunächst das Plasmid pMKS1 mit der Restriktionsendonuklease *ClaI* linearisiert, das Fragment mittels Gelelektrophorese aufgetrennt, aus dem Gel mit dem QIAquick Gel Extraction Kit extrahiert und aufgereinigt. Nachdem die DNA-Konzentration im Nanodrop 2000 bestimmt wurde, wurden 2 μg des linearisierten Plasmid-DNA mit T7-RNA-Polymerase entsprechend den Herstellerangaben transkribiert.

Transkription mit T7 RNA-Polymerase: (Ansatzvolumen 50 μl)

- 10 μl Reaktionspuffer 5x
- 3,6μl NTP-Mix (25 mM je NTP)
- 2,5 μl Dithiotreitol (DTT) (100 mM)
- 1 μl Pyrophosphatase
- 1 μl T7 RNA Polymerase
- x μg linearisierte cDNA
- add 50 μl DEPC H₂O

Nach 2 stündigen Inkubation bei 37 °C wurden die transkribierten Proben 30 min bei 37° C mit DNaseI inkubiert, mittels RNAeasy-Kit aufgereinigt und anschließend deren Konzentration im Nanodrop 2000 bestimmt. Bis zum Gebrauch wurden die Proben bei -80° C gelagert. Die Intaktheit der viralen RNA wurde vor den Transfektionsversuchen mittels Gelelektrophorese überprüft. Die Transfektion erfolgte wie unter Kapitel 2.2.3.5 beschrieben mit RNAiMAX (jedoch auf 6-Well-Platten).

2.2.3.6 Dual-Luciferase Reporter Assay als Funktionalitätsnachweis der miRNA-375-TS

Die Funktionalität regulatorischer DNA-Sequenzen kann durch sogenannte Reporteragen-Analysen

überprüft werden. Dazu wird die zu untersuchende regulatorische DNA-Sequenz direkt vor ein nicht verwandtes Reporter-Gen in ein Reporterplasmid kloniert. Das generierte Reporterplasmid wird in eukaryotische Zellen transfiziert, in denen sich die Expression des Reportergens proportional zum Aktivierungs- bzw. Deaktivierungspotential des inserierten regulatorischen DNA-Fragmentes verhält. Über die Zugabe eines Substrates, welches von dem Reportergen umgesetzt werden kann, kommt es zu einem Chemilumineszenzsignal, welches mit einem Luminometer detektiert wird. Die Verwendung von zwei unterschiedlichen Reportergenen, ermöglicht eine höhere experimentelle Genauigkeit. Während das experimentelle Reportergen mit den Effekten der experimentellen Parameter korreliert, stellt das Kontroll-Reportergen eine interne Kontrolle dar. Die Normalisierung der Aktivität des experimentellen Reportergens auf die des Kontroll-Reportergens minimiert die experimentelle Variabilität (Pipettierolumina, Zellzustand, Transfektionseffektivität, etc.). Entscheidend ist, dass sich die Emissionsspektren der infolge der Substratzugabe resultierenden Chemilumineszenzsignale der beiden Reportergene voneinander unterscheiden.

Durch den Dual-Luciferase-Assay der Firma Promega wurde überprüft, ob die miRNA-375TS, welche vor direkt vor das Renilla-Luciferasegen in den Reporterplasmid kloniert wurde, die Expression der Renilla-Luciferase inhibiert. Diese Expression wurde ins Verhältnis zur Expression der Firefly-Luciferase gesetzt, deren Expression wiederum nicht durch das Vorhandensein der miRNA-375TS betroffen sein sollte. Die aus der Umsetzung des im Puffer enthaltenen Luciferins, welches sowohl Substrat der Firefly- als auch der Renilla-Luciferase darstellt, resultierende Chemilumineszenz (Emissionsmaximum Renilla: 480 nm, Firefly: 565 nm) wurde luminometrisch detektiert und zueinander ins Verhältnis gesetzt.

Wie bereits unter Kapitel 2.2.2.8.7 beschrieben, wurden die miRNA-375TS in das 3'UTR eines psiCHECK2-miR-375TS-Plasmids integriert. Um die Funktionalität der miRNA-TS zu überprüfen wurde jede Messung als Duplikate durchgeführt. In 24-Well-Platten wurden 150000 HEK293T-Zellen ausgesät, welche mit 400 ng pCMV-MIR-375-GFP und 400 ng psiCHECK2-375TS unter Verwendung von PEI Max kotransfiziert wurden (Kapitel 2.2.3.5). Nach 48 h wurden die Zellen lysiert und die Reporterogenaktivität mit dem TriStar2 Multimode nach Herstellerangaben gemessen.

2.2.3.7 Zellviabilitätsassay

Die Messung der Zellviabilität wurden mit dem Cell Proliferation Kit II (XTT) nach Herstellerangaben durchgeführt. Das Zellviabilitätsassay basiert auf der photometrischen Messung des Tetrazoliumsalzes (XTT), welches durch die Dehydrogenase metabolisch aktiver Zellen zu einem orange fluoreszierenden Formazanprodukt reduziert wird. Die Menge an gebildetem Formazan ist proportional zur Viabilität der Zellen. In 96-Well-Platten wurden 50000 HeLa-Zellen pro Well ausgesät und nach 24 h bei einer Konfluenz von 90 % mit einer MOI von 0,001 bzw. 0,0001 an rekombinantem CVB3 (4-fach Bestimmung je Probe) infiziert. Nach 24, 48 und 72 h wurden 50 µl XTT-Substrate zu jeder Probe pipettiert und nach 4 h Inkubationszeit die Menge an gebildetem Formazan bei 450 nm (Tristar2

Multinode Reader LB942) gemessen. Für die Bestimmung der Viabilität wurde der Mittelwert der Lysekontrollen gebildet (vier Wells mit 50 µl XTT-Substrat und zusätzlich 0,05 % Triton-X) und dieser von jeder Probe abgezogen. Die Messwerte aller Proben wurden ins Verhältnis zu den unbehandelten Proben (Mock) gesetzt.

2.2.4 Westernblot

Alle proteinchemischen Analysen wurden extern von Dr. Klaus Knoch am DZD-Paul Langerhans Institut in Dresden durchgeführt. Die Zellen wurden mit Lysepuffer behandelt und die Proteinkonzentration mittels BCA-Assay bestimmt. Separat wurden die Zellextrakte auf eine SDS-PAGE aufgetragen und im Anschluss gebロットet. Für die Detektion von CVB3-VP1 wurde ein anti-CVB3-VP1-Antikörper (1:500 Verdünnung) verwendet, als Kontrolle dienten ein anti- γ -Tubulin (1:2000) und der polyklonale Antikörper anti-eIF4G (1:1000). Die Membranen wurden mit den benannten Antikörpern in PBS mit 5 % Magermilchpulver über Nacht bei 4° C inkubiert. Im Anschluss wurden die Membranen dreimal mit 1x PBS gewaschen und in 5 % Magermilchpulver/PBS mit den Sekundäantikörpern Ziege-anti-Maus bzw. Ziege-anti-Kaninchen IgGs (1:5000) für eine Stunde bei RT inkubiert. Als Größenmarker wurde der Magic Mark XP verwendet.

2.2.5 Virologische Methoden

2.2.5.1 Herstellung von rekombinantem CVB3

Transfektion von CVB3-cDNA-Klonen in HEK293T-Zellen:

HEK293T-Zellen wurden auf 6-Well-Platten so ausgesät, dass diese nach 24 h eine Konfluenz von 70-90% (1-1,2 Mio. Zellen) erreicht hatten. Die Herstellung des Transfektionsansatzes unterteilt sich in zwei Schritte. Zunächst wurden 3,2 µg Plasmid-DNA mit 200 µl optiMEM vermischt und für 5 min bei RT inkubiert. Parallel wurden 4 µl PEI Max (2 mg/ml) in 200 µl OptiMEM aufgenommen und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden beide Ansätze miteinander vermischt, gevortext und 15 min bei RT inkubiert. In jedes Well wurden vorsichtig 400 µl des Transfektionsansatz pipettiert und die Platte leicht geschwenkt. Nach 24 bis 48 h wurden die lysierten Zellsuspensionen nach zwei Einfrier-Auftau-Zyklen in ein 2 ml Eppendorfgefäße überführt und 5 min bei 5000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und der Virustiter mittels Plaque Assay auf HeLa Zellen bestimmt (Kapitel 2.2.5.3).

Virusamplifikation:

HeLa-Zellen wurden in T175-Zellkulturflaschen bis zu einer Konfluenz von 90 % angezogen, anschließend wurde das Kulturmedium abgesaugt, die Zellen mit 1x PBS gewaschen und 20 ml virushaltigem Kulturmedium ohne FKS mit einer MOI von 5 in die Kulturflasche gegeben.

Nach 30 min Inkubation bei 37° C im Brutschrank (5 % CO²) wurde das Medium abgesaugt und durch frisches FKS haltiges Kulturmedium ersetzt. 24 h später wurden die Zellkulturflaschen bei -20° C eingefroren und wieder aufgetaut. Nach zwei weiteren Zyklen aus Einfrieren und Auftauen wurde die

Zellsuspension in 50 ml Falconröhrchen überführt und bei 3000 g für 5 min zentrifugiert. Die Überstände wurden in neue Reaktionsgefäße überführt, aliquotiert und die Virustiter mittels Plaque Assay (Kapitel 2.2.5.3) bestimmt. Die Lagerung der Viren erfolgte bei -80°C . Die Herstellung von CVB3 und die Bestimmung der Virentiter sind schematisch in Abbildung 15 dargestellt.

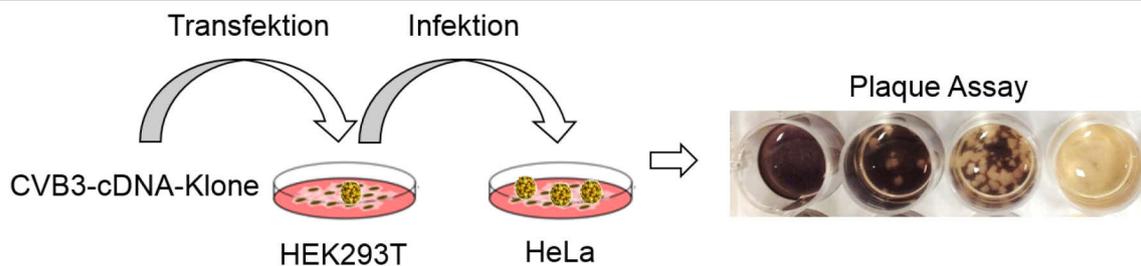


Abbildung 15: Produktion rekombinanten CVB3's einschließlich der Bestimmung des Virustiters mittels Plaque Assay.

2.2.5.2 Aufreinigung der Viren mittels Saccharose-Kissen

In ein 12 ml Polyallomer Zentrifugationsröhrchen (zuvor mit 70% EtOH ausgespült und vollständig getrocknet) wurden 3 ml 30 % ige Saccharose gegeben und das Röhrchen bei (-20°C) eingefroren. Zehn ml der Virussuspension wurden vorsichtig auf das gefrorene Saccharosekissen gegeben, so dass ein Abstand von 5 mm zwischen dem Flüssigkeitspiegel und der oberen Röhrchenkante bestand. Nach Auftauen des Saccharosekissen und Austarieren des Röhrchens, erfolgte eine Ultrazentrifugation in der Beckman Optima L-90K mit einem SW41 Rotor für 3 h bei 40000 rpm. Anschließend wurden die Proben auf 4°C gekühlt. Der Überstand wurde aus dem Röhrchen entfernt und das Pellet in 2 ml 1x PBS (25 mM MgCl_2) gelöst. Um die Saccharosereste in der Virussuspension vollständig zu beseitigen wurden 10 ml 1x PBS (25 mM MgCl_2) in ein 12 ml Polyallomer Zentrifugationsröhrchen vorgelegt und mit 2 ml Virenlysate überschichtet die Röhrchen und unter den oben aufgeführten Bedingungen erneut zentrifugiert, diesmal jedoch nur für 1,5 h. Anschließend wurde das Pellet in 200 μl 1x PBS (25 mM MgCl_2) gelöst, aliquotiert und eingefroren. Die Bestimmung des Virustiters erfolgte über einen Plaque Assay (Kapitel 2.2.5.3).

2.2.5.3 Bestimmung des Virustiters mittels Plaque Assay

Die Virentiter wurden mittels Plaque Assay bestimmt. Dafür wurde der zu untersuchende Virusstock in 1x PBS in 1:10-Schritten verdünnt. In 24-Well-Platten wurden 220000 HeLa-Zellen je Well ausgesät und bei einer Konfluenz von etwa 90% mit den erstellten 1:10-Verdünnungen der zu überprüfenden Viruslösung infiziert. Zunächst wurde das Kulturmedium vorsichtig abgesaugt, die verdünnten Virussuspensionen hinzu pipettiert und für 30 min bei 37°C im Brutschrank (5 % CO_2) inkubiert. Daraufhin wurde die Virussuspension vorsichtig abgesaugt und die Zellen mit 500 μl Eagle-Overlay (Zusammensetzung siehe **Tabelle 21**) überschichtet. Alle benötigten Komponenten sind in Tabelle 21 dargestellt. Der Difco-Agar wurde in der Mikrowelle (600 W, 1 min) verflüssigt. Alle anderen

Komponenten wurden im Wasserbad auf 42° C temperiert. Die aufgewärmten Bestandteile des Eagle Overlay-Mediums wurden in einem 50 ml Reaktionsgefäß vermischt und weiterhin bei 42° C im Wasserbad inkubiert. Um zu verhindern, dass die Nährlösung denaturiert bzw. klumpig bzw. fest wird darf die Temperatur des Wasserbades 42° C nicht unterschreiten.

Nachdem das Eagle-Overlay binnen 15 min bei RT fest wurde, wurde die Kulturplatte für zwei bis drei Tage (abhängig vom CVB3-Stamm) bei 37° C im Brutschrank (5 % CO₂) kultiviert. Die Plaques wurden abschließend mit 2x MTT-INT-Färbelösung angefärbt (20 µl pro Well), nach weiteren 2 h Inkubation gezählt und die Anzahl der *Plaque Forming Units* (pfu) berechnet.

Tabelle 21: Zusammensetzung des Eagle-Overlay-Mediums.

Agar (3,3% ig) [ml]	5	7,5	10	12,5	15	17,5	20
Eagle Medium [ml]	15	22,5	30	37,5	45	52,5	60
FKS [ml]	2	3	4	5	6	7	8
Gesamtvolumen Overlay-Ansatz [ml]	22	33	44	55	66	77	88

2.2.5.4 Infektion von Zellkulturen mit CVB3

Für die Infektionsversuche wurden HeLa -bzw. HEK293T-Zellen verwendet. Dazu wurden die Zellen auf 24-Well-Platten so ausgesät, dass diese am folgenden Tag zu etwa 90% konfluent waren. Die benötigte MOI des Virus wurde entsprechend der ausgesäten Zellzahl berechnet. Bei einer MOI von 1 wird theoretisch eine Zelle von einem Viruspartikel befallen. Für diese Berechnung muss die Konzentration des Virusstocks bekannt sein. Diese wird in pfu pro Milliliter (pfu/ml) angegeben und wird wie folgt berechnet:

$$\text{pfu/ml} = \frac{\text{Zellzahl} * \text{MOI} * \text{Inokulationsvolumen}}{\text{Virusstammlösung}}$$

Die berechnete Virusmenge wurde in 1x PBS aufgenommen, so dass das Inokulationsvolumen für eine 24-Well-Platte 300 µl pro Well betrug. Vor der Infektion wurde das Medium vorsichtig abgesaugt, die Virussuspension hinzugegeben und für 30 min bei 37° C im Brutschrank (5 % CO₂) inkubiert. Im Anschluss wurde die Virussuspension abgesaugt, die Zellen mit 1x PBS gewaschen, mit frischem Medium überschichtet und je nach gewünschter Infektionsdauer bei 37° C inkubiert.

2.2.5.5 MiRNA vermittelte CVB3-Inhibierungsassays

Alle Inhibierungsassays wurden entweder mit pCMV-MIR-375 -bzw. pCMV-MIR-216a-Überexpressionsplasmiden auf HEK293T-Zellen oder mit miRNA-375-Mimics -bzw. siRNAs auf HeLa-Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden mit rekombinanten CVB3-Varianten, welche Modifikationen am 3' -oder 5'-Ende besitzen, infiziert. Die Target-Sequenzen (TS) für die miRNA-375 waren entweder für den CVB3-Plus -bzw. CVB3-Minusstrang generiert ((+) -bzw. (-)-Orientierung)). Als Kontrolle wurde die miRNA-39TS verwendet.

MiRNA-375 vermittelte Inhibierung von rekombinanten CVB3 mit integrierten miRNA-375TS:

Die HEK293T-Zellen wurden entweder mit pCMV-MIR-375 -oder mit pCMV-MIR-216a (Negativkontrolle) -Expressionsplamiden transfiziert. Nach 24 h wurden diese mit CVB3-375(3+), CVB3-375(3-), CVB3-375(5+), CVB3-375(5-) bzw. mit der Kontrolle CVB3-39TS infiziert (MOI 0,1).

HeLa-Zellen und miRNA-Mimics/siRNA:

Nachdem zuvor beschriebenen Schema für HEK293T-Zellen wurden auch HeLa-Zellen infiziert. Im Unterschied zu den HEK293T-Zellen wurden die HeLa-Zellen zunächst mit einer Konzentration von 25 nM miRNA-Mimics bzw. Kontroll-siRNAs transfiziert und nach 4 h Kultivierungszeit mit rekombinantem CVB3 infiziert. Nach 24 stündiger Infektion, nach zwei Zyklen bestehend aus Einfrieren und Auftauen wurden die lysierten Zellen samt Medium in Eppendorfgefäße überführt, zentrifugiert und mittels Plaque Assay die Virustiter bestimmt.

EndoC-βH1-Zellen:

Die EndoC-βH1-Zellen exprimieren endogen miRNA-375. Alle Infektionsversuche mit dieser und INS-1E-Zelllinie (sowie Westernblots) wurden extern von Dr. Klaus Knoch am DZD-Paul Langerhans Institut in Dresden durchgeführt.

2.2.6 CVB3-Myokarditismodell in der Maus

2.2.6.1 Injektion und zeitlicher Ablauf der CVB3-Injektion

Alle in dieser Arbeit verwendeten Mäuse wurden unter Einhaltung der deutschen Tierschutzgesetze -und Verordnungen behandelt. Die Tierexperimente wurden durch das Landesamt für Gesundheit und Soziales (LAGeSo) Berlin genehmigt. Für die Tierversuche wurden sowohl männliche Balb/C, NMRI und C57BL/6 (Black 6) als auch weibliche Balb/C und NMRI-Mäuse von Charles River (Sulzfeld, D) verwendet. Nach der Ankunft wurden die Tiere eine Woche lang im Tierstall adaptiert, bevor Experimente durchgeführt wurden.

Die Infektion mit CVB3 erfolgte intraperitoneal (i.p.) bzw. intravenös (i.v.). Bei der i.p. Injektion wurden pro Maus 200 µl der benötigten Virusmenge (5×10^4 - 1×10^8 pfu) in 0,9 % NaCl-Lösung gelöst und mit einer Spritze appliziert. Die Mäuse wurden dabei manuell fixiert.

Bei der i.v. Applikation wurden 100 µl der Virussuspension (5×10^6 - 1×10^8 pfu) injiziert. Hierzu wurden die Mäuse mit Isofluran narkotisiert, der Zugang zur *Vene jugularis* hergestellt und die Virussuspension mit der Hilfe einer Hamiltonspritze vorsichtig und luftblasenfrei in die linke *Vene jugularis* injiziert. Im Anschluss wurden die Wunden vernäht.

Die Tiere wurden täglich gewogen. Bei einer Gewichtsabnahme von 10% wurde zusätzlich Nassfutter verabreicht, um die Nahrungsaufnahme zu erleichtern.

Nach sieben (akutes CVB3-Modell) bzw. 28 (chronisches CVB3-Modell) Tagen wurden die Tiere mittels Genickbruch getötet. Es wurden Organ- und Blutproben für histologische, molekularbiologische und labordiagnostische Untersuchungen entnommen.

Organproben vom Pankreas wurden in Trizol überführt und ebenso wie Organproben von Herz in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Auswertung bei -80°C gelagert. Die Blutproben wurden bei 3000 g für 5 min abzentrifugiert, die Blutseren abgenommen und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.6.2 Allgemeiner Gesundheitsstatus

Der allgemeine physiologische Gesundheitsstatus der Mäuse wurde am siebten (akutes CVB3-Modell) bzw. am 28. Tag (chronisches CVB3-Modell) nach der Infektion mit CVB3 anhand einer Skala von 1-5 (Score 1-5) beurteilt. Ein Score von 5 wurde für Tiere vergeben, die keinerlei Einschränkungen des Gesundheitszustands zeigten, wohingegen bei einem Score von 1 die Tiere lediglich eine geringe Aktivität und klinische Anzeichen einer schweren Infektionskrankheit aufwiesen (stark reduzierte Bewegung, gekrümmte Haltung, struppiges Fell). Der Score wurde stets für alle Tiere einer Gruppe ermittelt und ist als Mittelwert angegeben.

2.2.6.3 Histologische Untersuchungen

Die Organproben wurden in einer 4 %-igen Formalinlösung fixiert. Etwa 5 μm Große Gewebeproben wurden geschnitten, in Paraffin eingebettet und mittels H&E Färbung angefärbt, um die Zerstörung und die Inflammation der Gewebe zu visualisieren.

Mit der Masson-Trichrom-Färbung wurden fibrotischen Bereiche visualisiert. Die hier verwendete Trichrom-Färbung nach Masson-Goldner kombiniert die Farbstoffe Eisenhämatoxylin, Azophloxin, Orange G und Lichtgrün SF, was eine selektive Darstellung von Kernstrukturen, Muskelfasern, Kollagen, Fibrin und Erythrozyten erlaubt. Um die durch Myokarditis verursachte Inflammation einzustufen zu können, wurde ein Inflammationsscore vergeben. Dieser lag zwischen 0 (keine Inflammation); 1 (kleine Inflammationsspot, < 100 inflammatorische Zellen/ Herd); 2 (größere Inflammationsspot > 100 inflammatorischer Zellen/ Herde); 3 ($\leq 10\%$ der Querschnittsfläche) und 4 (10-30% der Querschnittsfläche). Die Bewertung der gefärbten Gewebe erfolgte mikroskopisch.

Die histopathologischen Bewertungen wurden durch Prof. Dr. Robert Klopffleisch (Institut für Tierpathologie der Freien Universität Berlin) bzw. durch Prof. Dr. Karin Klingel (Kardiopathologie im Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Tübingen) durchgeführt.

2.2.6.4 Herzpassagierung von CVB3

Sechs Wochen alte weibliche NMRI-Mäuse wurden mit jeweils 5×10^6 pfu eines CVB3-Virusstocks (H3N-375TS) i.p. infiziert. Nach sieben Tagen wurden die Tiere getötet, die Herzen entnommen und mit dem Ultraturax in serumfreiem Medium zerkleinert. Nach zwei Zyklen aus Einfrieren und Auftauen

wurde die Konzentration der Viren mittels Plaque Assay bestimmt. Mit den Viren wurden HeLa-Zellen in einer T175-Kulturflasche mit einer MOI von 5 infiziert, mittels Saccharosegradientenzentrifugation konzentriert und aufgereinigt, und die Titer mittels Plaque Assay bestimmt.

2.2.6.5 Hämodynamische Messung

Die in dieser Studie angewandte Methode der hämodynamischen Messungen wurde durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Carsten Tschöpe (Institut für Kardiologie, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow-Klinikum) durchgeführt. Dafür wurden die entsprechenden infizierten Tiere sowie die jeweiligen Kontrollgruppen am siebten Tag der Infektion bzw. am 28. Tag der Infektion im chronischen Modell über die intraperitoneale Injektion von 0.8-1.2 g/kg Urethan und 0.05 mg/kg Buprenorphin anästhesiert. Für die Intubation wurden die Tiere in Rückenlage fixiert und der Hals überstreckt. Mittels eines in die Trachea eingeführten Plastiktubus wurden die Tiere maschinell beatmet (Rodent Ventilator Type 7025, Ugo Basile, Comerio VA, Italien). Der Thorax wurde unter Vermeidung größerer Blutverluste mittels eines Längsschnittes geöffnet und der linke Ventrikel mit einer 20G Plastikkanüle punktiert. Über diese Kanüle wurde ein 1.2.F Druck-Volumen-Katheter (Scisense Inc., Ontario, Kanada) in den linken Ventrikel des Herzens eingeführt. Über den Katheter wurden die linksventrikulären Druck-Volumen-Schleifen detektiert, welche über einen Mark VII Linearorder (Graphtec Corp., Tokyo, Japan) bildlich dargestellt zu den entsprechenden Parametern weiterverarbeitet wurden. Über die Messung der maximalen Druckanstiegsgeschwindigkeit dP/dt_{max} (mmHg/s), wurde der links-ventrikuläre systolische Druck, welche die Kontraktilität beschreibt, quantifiziert. Anhand der Messung der maximalen Druckabfallgeschwindigkeit dP/dt_{min} (mmHg/s) wurde der links-ventrikuläre diastolische Druck quantifiziert, welcher wiederum die Relaxationsfähigkeit (*Compliance*) beschreibt. Die Messungen wurden für 5 min je Versuchstier durchgeführt.

2.3 Statistische Auswertung

Alle Daten sind dargestellt als \pm *standard error of the mean (SEM)*. Die statistischen Signifikanzen der *in vitro* Daten wurden mit dem *students-t-Test* ausgewertet. Die Auswertung der *in vivo* Daten erfolgte mit dem ungepaarten, zweiseitigen Mann-Whitney-U-Test. In beiden Tests wurden die Messwerte zweier Gruppen ab einem p-Wert von kleiner als 5 % ($p \leq 0,05$) als signifikant bewertet. Weitere vergebene Signifikanzlevel waren kleiner als 1% ($p \leq 0,01$) und kleiner als 0,1% ($p \leq 0,001$). In den Abbildungen wurden die Signifikanzen wie folgt dargestellt $p \leq 0.05 = *$, $p \leq 0.01 = **$, $p \leq 0.001 = ***$.

3 Ergebnisse

3.1 Evaluierung der miRNA

Um ein Pankreas attenuiertes CVB3 entwickeln zu können, war es zunächst wichtig die Expressionen der miRNAs im gesamten Pankreas zu bestimmen. Dafür wurde über eine Affymetrix Chip-Analyse, mit welcher 1188 murine miRNAs detektiert werden können, ermittelt, welche der im gesamten Pankreas exprimierten miRNAs die stärksten Expressionssignale aufweisen. Für weitere Untersuchungen wurden die acht mRNAs mit dem höchsten *detection above background on gene level* (DABG-Signal) ausgesucht (**Tab. 22**).

Tabelle 22: Ergebnisse der Affymetrix miRNA-Chip-Analyse

Proben-ID	Signal
mmu-miRNA-375	11,74
mmu-miRNA-200c	11,71
mmu-miRNA-690	11,13
mmu-miRNA-217	11,09
mmu-miRNA-216a	10,72
mmu-miRNA-216b	10,24
mmu-miRNA-200b	10,08
mmu-miRNA-200a	9,51

Von den in der **Tabelle 22** dargestellten Daten zeigten die miRNAs-375, -200c, -690 und -217 die stärksten Signale in der Affimetrix mirRNA-Chip-Analyse des Gesamtpankreas, wobei die miRNA-375 das höchste Expressionslevel aufwies.

Das Pankreas gliedert sich in endo -und exokrines Pankreasgewebe. In Mäusen repliziert CVB3 im exokrinen Pankreas, so dass zunächst sichergestellt werden musste, ob die jeweiligen mRNAs auch in diesem Teil des Pankreas exprimiert werden. Um jedoch den Schutz des gesamten Pankreas mit Hilfe von miRNAs vor einer CVB3-Infektion gewährleisten zu können, ist es essentiell, dass diese in beiden Gewebeteilen des Pankreas stark und miteinander vergleichbar exprimiert werden.

Um dies für die mittels der Affimetrix miRNA-Chip-Analyse identifizierten miRNAs (**Tab. 22**) zu überprüfen, wurde das Pankreasgewebe von Balb/C-Mäusen mittels Lasermikrodissektion separiert, um die Expressionslevel der miRNAs im endo -und exokrinen Pankreas zu bestimmen. Die RNA beider Gewebefractionen wurde mittels TRIzol extrahiert und die Expressionslevel der in **Tabelle 22** aufgeführten miRNAs mit Hilfe einer qRT-PCR bestimmt. Für die relative Quantifizierung der miRNA Expression wurde als endogenes Referenztranskript die U6 *small nuclear* RNA (U6 snRNA) mitgeführt. Auf diese wurden die Ct-Werte der ermittelten miRNAs normalisiert. Werden üblicherweise sogenannte *Housekeeping*-Gene wie die 18S rRNA zur RNA Quantifizierung von RNA verwendet, hat sich für die

miRNA Analyse in Geweben die U6 snRNA bewährt. Die Ergebnisse der qRT-PCR zeigten, dass die miRNA-375 sowohl im endo- als auch im exokrinen Pankreas am stärksten exprimiert wird (**Abb. 16**). Im Vergleich zur miRNA-375 wiesen die miRNAs-200a, -200b, -200c sowie die miRNA-690 eine etwa um eine \log_{10} -Stufe geringere Expression auf und wurden jeweils in beiden Pankreasgeweben vergleichbar stark exprimiert. Die miRNAs-216a, -216b und -217 wurden stärker im exokrinen Pankreas exprimiert und zeigten durchschnittlich eine um zwei \log_{10} -Stufen niedrigere Expression als die miRNA-375 (**Abb. 16**).

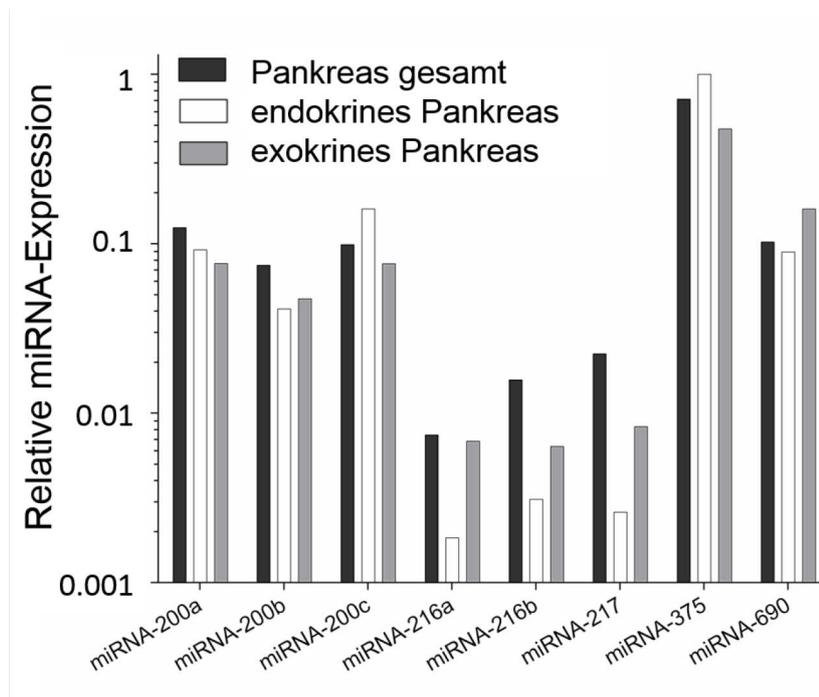


Abbildung 16: Relative miRNA-Expression in den pankreatischen Geweben von Balb/C-Mäusen.

Die RNA des Gesamtpankreas sowie die der mittels Laserresektion separierten endo- und exokrinen Pankreasgewebeteile wurde über TRIzol-Extraktion isoliert und mit einer qRT-PCR auf die Expression verschiedener miRNAs überprüft. Für die Evaluierung der miRNAs wurden diese auf die Expression der mitgeführten Referenzkontrolle U6 snRNA relativiert. n=1.

Für die Generierung des optimierten CVB3-Maus-Myokarditismodells mittels miRNA-TS regulierter pankreasattenuierter CVB3-Varianten sollte die ausgewählte miRNA sehr stark im Pankreas und gleichzeitig möglichst gering im Herzen exprimiert werden. Nur so kann gewährleistet werden, dass ein effizienter Abbau des CVB3-Genoms im Pankreas erfolgt, wohingegen das Virus im Herzen weiterhin repliziert. Aus diesem Grund wurden im Anschluss an die Analyse der miRNA-Expression im Pankreas die Expressionslevel der evaluierten miRNAs im Herzgewebe von Balb/C-Mäusen untersucht (**Abb. 17**). Entsprechend der relativen Quantifizierung der pankreatischen miRNA-Expression erfolgte diese innerhalb der Herzgewebe mittels einer relativen qRT-PCR und der Normalisierung auf die endogene Referenz U6 snRNA. Der Vergleich der Expressionslevel zeigte, dass alle getesteten miRNAs stärker im Pankreas als im Herzen exprimiert wurden. Die höchsten Expressionslevel im Pankreas wiesen miRNA-375 und -690 auf. Da die miRNA-375 im Herzen jedoch fast um drei \log_{10} -Stufen niedriger exprimiert wurde als die miRNA-690 und sie in der vorangegangenen quantitativen Expressionsanalyse

des endokrinen, vor allem aber des exokrinen Pankreas, die stärkste Expression in beiden Gewebeteilen aufwies (**Abb. 17**), wurde sie für die weiteren Untersuchungen ausgewählt.

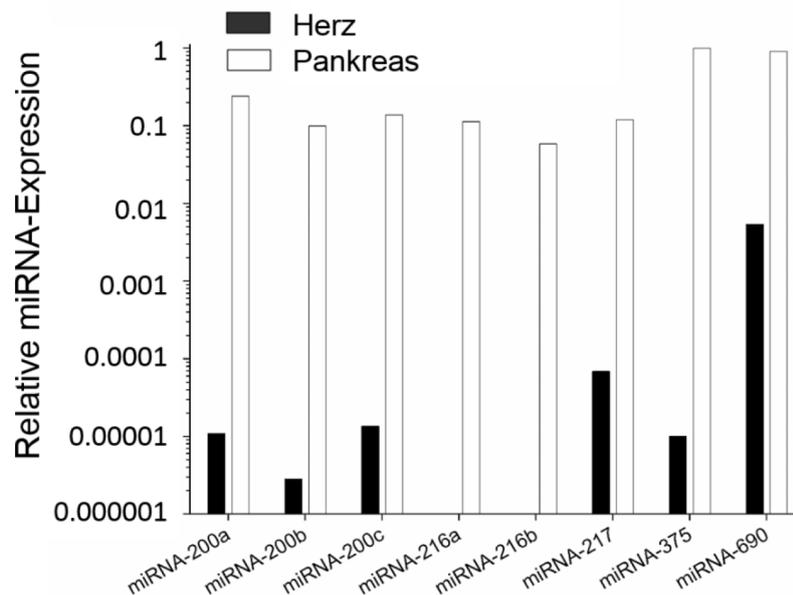


Abbildung 17: Relative miRNA-Expression in Herz und Pankreas von Balb/C-Mäusen.

Die RNA der murinen Pankreas- und Herzgewebe wurde mittels TRIzol-Extraktion isoliert und über eine qRT-PCR auf die Expression verschiedener miRNAs überprüft. Für die Evaluierung der miRNAs wurden diese auf die Expression der mitgeführten Referenzkontrolle U6 snRNA relativiert. n=1.

3.2 Insertion der miRNA-375TS in das CVB3-Genom

Das miRNA-Targeting basiert auf einer kurzen, perfekten Übereinstimmung mit der Ziel mRNA in Kombination mit weiteren unvollkommenen Übereinstimmungen in deren unmittelbarer Nähe. Diese als *seed*-Region bezeichnete Sequenz umfasst etwa 6-8 Nukleotide, welche meist zwischen dem zweiten und siebten Nukleotid am 5'-Ende der miRNA beginnt²⁸⁵. Die gesamte Sequenz der miRNA-375 (mmu-Maus) wurde mit Hilfe der Internetdatenbank www.mirbase.org bestimmt und weist nachfolgende Sequenz auf:

5-UUUGUUCGUUCGGCUCGCGUGA-3 mmu-miRNA-375-3p

Aus der gesamten Sequenz der reifen miRNA-375 wurde die nachstehend aufgeführte komplementäre miRNA-375TS-Sequenz (synthetisiert von der Firma *LifeTechnologies*) in drei Kopien in das virale Genom inseriert.

5-TCACGCGAGCCGAACGAACAAA-3 miRNA-375TS

Mehrere Studien mit miRNA-TS zeigten, dass eine Mehrfachinsertion der gleichen TS nötig ist, um eine effektive Inhibierung der Virusreplikation zu erzielen.²⁴⁶ Zudem kann über mehrere TS eine stärkere Inhibierung erreicht werden. Eine Insertion von mehr als drei TS zeigte jedoch keine signifikant stärkere

Inhibierung, bzw. kann sich negativ auf die Replikation auswirken, da mit zunehmender Genomgröße das Virus replikationsträger wird^{246,279}.

Nachdem die zur miRNA-375 komplementäre miRNA-375TS-Sequenz bestimmt wurde, wurde sie in das pMKS1-Plasmid²⁷⁹, in welches zuvor eine MCS kloniert wurde (pMKS1-3'MCS bzw. pMKS1-5'MCS), inseriert. Alle durchgeführten Klonierungsschritte sind dem Kapitel 2.2.2.8 zu entnehmen. Die dabei generierten viralen Vektoren sind in der Tabelle 12 (Kapitel 2.1.9) aufgeführt. Die Insertionsstellen der komplementären TS in 3'-bzw. 5'- Enden des CVB3-Genoms in das Plasmid pMKS1 sind in **Abbildung 18** dargestellt. Auf die gleiche Weise erfolgte die Insertion der miRNA-39TSs.

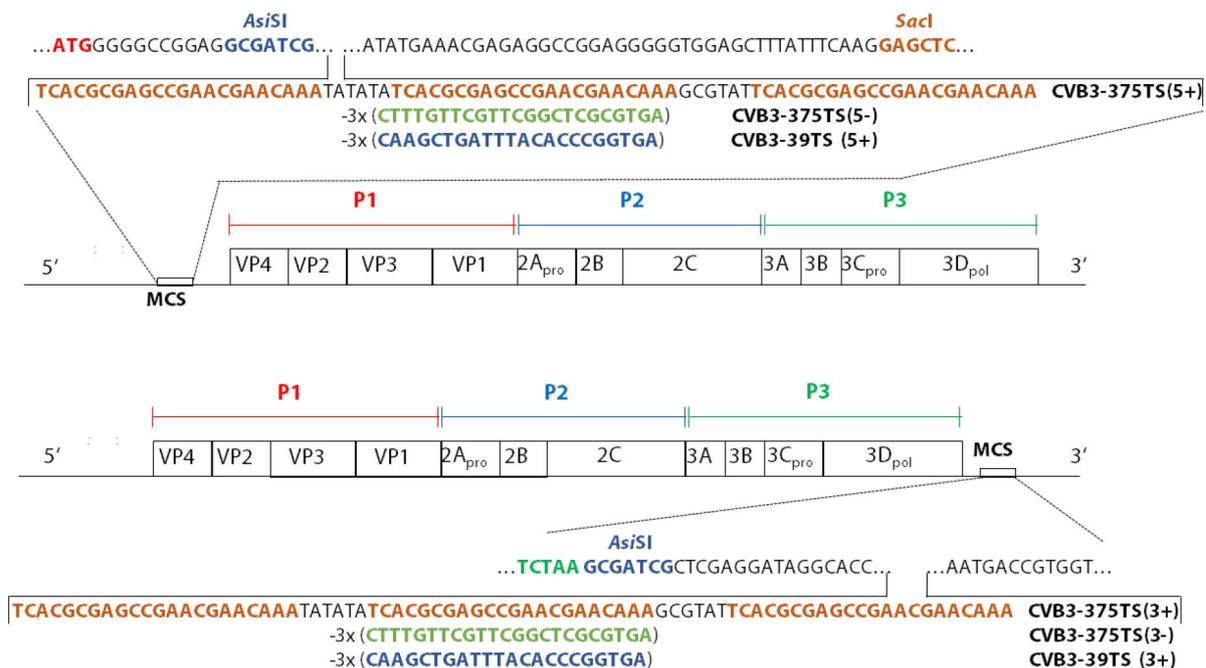


Abbildung 18: Insertionsstellen der miRNA-375TS und miRNA-39TS-Sequenzen im pMKS1-Plasmid.

Drei Kopien der miRNA-375TS Sequenz wurden über die Restriktionsschnittstellen *AsiSI* und *PmeI* in (+) bzw. (-) Orientierung in die entsprechende MCS am 5' -bzw. 3'-Ende des CVB3-Genoms im pMKS1-Plasmid inseriert. Drei Kopien der miRNA-39TS wurden in die MCS am 5' -bzw. 3'-Ende des pMKS1-Plasmids, jeweils in (+) Orientierung, inseriert. [MCS: multiple cloning site, IRES: internal ribosomal entry site.]

3.3 Generierung replikativer CVB3-Varianten

Um zu überprüfen, ob sich aus den generierten cDNA-Klonen, denen miRNA-TS in das Genom inseriert wurden, replikationsfähiges Virus bilden kann, wurden zunächst Transfektionsversuche mit dem GFP-exprimierenden Kontrollplasmid pSipo in HEK293T-Zellen durchgeführt. Für die Identifizierung eines geeigneten Transfektionsreagens wurden zunächst HEK293T-Zellen in verschiedenen Zellzahlen ausgesät und unter Verwendung von Lipofectamin2000, PeiMax 40K, und Pei (Kapitel 2.2.3.5) mit dem pSipo-Kontrollplasmid transfiziert. Es zeigte sich, dass sowohl mit Lipofectamin2000 als auch mit PeiMax 40K eine gute Transfektionseffizienz in HEK293T Zellen erzielt werden kann, wobei sich PeiMax 40K bei ähnlicher Effektivität als deutlich kostengünstiger darstellt (Ergebnisse nicht gezeigt).

Nach der Identifikation der geeigneten Transfektionsbedingungen (HEK293T, 1200000 Zellen je 6-Well, PeiMax 40K) konnte die Bildung von replikationsfähigem CVB3 aus den generierten cDNA-Klonen überprüft werden.

Üblicherweise wird cDNA mittels T7-RNA-Polymerase transkribiert und die darüber gewonnene, aufgereinigte RNA (virale RNA, vRNA) in die Zellen transfiziert. Die direkte Transfektion eines cDNA-CVB3-Klons führte aber ebenfalls zur Bildung von replikationsfähigem Virus.

Für den Vergleich zwischen der direkten Transfektion des cDNA-Klons und der vRNA wurden HEK293T-Zellen entweder mit dem CVB3-eGFP-cDNA-Klon oder mit vRNA dieses Klons transfiziert. Das im CVB3-eGFP inserierte GFP konnte 24 h nach Transfektion fluoreszenzmikroskopisch beobachtet werden. Bei den direkt mit cDNA transfizierten HEK293T-Zellen fluoreszierten etwa 10% der Zellen, bei denen, welche mit der vRNA transfiziert wurden, waren es ca. 80 % (**Abb. 19A-B**). Das deutet daraufhin, dass die Replikation vom CVB3-eGFP-vRNA-Klon höher als die des cDNA-Klon sein könnte. Um größere Virusmengen zu generieren, erfolgte die Transfektion (Kapitel 2.2.5.1) der cDNA-Klone auf HEK293T-Zellen für insgesamt 48 h bis eine deutliche Zellyse im Durchlichtmikroskop ersichtlich war. Anschließend wurden die einzelnen CVB3-Virusvarianten geerntet. Die Virustiter der über die direkte cDNA-Transfektion in HEK293T-Zellen generierten CVB3-Virusvarianten wurden anschließend mittels Plaque Assay auf HeLa-Zellen bestimmt (Durchführung siehe Kapitel 2.2.5.3). Dabei zeigte sich, dass alle generierten CVB3-Virusvarianten einen Titer zwischen $2,7 \times 10^7$ – $1,7 \times 10^8$ pfu/ml aufwiesen. Da vergleichbare Titer an replikationsfähigem CVB3 mit der direkten cDNA-Transfektionsmethode und mit der vRNA-Methode generiert werden konnten, wurden folgend alle CVB3-Varianten über die Transfektion der cDNA hergestellt. Diese Methode reduzierte den Zeitaufwand und die Kosten, da sowohl die Synthese und die Aufreinigung der vRNA entfielen.

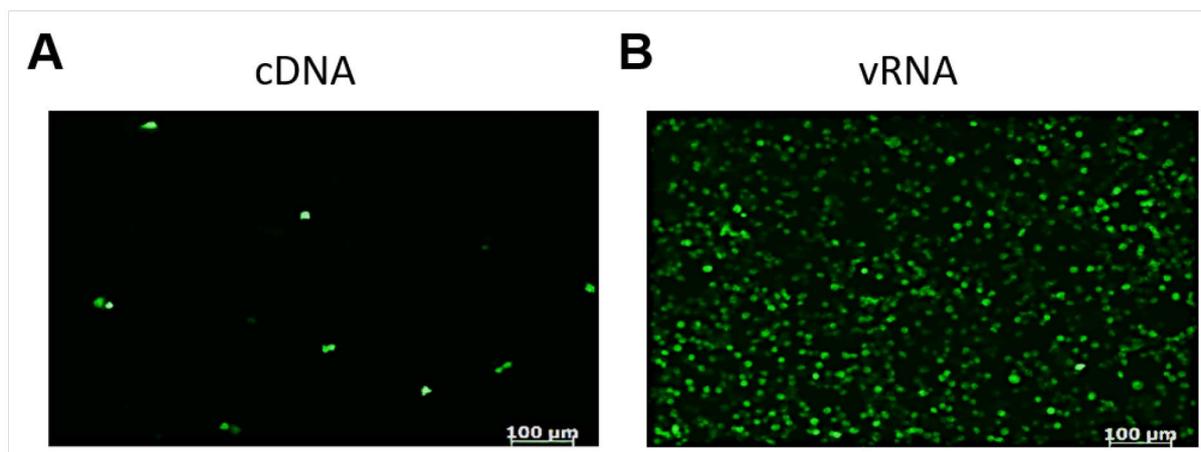


Abbildung 19: GFP-Expression nach Transfektion von CVB3- cDNA bzw. CVB3-rRNA.

HEK293T-Zellen wurden ausgesät ($1,1 \times 10^6$ Zellen je 6-Well) und bei einer Konfluenz von 70-90 % mit einem Transfektionsgemisch (400 μ l) aus 4 μ l PeiMax (2 μ g/ μ l) und (A) cDNA bzw. (B) vRNA des CVB3-eGFP transfiziert. Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung erfolgte nach 24 h. n=2. [cDNA: copy DNA, vRNA, virale RNA.]

3.4 Wachstumsanalysen und Zellviabilitätsassays der generierten CVB3-Varianten

Nach Bestimmung der jeweiligen Virustiter wurden Wachstumskurven der rekombinanten miRNA-TS enthaltenden CVB3-Varianten auf HeLa-Zellen generiert. Bei allen rekombinanten CVB3-Varianten mit Modifikationen am 3'-Ende war das Wachstum nach 24 h und 48 h mit durchschnittlich 10^7 pfu/ml ähnlich im Vergleich zur unmodifizierten CVB3-Kontrolle. Lediglich bei CVB3-39(3+) lag der Virustiter 8 h und 24 h nach Infektion um etwa eine \log_{10} -Stufe niedriger bei $5,8 \times 10^5$ bzw. 5×10^6 pfu/ml. Zum Zeitpunkt 48 h war er mit 5×10^7 pfu/ml hingegen ähnlich hoch wie bei den anderen Varianten mit $7,2 \times 10^7$ pfu/ml (**Abb. 20A**). Bei den rekombinanten CVB3-Varianten mit Modifikationen am 5'-Ende war der Virustiter bei dem unmodifizierten CVB3-Kontrollvirus am höchsten, gefolgt von den rekombinanten Varianten CVB3-39TS(5+) -und CVB3-375TS(5+). Der niedrigste Virustiter wurde für CVB3-375(5-) nachgewiesen und lag im Vergleich zum Kontrollvirus nach 24 h und 48 h mehr als eine \log_{10} -Stufe unter diesem (**Abb. 20B**).

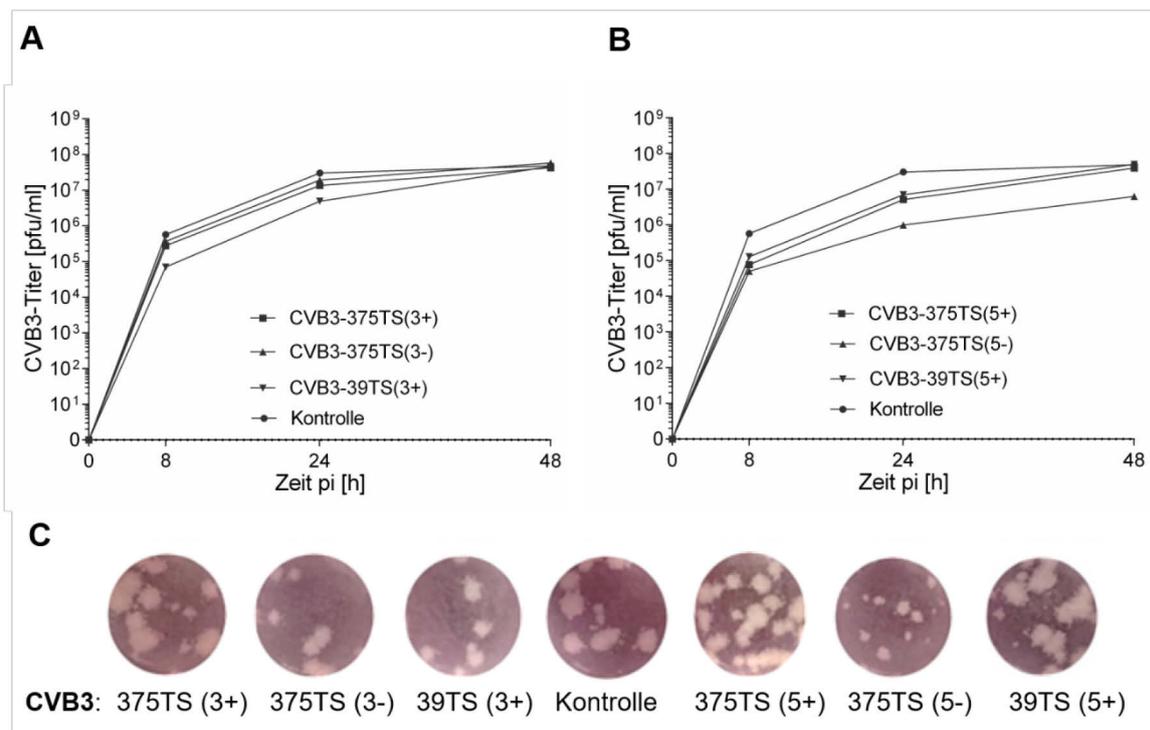


Abbildung 20: Wachstumskurven rekombinanter CVB3-375TS und CVB3-39TS-Varianten.

HeLa-Zellen wurden mit rekombinanten CVB3-Varianten mit (A) integrierten miRNA-TSs am 3'-Ende (CVB3-375(3+) -bzw. (3-), CVB3-39TS(3+) oder (B) rekombinanten CVB3-Varianten mit inserierten miRNA-TSs am 5'-Ende (CVB3-375(5+) -bzw. (5-), CVB3-39TS(5+)) jeweils mit einer MOI von 0,01 infiziert. Die viralen Titer der Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten (0, 8, 24 und 48 h nach Infektion) mittels eines Plaque Assays auf HeLa-Zellen bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM, n=2. (C) Zusätzlich wurde die Plaque-Morphologie der mit den verschiedenen CVB3-Varianten infizierten HeLa fotografisch dokumentiert. [pi: post infection]

Alle rekombinanten CVB3-Varianten bis auf CVB3-375TS(5-) bildeten etwa gleichgroße Plaques aus (**Abb. 20C**). Bei den CVB3-375TS(5-) waren die Plaques deutlich kleiner. Diese Beobachtung lässt

darauf schließen, dass die Insertion von miRNA-375TS in den CVB3-Minusstrang ((-)-Orientierung) in Zusammenhang mit der Insertion in das 5'-Ende des Protein kodierenden Bereichs des CVB3-Genoms vermutlich zu einer verringerten Fitness des Virus führt. Alle anderen Insertionen von miRNA-TS wurden hingegen ohne Veränderungen der Virustiter von CVB3 toleriert.

Nach Überprüfung der Replikation der rekombinanten CVB3-Varianten mit den verschiedenen miRNA-375TS -bzw. miRNA-39TS-Insertionen, wurde deren Zytotoxizität mit Hilfe eines Zellviabilitätsassays (XTT) überprüft. Jede der verwendeten rekombinanten CVB3-Varianten führte nach 72 stündiger Infektion zu einer vollständigen Lyse des Zellrasens. Die CVB3-375TS-Varianten mit der Modifikation am 3'-Ende führten bereits nach 48 h Infektion zu einer Lyse in einem Großteil der Zellen. Eine höhere Zellviabilität wurde bei dem unmodifizierten rCVB3.1 sowie bei CVB3-39TS beobachtet (**Abb. 21A**). Mit den rekombinanten CVB3-Varianten mit Modifikationen am 5'-Ende wurden ähnliche Resultate wie bei den 3'-Ende modifizierten CVB3-Varianten erzielt. Lediglich nach 48 stündiger Infektion mit CVB3-375TS(5-) wiesen die Zellen noch immer eine sehr hohe Viabilität auf, was auf die Insertion der miRNA-375TSs in der (-)-Orientierung zurückzuführen ist (**Abb. 21B**).

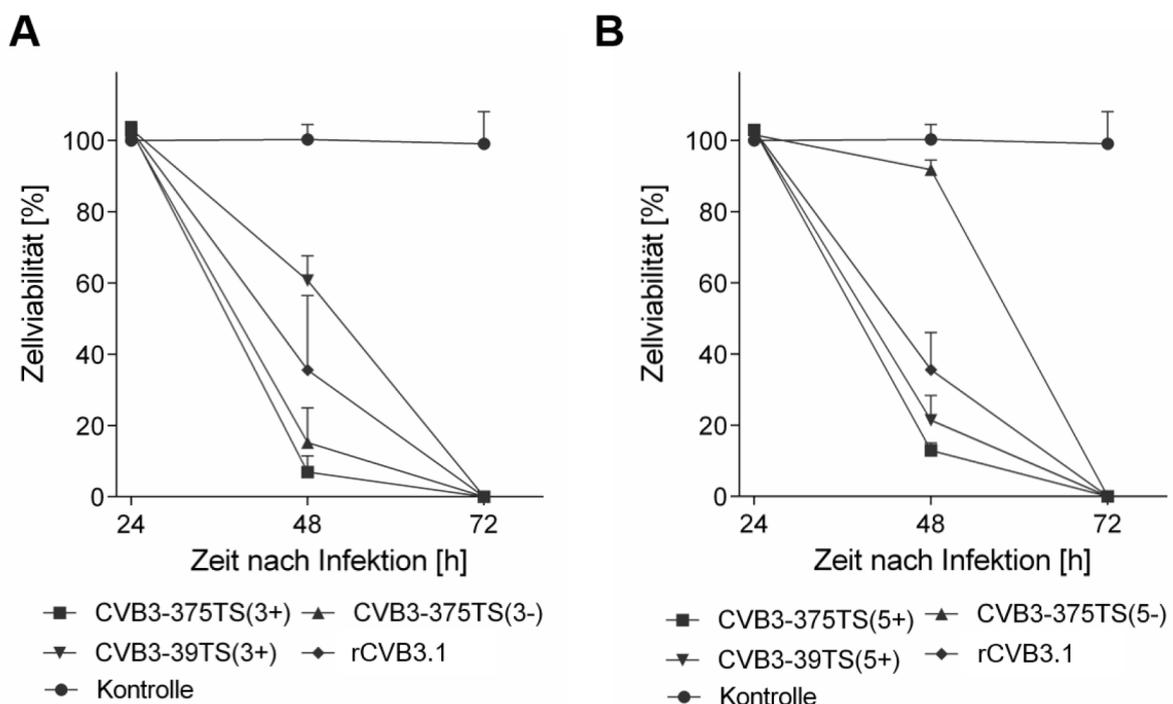


Abbildung 21: Zellviabilitätsassays (XTT) der rekombinanten CVB-375TS bzw. CVB3-39TS-Varianten.

HeLa-Zellen wurden mit dem Ursprungsvirus rCVB3.1 bzw. (A) den rekombinanten CVB3-Varianten mit integrierten miRNA-TSs am 3'-Ende (CVB3-375(3+) -bzw. (3-), CVB3-39TS(3+)) oder (B) den rekombinanten CVB3-Varianten mit inserierten miRNA-TSs am 5'-Ende (CVB3-375(5+) -bzw. (5-), CVB3-39TS(5+)) jeweils mit einer MOI von 0,01 infiziert. Die Messung der Zellviabilität erfolgte 24, 48 h und 72 h nach Infektion. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM, n=3.

Bei allen rekombinanten CVB3-Varianten wurde ein ähnlicher Wachstumsverlauf beobachtet. Verglichen mit den Modifikationen am 3'-Ende verursachten die Modifikationen am 5'-Ende eine

Verringerung der Replikation um etwa eine \log_{10} -Stufe (**Abb. 20B**). Aus diesem Grund wurden für die *in vivo* Versuche CVB3-Varianten mit Modifikationen am 3'-Ende ausgewählt.

3.5 Reporterassay mit pCMV-MIR-375 in HEK293T-Zellen

Bevor die Inhibierbarkeit der miRNA-375TS durch miRNA-375 im Rahmen der Untersuchungen der miRNA-375TS enthaltenden CVB3 analysiert wurde, wurden initiale Untersuchungen mit einem Dual Luciferase Reporterassay zur Überprüfung der Funktionalität der miRNA-375TS durchgeführt.

Dafür wurden HEK293T-Zellen für 24 h mit dem miRNA-375 Expressionsplasmid (pCMV-MIR-375) und dem miRNA-375TS enthaltenden Indikatorplasmid (psiCHECK2-375TS) kotransfiziert. Als Kontrolle dienten die Plasmide pCMV-MIR-375 und psiCHECK2-HexonTS, welches keine miRNA-375TS enthält.

Nach der Kotransfektion von HEK293T-Zellen mit dem pCMV-MIR-375 -und psiCHECK2-375TS-Plasmid kam es im Vergleich zur Kontrollprobe zur Verringerung der Luciferaseaktivität um >92 %, was zeigt, dass die miRNA-375TS durch die miRNA-375 erkannt wurde und ein Gensilencing eintrat (**Abb. 22**). Dies zeigt, dass die miRNA-375TSs funktional sind.

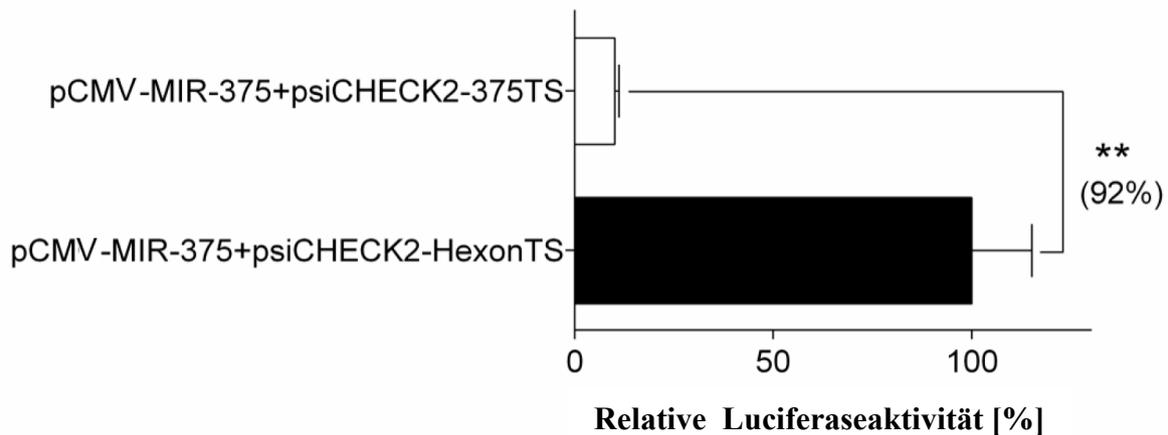


Abbildung 22: Überprüfung der Funktionalität der inserierten miRNA-375TS mittels Dual-Luciferase-Reporterassay.

HEK293T-Zellen wurden für 24 h mit den beiden Plasmiden pCMV-MIR-375 und psiCHECK2-375TS kotransfiziert und mittels Dual Luciferase Reporterassay auf die relative Luciferaseaktivität getestet. Als Kontrolle diente die unter den gleichen Bedingungen durchgeführte Kotransfektion der beiden Plasmide pCMV-MIR-375 und psiCHECK2-HexonTS. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM, ** $p \leq 0,01$, $n=3$.

3.6 Inhibitionsassays mit pCMV-MIR-375 in HEK293T-Zellen

Nachdem die Funktionalität der miRNA-TS nachgewiesen wurde, konnte die Inhibition der modifizierten CVB3-Varianten durch die miRNA-375 überprüft werden. Dazu wurden HEK293T-Zellen mit dem Plasmid pCMV-MIR-375 transfiziert und nach 24 h mit der jeweiligen rekombinanten CVB3-Variante infiziert. Als Kontrolle wurden HEK293T-Zellen mit dem Plasmid pCMV-MIR-216a, welches die miRNA-216a exprimiert, transfiziert und entsprechend nach 24 h mit der jeweiligen CVB3-Variante

infiziert. CVB3-375TS(3+) wurde im Vergleich zur Kontrollprobe (CVB3-375TS(3+) und pCMV-MIR-216a) mit einer Effizienz von 96 % inhibiert. Bei der rekombinanten CVB3-375TS(3-)-Variante konnte keine Inhibierung der Virusreplikation detektiert werden (**Abb. 23A**).

Für CVB3-375TS(5+) konnte eine Inhibierungseffizienz von 85 % festgestellt werden. Auch wenn der Virustiter der CVB3-375TS(5-)-Variante sowohl bei den mit dem pCMV-MIR-375-Plasmid transfizierten Proben als auch bei den Kontrollproben niedriger als bei den entsprechenden mit CVB3-39TS infizierten Proben lag, konnte keine signifikante Inhibierung des Virustiters zur entsprechenden miRNA-Kontrollprobe nachgewiesen werden (**Abb. 23B**). Weder bei CVB3-39TS(3+) bzw. CVB3-39TS(5+) kam es zu einer miRNA-375 vermittelten Verringerung der Virustiter.

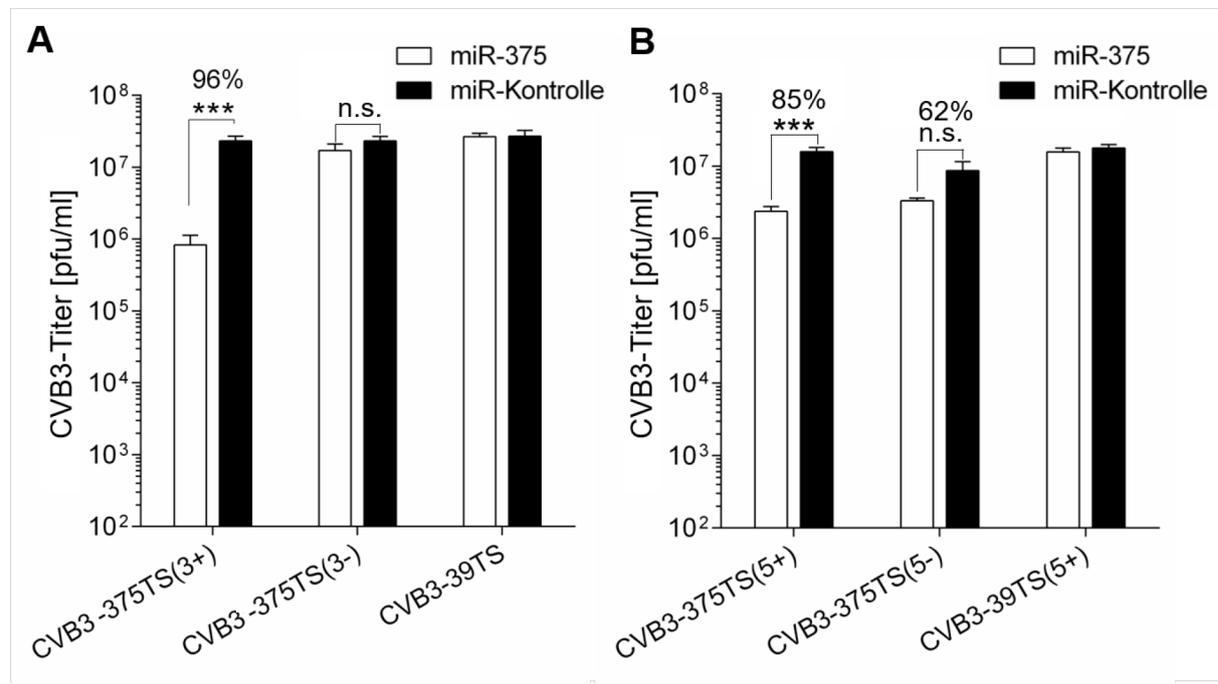


Abbildung 23: Inhibierung rekombinanter CVB3 mit 3'- bzw. 5'-inserteren miRNA-375TS durch die miRNA-375.

HEK293T-Zellen wurden mit pCMV-MIR-375 bzw. mit pCMV-MIR-216a (Negativkontrolle) transfiziert und 24 h später entweder mit (A) CVB3-375TS(3+), CVB3-375TS(3-) oder CVB3-39TS(3+) bzw. mit (B) CVB3-375TS(5+), CVB3-375TS(5-) oder CVB3-39TS(5+) mit einer MOI von 0,1 infiziert. Nach 24-stündiger Infektion wurden die virushaltigen Überstände genommen und die jeweiligen Virustiter mittels Plaque Assay auf HeLa-Zellen bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM, *** $p \leq 0,001$, n.s. = nicht signifikant, n=3.

3.7 Inhibierungsassays mit miRNA-375-Mimics in HeLa-Zellen

Die meisten der bisher durchgeführten CVB3-Infektionsversuche wurden in HeLa-Zellen durchgeführt. Für die Transfektion großer Plasmide, wie die des rund 6300 kb großen Überexpressionsplasmid der miRNA-375 (pCMV-MIR-375), erweisen sie sich jedoch als ungeeignet. Unter Verwendung der deutlich kleineren miRNA-Mimics (21 Nukleotide) kann eine effiziente Transfektion der HeLa-Zellen erzielt werden, so dass die die Inhibierung der Replikation der generierten CVB3-Varianten in HeLa-Zellen mit miRNA-375-Mimics wiederholt wurde. Dafür wurden HeLa-Zellen zunächst für 4 h mit miRNA-375-

Mimics transfiziert und anschließend für 24 h mit der jeweiligen rekombinanten CVB3-Variante infiziert. Als Negativkontrolle wurden HeLa-Zellen mit einer kommerziellen siRNA transfiziert und entsprechend für 24 h mit der jeweiligen CVB3-Variante infiziert. CVB3-375TS(3+) wurde im Vergleich zur siRNA-Kontrollprobe mit einer Effizienz von 93 % durch die Transfektion mit den miRNA-375-Mimics inhibiert. Im Gegensatz zur Transfektion der HEK293T-Zellen mit pCMV-MIR-375 (**Abb. 23A**) konnte in den HeLa-Zellen unter Einsatz von miRNA-375-Mimics auch für die CVB3-375TS(3-)-Variante eine 99 % ige Inhibierung des Titers festgestellt werden (**Abb. 24A**). Für CVB3-375TS(5+) konnte eine Inhibierungseffizienz von 88 % festgestellt werden (**Abb. 24B**), welche vergleichbar mit der Inhibierungseffizienz durch die miRNA-375 auf HEK293T-Zellen war (**Abb. 23B**). Durch die miRNA-375-Mimics wurde auf den HeLa-Zellen der Virustiter der CVB3-375TS(5-)-Variante um 91% inhibiert (**Abb. 24B**). Die Ergebnisse zeigen, dass auf HeLa-Zellen durch den Einsatz von miRNA-375-Mimics eine effizientere Inhibition von CVB3-375TS(3-) und CVB3-375TS(5-) erreicht werden konnte als auf den HEK293T-Zellen durch das Überexpressionsplasmid pCMV-MIR-375. Wie erwartet kam es auch hier zu keiner miRNA-375 vermittelten Inhibierung der CVB3-39TS(3+) bzw. CVB3-39TS(5+)-Varianten.

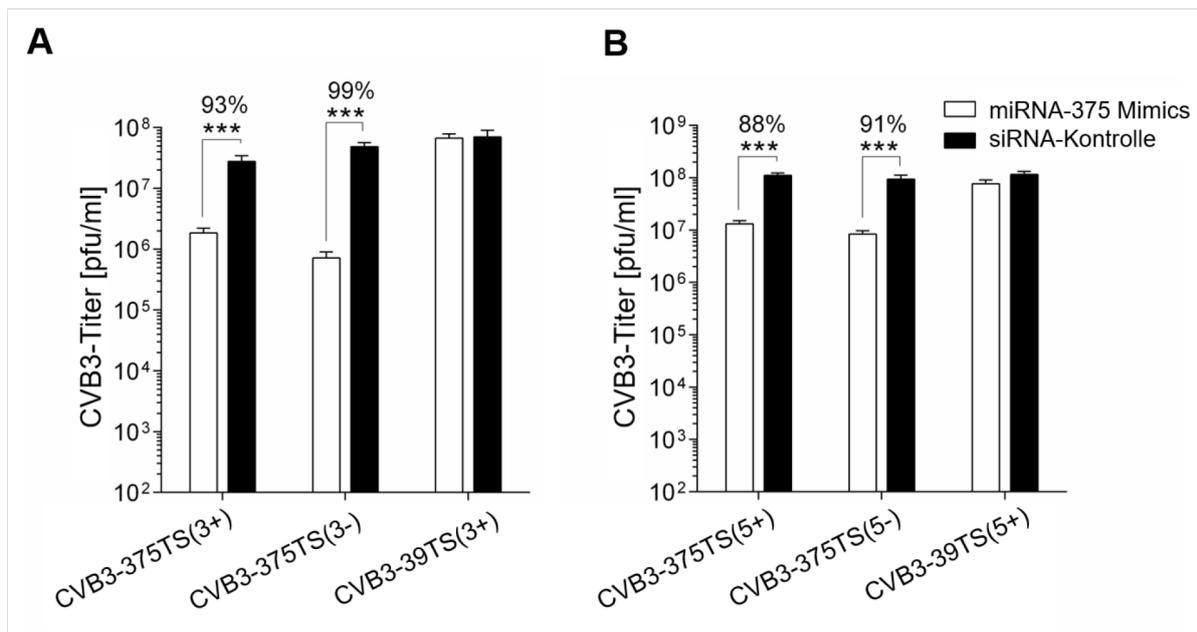


Abbildung 24: Inhibierung rekombinanter CVB3 mit 3'- bzw. 5'- inserierten miRNA-375TS durch miRNA-375-Mimics.

HeLa-Zellen wurden mit miRNA-375-Mimics bzw. mit einer *scrambled* siRNA (Negativkontrolle) transfiziert und nach 4 h entweder mit (A) CVB3-375TS(3+), CVB3-375TS(3-) oder CVB3-39TS(3+) bzw. mit (B) CVB3-375TS(5+), CVB3-375TS(5-), oder CVB3-39TS(5+) mit einer MOI von 0,1 infiziert. Nach 24-stündiger Infektion wurden die virushaltigen Überstände genommen und die jeweiligen Virustiter mittels Plaque Assay auf HeLa-Zellen bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM, *** $p \leq 0,001$, $n=3$.

3.8 Endogene miRNA-375-Expression verschiedener Pankreaszelllinien

Da in den *in vivo* Versuchen die Replikation von CVB3 im Pankreas inhibiert werden soll, wurden zunächst verschiedene pankreatische Zelllinien *in vitro* bezüglich ihrer Expression der miRNA-375

untersucht. Die Identifikation von endogen die miRNA-375 exprimierenden Zelllinien ermöglicht es zu überprüfen, ob die rekombinanten CVB3-Varianten auch durch physiologische Mengen an miRNA-375, welche geringer als die nach Transfektion von Überexpressionsplasmiden sind, inhibiert werden können. Dafür wurden die endogenen miRNA-Expressionslevel im Gesamtpankreasgewebe von Balb/C-Mäusen, in exokrinen (AR42J) bzw. endokrinen (INS-1E) Pankreaszellen der Ratte sowie in humanen Pankreaszellen (EndoC- β H1) mittels qRT-PCR unter Verwendung miRNA-spezifischer *stem-loop* Primer bestimmt (Kapitel 2.2.2.12). Diese Expressionslevel wurden mit denen verglichen, welche mit pCMV-MIR-375 transfizierte HEK293T-Zellen nach 24 bzw. 48-stündiger Transfektion aufwiesen.

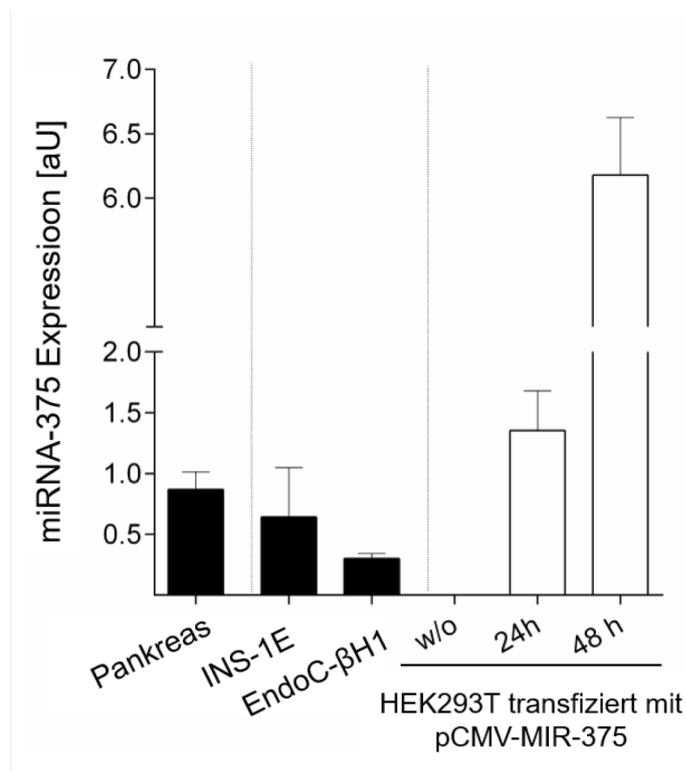


Abbildung 25: miRNA-375-Expression verschiedener Zelllinien.

Endogene miRNA-375 Expressionslevel des Gesamtpankreas von Balb/C-Mäusen, endokrinen Pankreaszellen von Ratten (INS-1E) und der humanen Pankreaszellen (EndoC- β H1) wurden mittels qRT-PCR unter Verwendung miRNA-spezifischer *stem-loop* Primer bestimmt. HEK293T-Zellen wurden mit dem miRNA-375 Expressionsplasmid pCMV-MIR-375 transfiziert und die Expressionslevel der miRNA-375 zu den entsprechenden Zeitpunkten entsprechend quantifiziert. Als Kontrolle wurden nichttransfizierte HEK293T-Zellen verwendet. Alle Werte wurden auf die Expression der snRNA-U6 relativiert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM. n=3. [aU: Array Units, w/o: without-untransfiziert]

Im Pankreas der Balb/C-Mäuse wurde die miRNA-375 am stärksten exprimiert. Die Expression der miRNA-375 in den Zelllinien INS-1E und EndoC- β H1 wies ein ähnliches Niveau auf. Die nicht transfizierten HEK293T-Zellen (w/o) zeigten keine nachweisbare Expression der miRNA-375, wohingegen 24 h nach Transfektion mit dem pCMV-MIR-375-Plasmid eine etwa zweifach und nach 48 h eine siebenfach höhere Expression detektierbar war (**Abb. 25**).

3.9 Inhibierungsassays mit endogen miRNA-375 exprimierenden Zellen

Nachdem die Inhibierungsassays in HEK293T -bzw. HeLa-Zellen, welche zuvor mit dem pCMV-MIR-375-Plasmid bzw. den miRNA-375-Mimics transfiziert wurden, zeigten, dass rekombinante CVB3-Varianten mit miRNA-375TS(+) in den 3' - bzw. 5'-Enden inhibiert werden, wurden die Inhibierungsversuche mit endogen miRNA-375 exprimierenden Zelllinien wiederholt.

Zunächst wurden INS-1E und EndoC- β H1-Zellen mit CVB3-eGFP mit einer MOI von 0; 1,5; 3 oder 4,5 infiziert, um deren Suszeptibilität für die CVB3-Infektion zu prüfen. Anschließend wurde das Ergebnis der Infektion durch den Nachweis des CVB3-Proteins VP1 immunhistochemisch bzw. im Western Blot analysiert. Während in EndoC- β H1 Zellen bei einer CVB3-eGFP MOI von 4,5 VP1 in der Immunfluoreszenzfärbung nachweisbar war, konnte in INS-1E-Zellen bei der gleichen MOI kein VP1 detektiert werden (**Abb. 26A**). Die in **Abbildung 26A** ersichtliche immunhistochemische Färbung zeigt exemplarisch die Ergebnisse der Infektion mit einer CVB3-eGFP MOI von 4,5, bei der VP1 im roten Fluoreszenzkanal, die Kernfärbung mit DAPI im blauen Fluoreszenzkanal und die der CVB3-eGFP Eigenfluoreszenz im grünen Kanal dargestellt wurden.

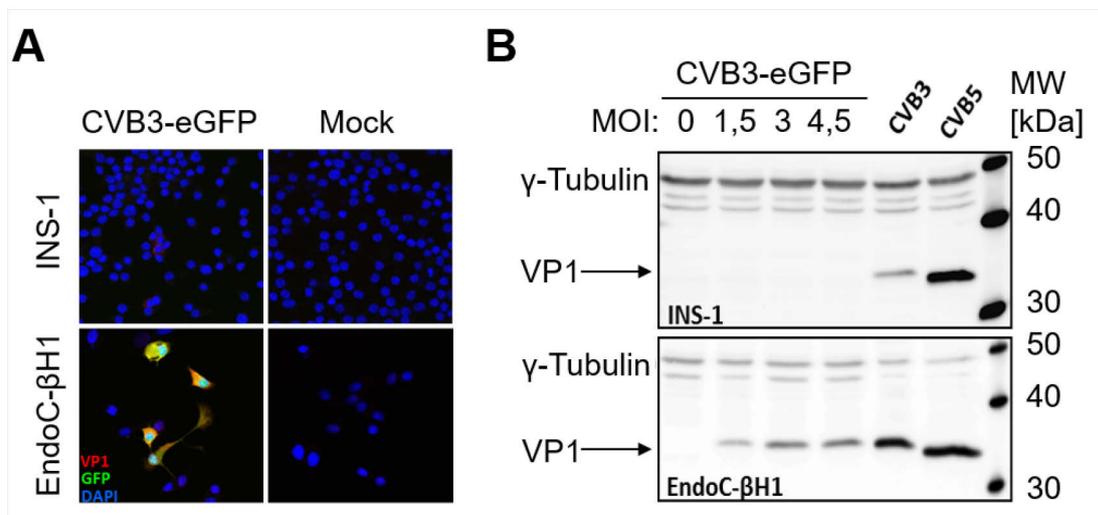


Abbildung 26: CVB3-eGFP induziert die Expression des VP1-Proteins in EndoC- β H1-Zellen.

(A) Immunhistochemische Analyse von mit INS-1E und EndoC- β H1-Zellen, 24 h infiziert mit CVB3-eGFP, MOI 4,5. Die Zellen wurden fixiert, gegen virales VP1 (roter Kanal) gefärbt und fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Die Kernmorphologie wurde durch eine DAPI-Färbung (blauer Kanal) visualisiert, die GFP Eigenfluoreszenz ist im grünen Kanal dargestellt. (B) Das proteinhaltige Lysat von INS-1E und EndoC- β H1-Zellen, 24 h infiziert mit CVB3-eGFP, MOI 0, 1,5, 3 und 4,5 bzw. CVB3 (M16572) oder CVB5 (Faulkner) wurde im Western Blot auf die Expression viralen VP1 und γ -Tubulin (Beladungskontrolle) untersucht. [VP1: Virus-Kapsidprotein]

Die Ergebnisse des Western Blots bestätigten die in der immunhistochemischen Färbung beobachtete schlechte Suszeptibilität der Zelllinie INS-1E für CVB3-eGFP (**Abb. 26B**). Entsprechend der immunhistochemischen Analyse konnte bei den EndoC- β H1-Zellen, ab einer CVB3-eGFP MOI von 1,5, VP1-Protein mit einer Größe von 33 kDa nachgewiesen werden. Mit einem Anstieg der CVB3-eGFP Dosis war in dieser Zelllinie eine Zunahme des VP1-Proteins erkennbar (**Abb. 26B**). Alle Zellen ließen sich mit CVB3 (M16572) und CVB5 (Faulkner) infizieren, die beide auf pankreatische Zellen mittels wiederholter Passagierung adaptiert wurden und somit eine starke Infektion der Zelllinien möglich machten. Als Beladungskontrolle wurde das 55 kDa schwere γ -Tubulin verwendet. Bis auf EndoC- β H1 zeigte keine der getesteten pankreatischen Zelllinien eine gute Suszeptibilität während der Infektion mit geringen Virusmengen, daher wurde der nachfolgende Inhibierungsassay mit den rekombinanten CVB3 auf EndoC- β H1-Zellen durchgeführt.

Die EndoC- β H1-Zellen wurden hierzu mit CVB3-375TS(3+) bzw. als Kontrolle mit CVB3-39TS(3+) für 24 h mit einer jeweiligen MOI von 1,5 infiziert und die viralen Titer mittels Plaque Assay bestimmt. Zusätzlich wurde die Inhibierung im Western Blot anhand der Bildung der viralen Proteine VP1 und eIF4G bzw. dessen prozessierter Form, cleaved eIF4G, überprüft. Der Plaque-Assay zeigte, dass die endogene miRNA-375 der EndoC- β H1-Zellen die CVB3-375TS(3+) Titer um 99,98 % verringerte, was einer 8196-fachen Inhibierung entspricht (**Abb. 27A**).

Der Western Blot bestätigte die Inhibierung von CVB3-375TS(3+) in den infizierten EndoC- β H1-Zellen. Im Vergleich zur Infektion mit CVB3-39TS(3+) konnte in den mit CVB3-375TS(3+) infizierten Proben kein virales VP1-Protein detektiert werden. Der für die Initiation der Translation zuständige eukaryotische Translationsinitiationsfaktor 4G (eIF4G), mit einer Größe von 220 kDa, konnte nur in den nicht infizierten Proben (Mock) bzw. CVB3-375TS(3+) infizierten Proben nachgewiesen werden. Bei den mit CVB3-39TS(3+) infizierten Proben war dieses abgebaut, so dass seine prozessierte Form cleaved eIF4G nachweisbar war, was wiederum auf die Translation der viralen Proteine hindeutet (**Abb. 27B**).

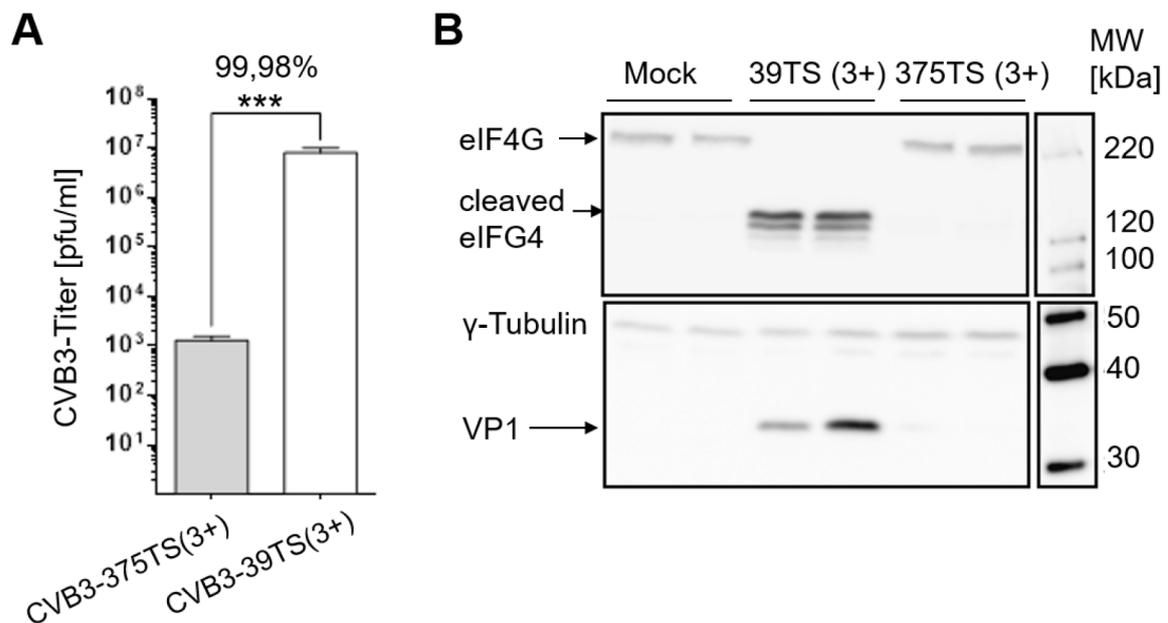


Abbildung 27: Inhibierungsassays mit CVB3-375TS(3+) und CVB3-39TS(3+) in Endo β H1-Zellen.

EndoC- β H1-Zellen wurden für 24 h mit CVB3-375TS(3+) bzw. -39TS(3+) infiziert (MOI: 1,5). (**A**) Die viralen Titer im Zellkulturüberstand wurden mittels Plaque Assay bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM, *** $p \leq 0,001$, $n=2$ (**B**) Western Blot zum Nachweis viralen VP1-Proteins, eIF4G, cleaved eIF4G und γ -Tubulin (Beladungskontrolle). Nicht infizierte Zellen (Mock) dienen als Negativkontrolle. (VP1: Virus-Kapsidprotein 1; eIF4G: eukaryotischer Initiationsfaktor der Translation 4).

3.10 Replikation der rekombinanten CVB3-Varianten in primären embryonalen Kardiomyozyten

Die Optimierung des Maus-Myokarditismodells beruht darauf, dass die mittels miRNA-375TS modifizierten rekombinanten CVB3-Varianten im Pankreas über den RNAi-Mechanismus eliminiert werden, ihre Replikation im Herzen jedoch von dieser Modifikation nicht beeinträchtigt wird. Um dies

in vitro zu überprüfen, wurden primäre embryonale Mauskardiomyozyten für 24 h mit nicht modifiziertem rCVB3.1 bzw. mit den rekombinanten Varianten CVB3-375TS(3+) bzw. CVB3-39TS(3+) jeweils mit einer MOI von 1 infiziert. Die mittels Plaque Assay bestimmten Virustiter zeigten, dass die neonatalen Mauskardiomyozyten suszeptibel für eine CVB3-Infektion sind und keine der beiden eingesetzten rekombinanten CVB3-Varianten inhibiert wurde. Die ermittelten Virustiter lagen durchschnittlich bei 1×10^7 pfu/ml (**Abb. 28**). Die primären embryonalen Mauskardiomyozyten wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Anje Behling (Charité – Universitätsmedizin Berlin, Lab Cardiac infection biology and immunology) zur Verfügung gestellt.

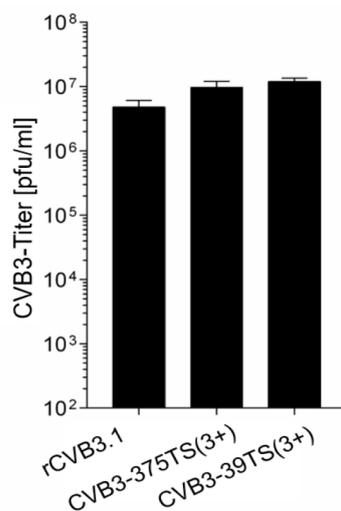


Abbildung 28: Replikation von rCVB3.1, CVB3-375TS(3+) sowie CVB3-39TS(3+) in primären embryonalen Kardiomyozyten.

Primäre embryonale Mauskardiomyozyten wurden für 24 h entweder mit rCVB3.1, CVB3-375TS(3+) oder CVB3-39TS(3+) mit einer MOI von 1 infiziert. Dargestellt sind Mittelwert \pm SEM, die statistische Auswertung erbrachte keine signifikanten Unterschiede, $n=2$.

3.11 Vergleich des Verlaufs der H3N und rCVB3.1 Infektion *in vivo*

Die *in vitro* Versuche zeigten, dass die rekombinante Mutante CVB3-375TS(3+) in Pankreaszellen, welche endogen miRNA-375 exprimieren, hocheffizient inhibiert wird, wohingegen die rekombinante CVB3-Mutante CVB3-39TS(3+) bzw. rCVB3.1 (Wildtyp ohne TS) nicht supprimiert wurden. In den primären embryonalen Mauskardiomyozyten konnte keine Suppression der rekombinanten Varianten CVB3-375TS(3+), CVB3-39TS(3+) bzw. rCVB3.1 nachgewiesen werden.

Für die Etablierung des murinen *in vivo* Modells der pankreasattenuierten CVB3-Infektion wurde zunächst ein weiterer CVB3-Stamm, welcher aus dem pBKCMV-H3-Plasmid generiert wurde, hergestellt und nachfolgend als H3 bezeichnet. Um zu überprüfen ob rCVB3.1 und H3 eine nachweisbare Inflammation im Herzen bzw. im Pankreas induzieren können, wurden sechs Wochen alte, weibliche NMRI-Mäuse mit rCVB3.1 (1×10^6 pfu) bzw. H3 (1×10^5 pfu) infiziert. Die mit H3 infizierten Tiere zeigten eine für das CVB3-Myokarditismodell typische Gewichtsreduktion von ca. 15-20 % innerhalb des siebentägigen Untersuchungszeitraums (**Abb. 29A**). Die viralen Titer im Herzen wurden mittels Plaque Assay, die im Pankreas mittels qRT-PCR, bestimmt. Im Herzen lag der H3-Titer sieben \log_{10} -Stufen höher als der von rCVB3.1 (**Abb. 29B**). Auch im Pankreas lag die CVB3-Kopienzahl der H3-Proben zwei \log_{10} -Stufen höher als die der rCVB3.1-Proben (**Abb. 29C**). Das Pankreas aller mit H3 infizierten Tiere war nahezu komplett zerstört und die entsprechenden Inflammationsscores des Pankreas

lagen durchgängig bei einem Wert von 3. Bei den mit rCVB3.1 infizierten Tieren wiesen drei Mäuse einen Score von 2 auf, drei Mäuse einen Score von 1 und eine Maus einen Score von 0 (Abb. 29D). Auch die kardiale Inflammation der mit H3 infizierten Tiere war mit einem gemittelten Score von 1,7 signifikant höher als die Inflammation im Herzen der mit CVB3.1 infizierten Tiere, die einen durchschnittlichen Score von 0,3 aufzeigten (Abb. 29E). Im Gegensatz zu rCVB3.1 kann CVB3-H3 in Mäusen eine Myokarditis induzieren und wurde in allen nachfolgenden *in vivo* Untersuchungen eingesetzt.

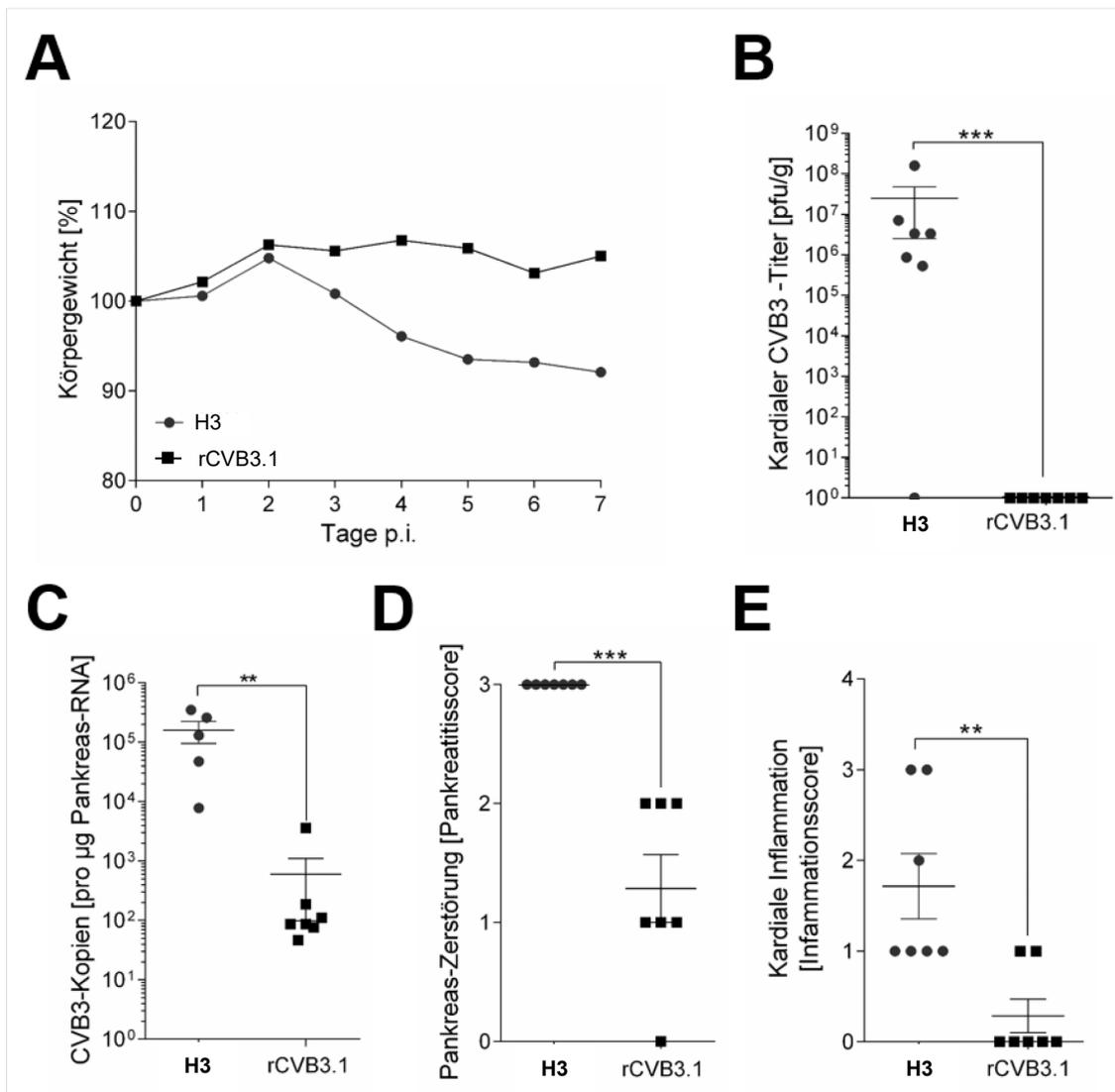


Abbildung 29: Vergleich der Infektion von rCVB3.1 und H3 in NMRI-Mäusen.

NMRI-Mäuse wurden i.p. mit rCVB3.1 (1×10^6 pfu) oder mit H3 (1×10^5 pfu) für sieben Tage infiziert. (A) Der Gewichtsverlauf wurde im Verlauf der sieben-tägigen Infektionszeit täglich überprüft. (B) Die kardialen Titer von rCVB3.1 und H3N wurden mittels Plaque Assay auf HeLa-Zellen bestimmt, jede Probe wurde als technisches Triplikat analysiert. (C) Aus den Pankreasgeweben wurde virale RNA isoliert und mittels qPCR die Menge der Viruskopien ermittelt, jede Probe wurde als technisches Triplikat gemessen. (D; E) Pankreas- und Herzgewebe der infizierten NMRI-Mäuse wurden histologisch aufgearbeitet und bezüglich der Zerstörung bzw. Inflammation beurteilt. (D) Pankreasdestruktion anhand einer Bewertungsskala von 0 (keine Gewebeveränderung) bis 3 (komplette Organzerstörung). (E) Kardiale Inflammation bewertet anhand eines Inflammationscores zwischen 0-4 (0=keine Inflammation, 4= sehr starke Inflammation, Nekrose). Dargestellt sind jeweils Mittelwerte \pm SEM. (B-E) Jedes Symbol zeigt den Wert eines Versuchstiers; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$, $n=7$ Tiere pro Gruppe. [p.i.: *post infection*]

3.12 Wachstumsanalyse und Inhibierungsassays mit rekombinantem H3N

Aufgrund des in Kapitel 3.11 erzielten Befundes wurde das CVB3-H3-Genom aus dem pBKCMV-H3-Plasmid in das pMKS1-Plasmid kloniert. Das entstandene Plasmid erhielt die Bezeichnung pMKS1-H3N. Im Anschluss wurden drei Kopien der miRNA-375TS bzw. der miRNA-39TS in positiver Orientierung aus dem pMKS1-CVB3-375TS(+) bzw. aus dem pMKS1-CVB3-39TS(+)-Plasmid herausgeschnitten und in das pMKS1-H3N-Plasmid in das 3'-Ende des CVB3-H3-Genoms inseriert. Die dafür notwendigen Klonierungsschritte erfolgten entsprechend der in Kapitel 2.2.2.8.6 beschriebenen Vorgehensweise. Anschließend wurde aus den cDNA-Klonen, wie in Kapitel 2.2.5.1 beschrieben, mittels Transfektion in HEK293T-Zellen replikationsfähiges Vollvirus generiert. Die Bezeichnung der neugenerierten Viren gestaltet sich wie folgt: H3N-375TS, H3N-39TS und H3N (Wildtyp ohne TS). Alle nachfolgenden *in vivo* Experimente wurden mit diesen Viren durchgeführt.

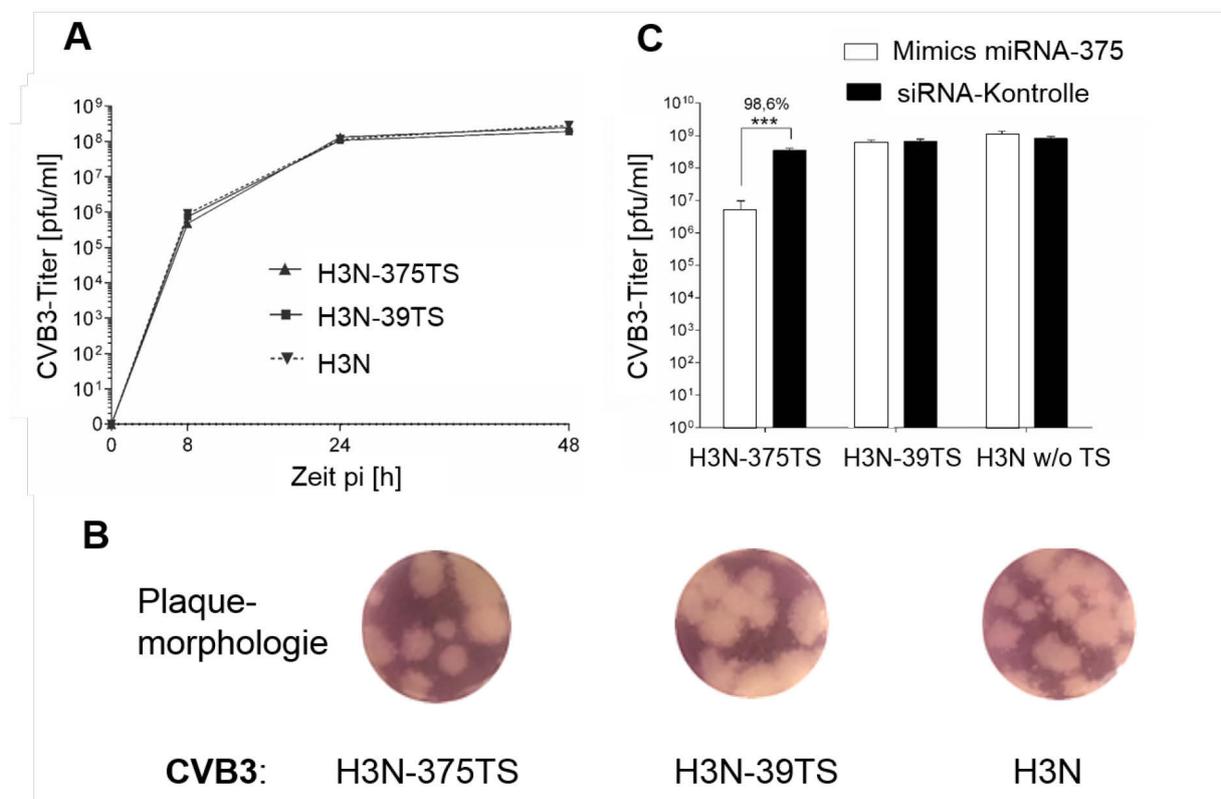


Abbildung 30: Wachstumskurvenanalysen und Inhibierungsassays von H3N-375TS, H3N-39TS bzw. H3N nach Applikation miRNA-375-Mimics.

(A) Wachstumsanalyse: HeLa-Zellen wurden mit H3N-375TS, -39TS bzw. H3N (MOI 0,01) infiziert. Die viralen Titer der Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten (0, 8, 24 und 48 h nach Infektion mittels eines Plaque Assays auf HeLa-Zellen bestimmt, n=2. (B) Inhibierungsassay: HeLa-Zellen wurden mit miRNA-375-Mimics bzw. *scrambled* siRNA (Negativkontrolle) transfiziert, nach 4 h wurden diese für 24 h mit den H3N-375TS, -39TS bzw. H3N (MOI 0,1) infiziert. Der CVB3-Titer im Zellkulturüberstand wurde mittels Plaque-Assay auf HeLa-Zellen bestimmt. n=3. (C) Zusätzlich wurde die Plaque-Morphologie der mit den verschiedenen CVB3-Varianten infizierten HeLa-Zellen photographisch dokumentiert. (A und B) Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM, $p \leq 0,001$. [pi: *post infection*].

Die neuklonierten, rekombinanten H3N-Varianten wurden bezüglich ihrer Inhibierbarkeit in HeLa-Zellen überprüft. Dafür wurde zunächst das Replikationsverhalten der neugenerierten Viren auf HeLa-

Zellen binnen 48 h nach Infektion (MOI 0,01) betrachtet. In den auf HeLa-Zellen generierten Wachstumskurven wiesen alle rekombinanten CVB3-H3N-Varianten sowie der Wildtyp H3N ein ähnliches Wachstum auf (**Abb. 30A**). Wie erwartet, entsprach die Plaquemorphologie der CVB3-H3N-Varianten der von H3N (**Abb. 30B**). Für den Inhibierungsassay wurden die Zellen transient mit miRNA-375-Mimics transfiziert und nach 4 h mit einer MOI von 0,1 der entsprechenden CVB3-Variante infiziert. Auch hier zeigte sich, dass durch die inserierte miRNA-375TS rekombinantes H3N-375TS mit einer Effizienz von 98,6 % inhibiert werden kann (**Abb. 30C**). Die Inhibierungseffizienz fiel dabei um 5,6 % höher aus als die, welche durch Infektion mit der CVB3-375TS(3+)-Variante infolge der Transfektion mit miRNA-375-Mimics erreicht wurde (vgl. **Abb. 23A**).

3.13 Verlauf der H3N-375TS Infektion in NMRI-Mäusen nach intraperitonealer Applikation

Um zu überprüfen, inwieweit H3N-375TS *in vivo* pankreasattenuiert und kardiotrop ist, wurden NMRI-Mäuse i.p. mit H3N-375TS, H3N-39TS bzw. H3N jeweils mit einer Virusdosis von 1×10^5 pfu infiziert. Den Tieren der Kontrollgruppe (sham) wurde eine 0,9 %-ge NaCl-Lösung injiziert.

Innerhalb des siebentägigen Infektionsverlaufes wiesen Mäuse, die mit rekombinatem H3N-375TS infiziert bzw. solche denen eine 0,9 % -ge NaCl-Lösung verabreicht wurde, keine Gewichtsreduktion auf. Hingegen zeigten Mäuse, welche mit rekombinanten H3N-39TS bzw. H3N infiziert wurden, die für das CVB3-Myokarditismodell typische Gewichtsreduktion von 10-15 % (**Abb. 31A**). Um den allgemeinen Gesundheitszustand der Tiere charakteristischer zu beschreiben, wurde dieser anhand einer Skala von 0-5 (folgend als Gesundheitsscore) bewertet und die Tiere am Ende der Untersuchungsperiode am Tag 7 nach Infektion entsprechend dieses Scores beurteilt. Unbehandelte Tiere, ohne gesundheitliche Einschränkung erhielten einen Score von 5, wohingegen sich Tiere mit einem Score von 0 durch eine sehr geringe Aktivität sowie klinische Anzeichen einer schweren Infektionskrankheit auszeichneten (reduzierte Bewegung, gekrümmte Haltung, struppiges Fell). Es wurden alle Tiere innerhalb einer Gruppe bewertet. Darauf beruhend betrug der Score von mit H3N-39TS bzw. H3N infizierten Tieren jeweils 2,5. Den mit rekombinatem H3N-375TS infizierten Mäusen wurde ein Score von 4,5 zugeordnet. Auch wenn sie tendenziell struppiges Fell aufzeigten, waren sie in ihrer Aktivität mit den Kontrolltieren (sham, Score 5) vergleichbar (**Abb. 31B**). Die Bestimmung der kardialen CVB3-Titer mittels Plaque Assay zeigte, dass signifikant höhere Titer aus der Infektion mit H3N-39TS (10^6 pfu/g Herzgewebe) bzw. H3N (10^7 pfu/g Herzgewebe) resultierten als aus der Infektion mit H3N-375TS (10^1 pfu/g Herzgewebe). Dabei fiel auf, dass lediglich in zwei der mit H3N-375 infizierten Tieren überhaupt nachweisbare Virusmengen detektiert werden konnten. Zudem waren die Titer von H3N-39TS eine \log_{10} -Stufe niedriger als die von CVB3-H3, was darauf hindeutet, dass die inserierten miRNA-39TS, einen geringfügig negativen Einfluss auf die Replikation besaßen (**Abb. 31C**).

Die mittels qRT-PCR ermittelte CVB3-Kopienzahl des rekombinanten H3N-375TS lag im Pankreas mit durchschnittlich $0,5 \times 10^1$ Kopien pro μg Pankreas-RNA signifikant unter dem von H3N-39TS (1000-fach höher) bzw. von H3N (10000-fach höher) (**Abb. 31D**). Entsprechend der kardialen CVB3-Titer zeigte sich im Pankreas, dass die CVB3-Kopienzahl der H3N-39TS-Proben etwa eine \log_{10} -Stufe unter der von H3N lag. Die pathohistologischen Untersuchungen zeigen in den mit H3N-375TS infizierten Tieren keine kardiale Inflammation. Hingegen wurde bei den mit H3N-39TS bzw. H3N infizierten Tieren ein kardialer Inflammationsscore von 1,3 bzw. 2 nachgewiesen (**Abb. 31E** und **Abb. 32A**). Das Pankreas von mit H3N-375TS infizierten Mäusen war vollständig in Takt. Dagegen war das Pankreas von mit H3N infizierten Tieren fast vollständig (zu 98%) und jenes der mit H3N-39TS infizierten Tiere überwiegend (78 %) zerstört (**Abb. 31F** und **Abb. 32A**).

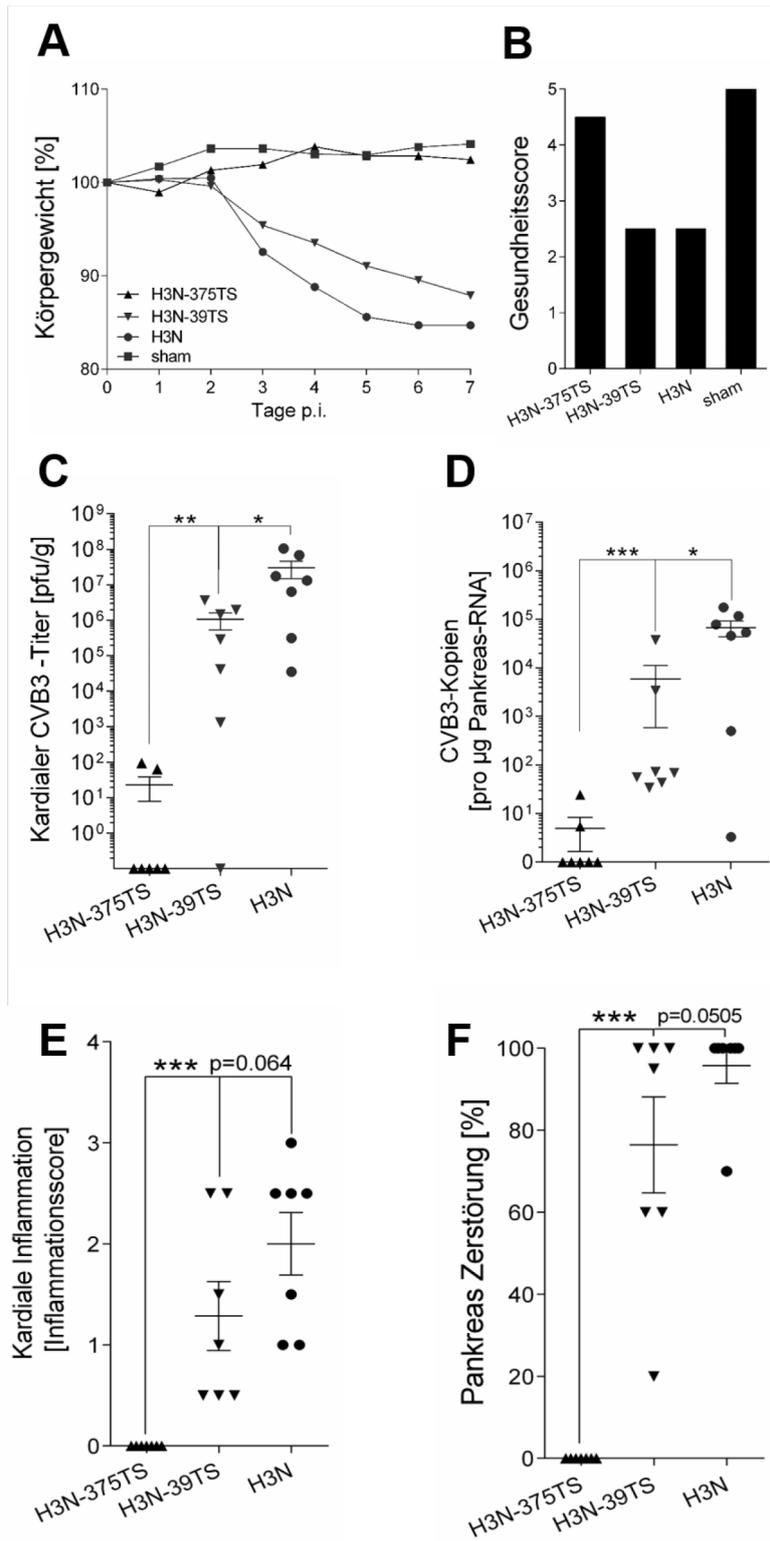


Abbildung 31: Die intraperitoneale Injektion von H3N-375TS führt nicht zur Infektion von NMRI-Mäusen.

NMRI-Mäuse wurden mit 1×10^5 pfu rekombinantem H3N-375TS, H3N-39TS oder H3N infiziert bzw. es wurde den Kontrolltieren eine 0,9 %ige NaCl-Lösung appliziert. Der Untersuchungszeitraum betrug sieben Tage. **(A)** Der Gewichtsverlauf wurde im Verlauf der siebentägigen Infektionszeit täglich überprüft **(B)**. Der allgemeine Gesundheitszustand der Mäuse wurde an Tag sieben nach Infektion anhand eines Gesundheits-scores bewertet 0 (klinische Anzeichen einer schweren Infektionskrankheit) -5 (ohne gesundheitliche Einschränkungen). **(C)** Die kardialen Titer von H3N-375TS, H3N-39TS und H3N wurden mittels Plaque Assay auf HeLa-Zellen bestimmt, jede Probe wurde als technisches Triplikat analysiert. **(D)** Aus den Pankreasgeweben wurde die Gesamt-RNA isoliert und mittels qRT-PCR die CVB3-Kopienzahl pro Mikrogramm Pankreas-RNA ermittelt, jede Probe wurde als technisches Triplikat gemessen. **(E-F)** Herz- und Pankreasgewebe der infizierten NMRI-Mäuse wurden histologisch aufgearbeitet und bezüglich der Inflammation beurteilt **E**. Kardiale Inflammation bewertet anhand eines Inflammationsscores zwischen 0-4 (0=keine Inflammation, 4=sehr starke Inflammation, Nekrose). **(F)** Pankreasinflammation anhand einer Bewertungsskala von 0 (keine Gewebeveränderung) bis 100% (komplette Organzerstörung). Dargestellt sind jeweils Mittelwerte \pm SEM. **(C-F)** Jedes Symbol zeigt den Wert eines Versuchstiers, * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$, $n=7$ Tiere pro Gruppe.

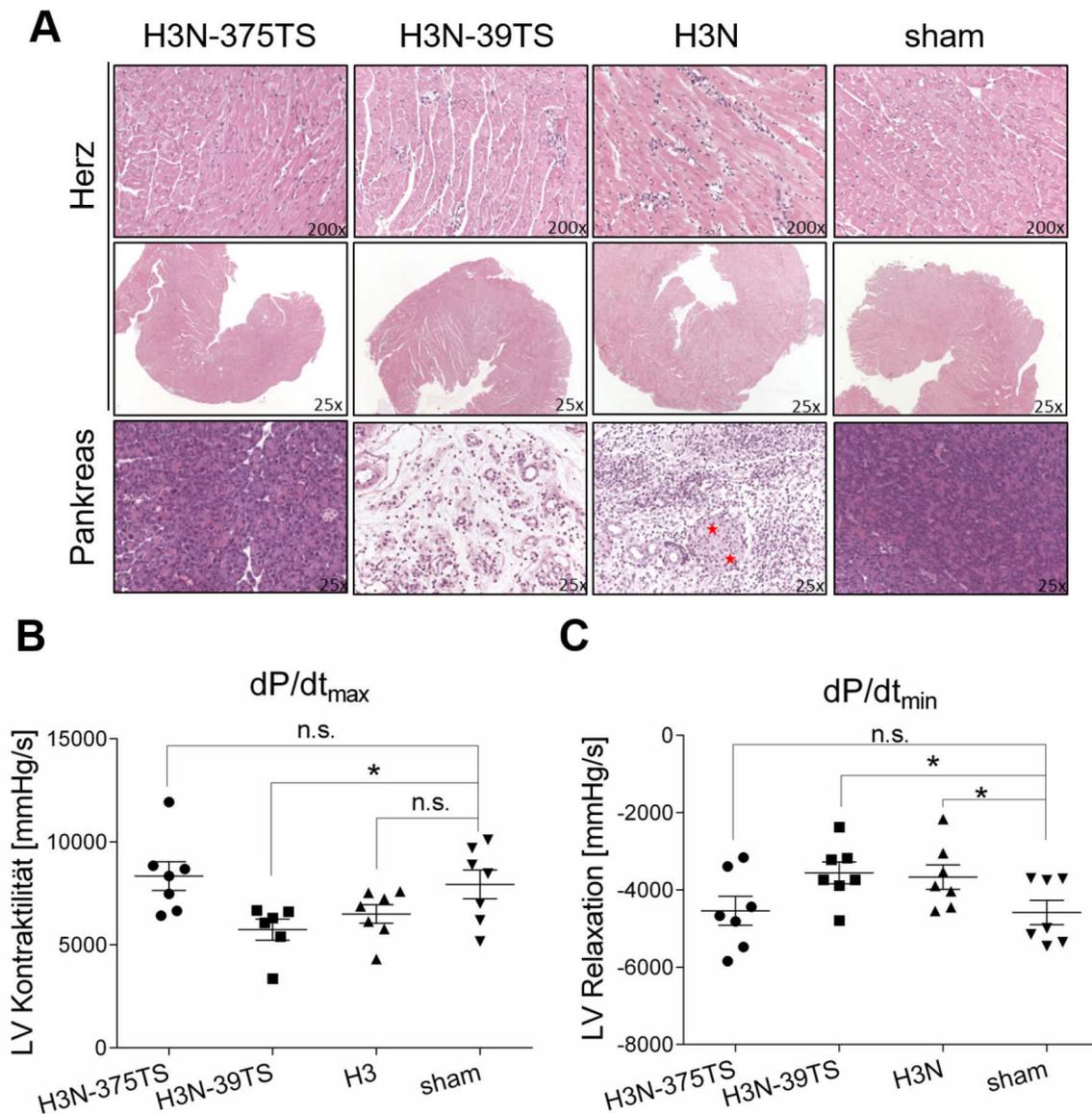


Abbildung 32: Histologische und hämodynamische Analyse intraperitoneal mit H3N-375TS infizierter NMRI-Mäuse.

Mäuse wurden i.p. mit 1×10^5 pfu H3N-375TS, H3N-39TS bzw. H3N infiziert oder mit NaCl (sham) behandelt. **A**) Herz- und Pankreasgewebe der NMRI-Mäuse wurde histologisch aufgearbeitet und mittels H&E-Färbung der Querschnitte analysiert. Die roten Sterne markieren Pankreasinseln. Dargestellt sind repräsentative Färbungen jeder Gruppe. Die Vergrößerung der Herzquerschnitte lag bei 25 - und 200-fach, die des Pankreasgewebes bei 200-fach. Die Messung der Hämodynamik erfolgte sieben Tage nach der Infektion. Die hämodynamische Charakterisierung erfolgte sieben Tage nach der Infektion. Dafür wurden über 20 min **(B)** dp/dt_{max} , ein Maß zur Bewertung der kardialen Kontraktilität, sowie **(C)** dp/dt_{min} , ein Maß für die kardiale Relaxation, der einzelnen Tiere aufgezeichnet. **(B-C)** Jedes Symbol zeigt den Wert eines Versuchstiers, zusätzlich dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte \pm SEM, * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$, n.s. = nicht signifikant, $n=7$ Tiere pro Gruppe.

Entsprechend der Erwartungen wurden die rekombinanten H3N-375TS im Pankreas vollständig durch den miRNA-375TS vermittelten RNAi-Mechanismus supprimiert. Obwohl die miRNA-375 nicht im murinen Herzgewebe exprimiert wird, kam es dennoch zu keiner kardialen Infektion mit H3N-375. Da das modifizierte H3N-375TS pankreasattenuiert ist, jedoch keine Myokarditis in den Mäusen verursachte, deutet dies darauf hin, dass das Pankreas eine essentielle Rolle für die kardiale CVB3-

Infektion nach i.p. Applikation des Virus besitzt, da die im Pankreas replizierenden H3-Varianten H3N und H3N-39TS eine kardiale Infektion verursachten. Dieser Befund bestätigt die Hypothese von Tracy *et al.*, dass i.p. appliziertes CVB3 zuerst das Pankreas und danach das Herz infiziert, wobei die pankreatische Virusreplikation essentiell für die Ausbildung einer Myokarditis ist⁹⁵.

Anhand der durchgeführten hämodynamischen Messungen konnten bei der maximalen Druckanstiegsgeschwindigkeit (dP/dt_{max}) signifikante Unterschiede zwischen der uninfizierten Kontrolle (sham) und den mit H3N-39TS infizierten Mäusen festgestellt werden. Zwischen den mit H3N-375TS und den mit H3N-39TS infizierten Tieren gab es keine signifikanten Unterschiede, die Kontraktilität der mit H3N-375TS infizierten Tiere war mit denen der uninfizierten Kontrolltiere vergleichbar (**Abb. 32B**). Ebenso zeigten sich Unterschiede bei der maximalen Druckabfallgeschwindigkeit (dP/dt_{min}) zwischen den sham-Tieren und den mit H3N-39TS bzw. H3N infizierten Mäusen, wohingegen die mit H3N-37TS infizierten Mäuse sich nicht signifikant von denen uninfizierter Tiere unterschieden (**Abb. 32C**).

Die Ergebnisse der i.p. Injektion von H3N-375TS zeigten, dass das pankreasattenuierte Virus wie erwartet keine Infektion im Pankreas verursacht, jedoch die i.p. Applikationsroute keine Infektion des Herzens ermöglicht. Nicht pankreasattenuiertes i.p. appliziertes H3N-39TS hingegen führt sowohl zu einer Pankreatitis als auch zu einer kardialen Infektion.

3.14 Die intravenöse Applikation von H3N-375TS induziert bei NMRI-Mäusen eine Myokarditis ohne Ausbildung einer Pankreatitis

Aus der Annahme, dass die fehlende Replikation von H3N-375TS im Pankreas verhindert, dass es zu einer kardialen Infektion kommt, resultierte die Vermutung, dass über die direkte Applikation des Virus in den Blutstrom eine Infektion des Herzens erfolgen könnte. Daher wurde pankreasattenuiertes H3N-375 (5×10^4 , 5×10^5 bzw. 5×10^6) i.v. in die linke *Vene jugularis* injiziert, um eine sofortige hämatogene Ausbreitung auszulösen und direkt das Herz zu infizieren. Der Kontrollgruppe wurde eine 0,9 %-ige NaCl-Lösung injiziert.

Im Verlauf der siebentägigen Untersuchungsperiode wiesen die infizierten Mäuse, unabhängig von der injizierten Virusdosis, ein ähnliches Körpergewicht wie die mit NaCl behandelten Kontrolltiere auf (**Abb. 33A**). Bezogen auf den allgemeinen Gesundheitszustand gab es keine gravierenden Unterschiede zwischen den Tieren, die mit unterschiedlichen Dosen rekombinanten H3N-375TS infiziert wurden bzw. nur geringfügige Unterschiede zur Kontrollgruppe. Die infizierten Tiere hatten struppiges Fell, zeigten jedoch ein vergleichbares Aktivitätsverhalten wie die nicht infizierten Kontrolltiere (**Abb. 33B**). Mit steigender Virus-Dosis stieg der CVB3-Titer im Herzen. So lag der CVB3-Titer bei den mit H3N-375TS [5×10^4 pfu] infizierten Mäusen bei 10^1 pfu/g, der der mit 5×10^5 pfu infizierten lag etwa 10-mal höher und der bei einer Dosis von 5×10^6 lag 50-mal höher. Zudem zeigte sich, dass bei den Mäusen, denen eine niedrigere Virusdosis injiziert wurde, nur bei einer von vier Mäusen Virus im Herzen nachweisbar war. Bei der höchsten applizierten Dosis wiesen hingegen drei der vier Mäuse CVB3 im

Herzen auf (**Abb. 33C**). Allerdings konnte nur bei einer von vier untersuchten Mäusen ein hoher kardialer Virustiter von 10^6 pfu/g nachgewiesen werden. Mit steigender Virendosis stieg zudem der kardiale Inflammationsscore an. Dieser lag bei einer viralen Dosis von 5×10^6 pfu bei 0,7 (**Abb. 33D**) und somit höher als bei den niedrigeren Dosierungen, aber signifikant niedriger als nach i.p. Applikation von H3N-39TS (vgl. **Abb. 31E**, H3N-39TS, 1,3). Bei keinem der infizierten Tiere konnten CVB3-Kopien im Pankreas nachgewiesen werden (Ergebnisse nicht gezeigt).

Die pathohistologischen Auswertungen zeigten, dass im Herzen bei einer initial applizierten Virusdosis von 5×10^4 pfu keine Inflammation auftrat, wohingegen bei einer Virusdosis von 5×10^6 pfu größere Inflammationsherde vorhanden waren (**Abb. 33E**). Zudem war ersichtlich, dass die Mäuse eine kardiale CVB3-Infektion entwickelten, ohne dass eine Pankreasinfektion verursacht wurde (**Abb. 33C-E**).

Die Ergebnisse zeigen, dass die Mäuse nach i.v. Applikation von H3N-375TS eine akute Myokarditis entwickeln ohne, dass eine Infektion des Pankreas mit einhergehender Pankreatitis auftrat.

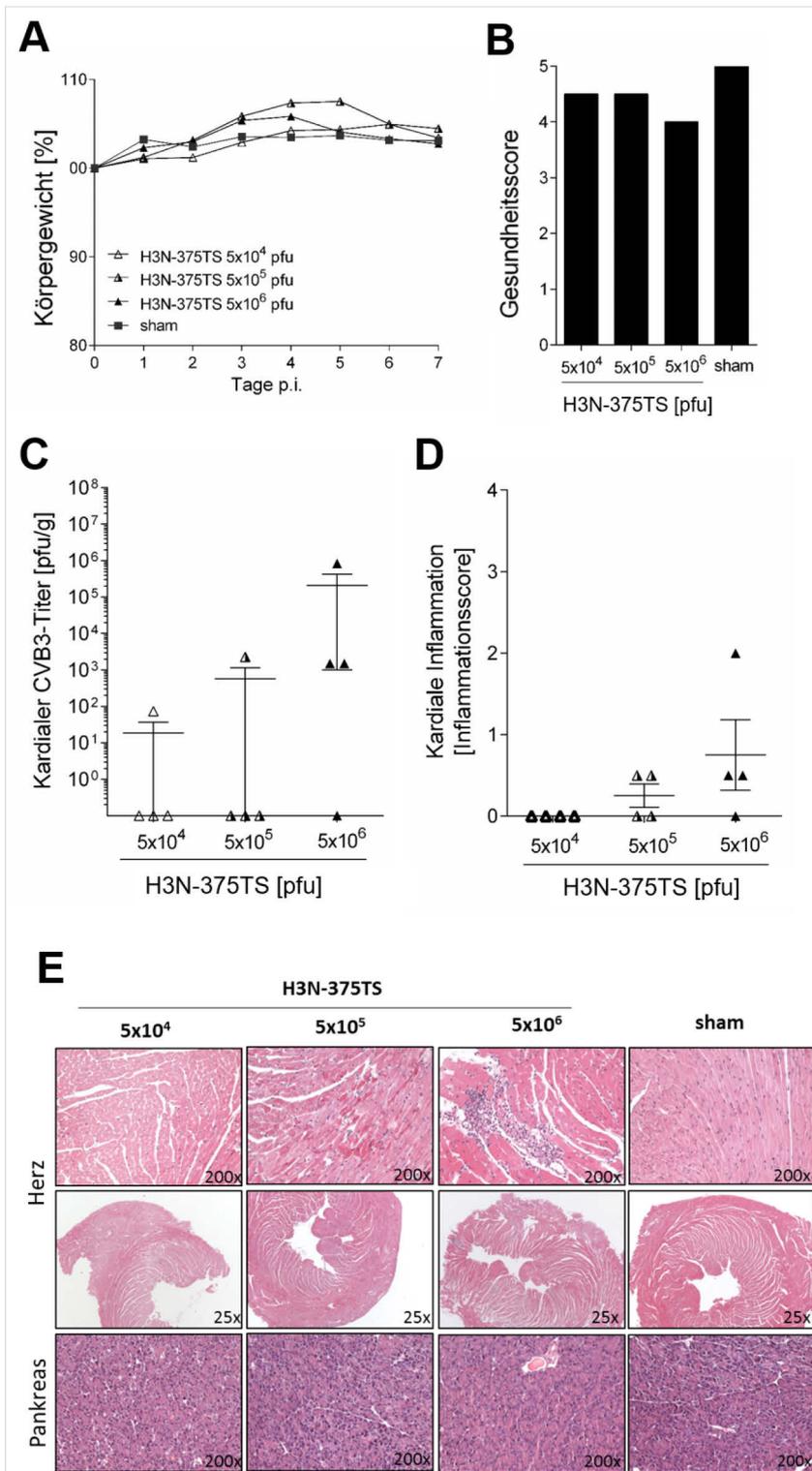


Abbildung 33: Die intravenöse Applikation von H3N-375TS verursacht in NMRI-Mäusen eine Myokarditis, aber keine Pankreatitis.

NMRI-Mäuse wurden i.v. mit H3N-375TS (5x10⁴, 5x10⁵ bzw. 5x10⁶ pfu) infiziert. bzw. wurde den Kontrolltieren eine 0,9 %-ge NaCl-Lösung injiziert. Der Untersuchungszeitraum betrug sieben Tage. (A) Der Gewichtsverlauf wurde täglich überprüft (B). Der Gesundheitsstatus der Mäuse wurde an Tag sieben nach Infektion anhand eines Gesundheitsscores bewertet (0 [klinische Anzeichen einer schweren Infektionskrankheit] -5 [ohne gesundheitliche Einschränkungen]). (C) Die kardialen CVB3-Titer wurden mittels Plaque Assay auf HeLa-Zellen bestimmt, jede Probe wurde als technisches Triplikat analysiert. (D) Das Herzgewebe der infizierten NMRI-Mäuse wurde histologisch aufgearbeitet und anhand des Inflammationsscores zwischen 0-4 (0=keine Inflammation, 4= sehr starke Inflammation, Nekrose) bestimmt. (E) Herz- und Pankreasgewebe der infizierten NMRI-Mäuse wurde histologisch aufgearbeitet und mittels H&E-Färbung analysiert. Dargestellt sind repräsentative Färbungen jeder Gruppe. Die Vergrößerung der Herzquerschnitte lag bei 25 - und 200-fach, die des Pankreasgewebes bei 200-fach. (A-D). Dargestellt sind jeweils Mittelwerte ± SEM, n=4 Tiere pro Gruppe. (C-D) Jedes Symbol zeigt den Wert eines Versuchstiers.

3.15 Herzpassagiertes rekombinantes H3N-375TS induziert eine starke Myokarditis in NMRI-Mäusen

Nicht pankreasattenuierte CVB3-Stämme replizieren nach Infektion über mehrere Tage im Pankreas und generieren so große Mengen infektiöser Viren, welche letztlich über den Blutstrom zu hohen kardialen CVB3-Titern führen. Die hier generierte pankreasattenuierte CVB3-Variante hingegen wird i.v. direkt in den Blutstrom injiziert und gelangt sofort zum Herzen. Infolge der i.v. Applikation pankreasattenuierter H3N-375TS wurden nur geringe kardiale Virustiter detektiert, was wiederum potentiell ursächlich für das Ausbleiben hämodynamischer Dysfunktionen sein könnte. Um zu überprüfen, ob durch Verwendung von herzpassagiertem H3N-375TS eine Verstärkung der kardialen Infektion und Myokarditis möglich ist, wurde im nächsten Schritt herzpassagiertes (*hp*) rekombinantes H3N-375TS, entsprechend der in Kapitel 2.2.6.4 beschriebenen Vorgehensweise, generiert. Das hierfür verwendete Virus wurde aus dem Tier isoliert, welches nach i.v. Applikation von 5×10^6 pfu die höchsten Virustiter im Herzen aufwies (**Abb. 32C**). Dazu wurden NMRI-Mäuse i.v. mit H3N-375TS *hp* bzw. H3N-39TS, jeweils mit einer Dosis von 5×10^6 pfu, infiziert. Zudem wurden Tiere i.v. mit 1×10^8 pfu nicht herzpassagiertem H3N-375TS infiziert, um zu überprüfen ob aus einer erhöhten initial applizierten Virendosis höhere kardiale CVB3-Titer resultieren. Den Kontrolltieren wurde eine 0,9 %-ge NaCl-Lösung injiziert. In allen Gruppen wurde keine Gewichtsreduktion über den Untersuchungszeitraum von sieben Tagen festgestellt. Im Gegenteil kam es eher zur Stagnation bzw. zur Gewichtszunahme der Tiere (**Abb. 34A**). Nur an Tag eins wiesen alle Tiere eine leichte Gewichtsreduktion auf, welche auf den operativen Eingriff zurück zu führen ist.

Tiere, welche mit rekombinantem H3N-375TS *hp* (5×10^6 pfu) bzw. mit H3N-375TS (1×10^8 pfu) infiziert wurden, zeigten einen Gesundheitsscore von 4,5 bzw. 4 und waren mit den sham-Tieren vergleichbar (**Abb. 34B**). Bei den mit H3N-39TS infizierten Tieren, wurde ein reduziertes Allgemeinbefinden, gekennzeichnet durch eine leicht gekrümmte Haltung und geringere Aktivität, sichtbar. Trotz unterschiedlicher initialer Virusdosis resultierten aus der siebentägigen Infektion mit der *hp*-Variante (initial 5×10^6 pfu) und der nicht-*hp*-Variante (initial 1×10^8 pfu) von H3N-375TS vergleichbare kardiale CVB3-Titer von etwa 5×10^4 pfu/g. Der kardiale Titer von H3N-39TS lag in etwa auf dem gleichen Niveau (**Abb. 34C**). Wie erwartet, konnten keine CVB3-Kopien der *hp*- als auch der nicht-*hp*-Variante des H3N-375TS im Pankreas nachgewiesen werden. Dagegen wurden im Mittel 7000 CVB3-Kopien pro μg Pankreas-RNA bei den mit H3N-39TS infizierten Tieren nachgewiesen (**Abb. 34D**). Auch die Pankreaszerstörung wurde nur bei den mit rekombinantem H3N-39TS infizierten Tieren beobachtet und lag bei fast allen Tieren bei nahezu 100 %. In den Tieren beider mit H3N-375TS infizierter Gruppen war das Pankreas vollständig intakt (**Abb. 34F**). Die kardiale Inflammation lag bei der H3N-375TS *hp* Infektion mit einem Wert von 1,7 höher als die der nicht-*hp* Variante (1,4) bzw. als bei Infektion mit H3N-39TS (1,5) (**Abb. 34E**).

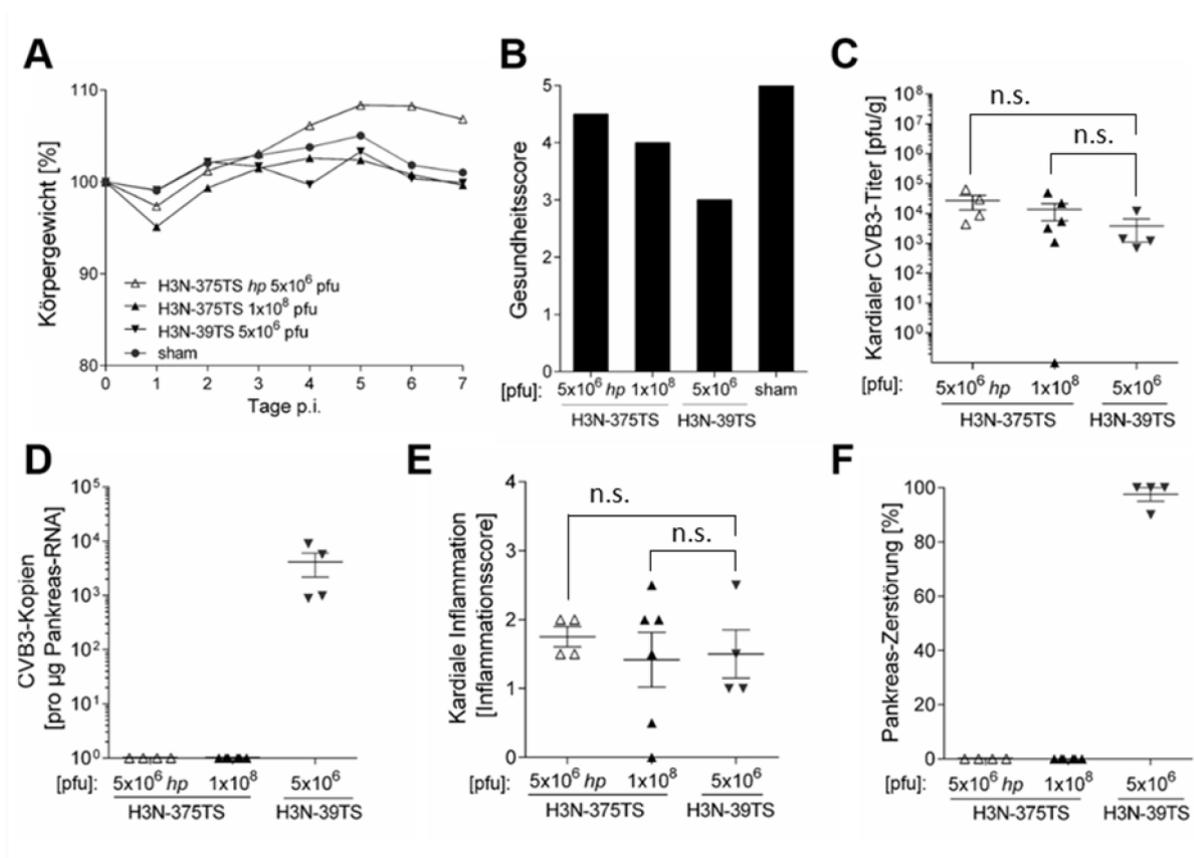


Abbildung 34: Die intravenöse Applikation von herzpassegiertem oder hochdosiertem H3N-375TS verursacht in NMRI-Mäusen eine Myokarditis, aber keine Pankreatitis.

NMRI-Mäuse wurden mit 5×10^6 pfu herzpassegiertem (*hp*) H3N-375TS ($n=4$) oder nicht herzpassegiertem H3N-39TS ($n=6$) bzw. H3N-375TS mit 1×10^8 pfu ($n=4$) infiziert. Kontrolltieren wurde 0,9 %-ge NaCl-Lösung injiziert ($n=4$). Der Untersuchungszeitraum betrug sieben Tage. (A) Der Gewichtsverlauf wurde täglich überprüft (B). Der Gesundheitsstatus der Mäuse wurde an Tag sieben nach Infektion anhand eines Gesundheits-scores bewertet [0 (klinische Anzeichen einer schweren Infektionskrankheit) -5 (ohne gesundheitliche Einschränkungen)]. (C) Die kardialen Titer von H3N-375TS, H3N-39TS und H3N wurden mittels Plaque Assay auf HeLa-Zellen bestimmt, jede Probe wurde als technisches Triplikat analysiert. (D) Aus den Pankreasgeweben wurde die Gesamt-RNA isoliert und mittels qRT-PCR die CVB3-Kopienzahl ermittelt, jede Probe wurde als technisches Triplikat gemessen. (E; F) Herz- und Pankreasgewebe der infizierten NMRI-Mäuse wurden histologisch aufgearbeitet und bezüglich der (E) kardialen Inflammation bzw. (F) pankreatischen Destruktion beurteilt. E. Kardiale Inflammation bewertet anhand eines Inflammationsscores zwischen 0-4 (0=keine Inflammation, 4= sehr starke Inflammation, Nekrose). (F) Pankreaszerstörung anhand einer Bewertungsskala von 0 (keine Gewebeveränderung) bis 100 % (komplette Organzerstörung). (C-F) Jedes Symbol zeigt den Wert eines Versuchstiers, zusätzlich dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte \pm SEM, n.s. = nicht signifikant.

Die pathohistologischen Auswertungen bestätigten die vorherigen Ergebnisse und zeigten, dass das Pankreas von mit H3N-375TS *hp* -und nicht-*hp* infizierten bzw. den nicht infizierten NMRI-Mäusen unbeschädigt war. Bei Tieren, welche mit H3N-39TS infiziert wurden, war das exokrine Pankreasgewebe nahezu vollständig zerstört (Abb. 35A).

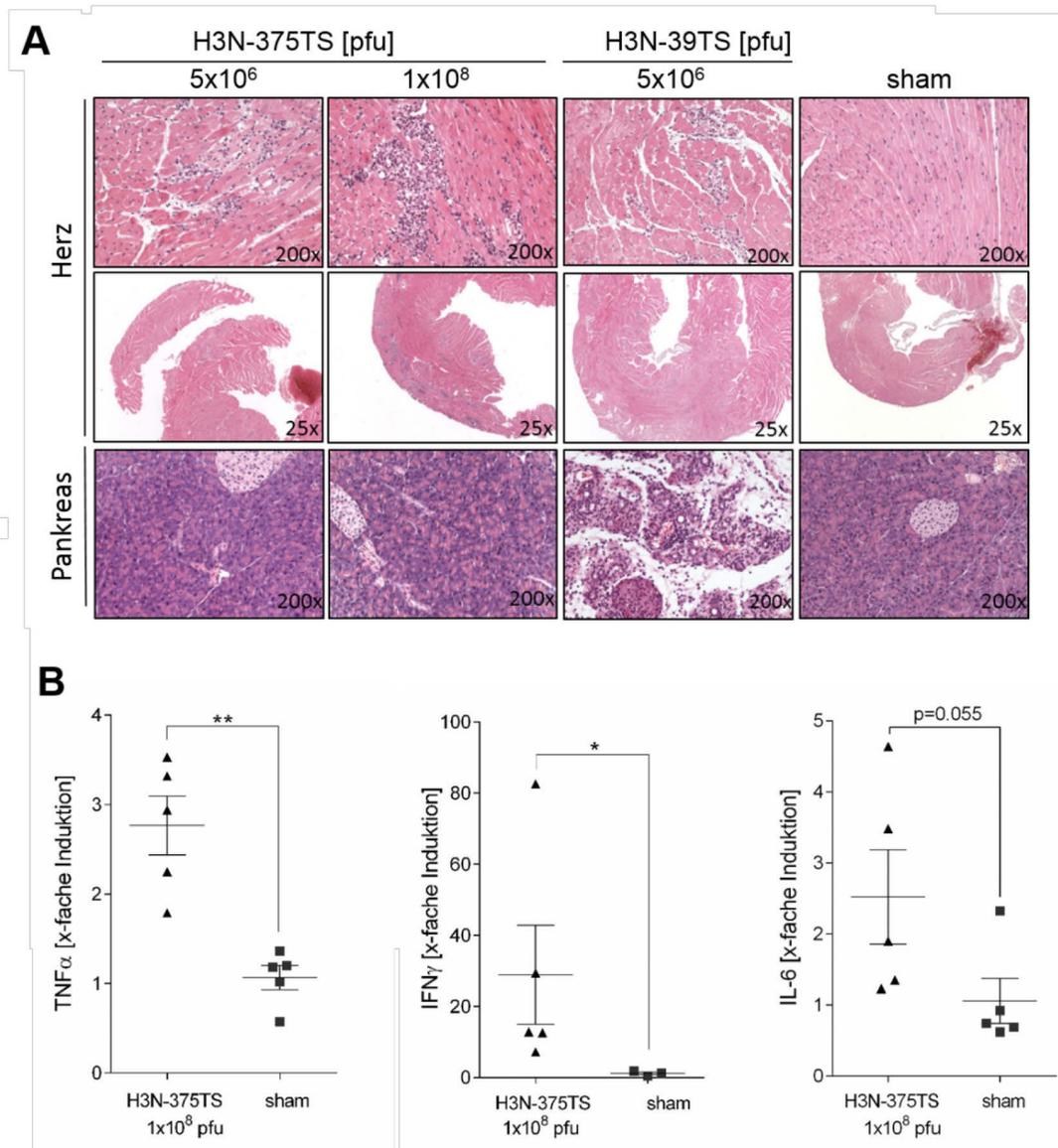


Abbildung 35: Die intravenöse Applikation von herzpassagiertem oder hochdosiertem H3N-375TS verursacht in NMRI-Mäusen eine Inflammation des Herzgewebes, jedoch keine des Pankreas.

NMRI-Mäuse wurden mit 5×10^6 pfu herzpassagiertem (*hp*) H3N-375TS ($n=4$) oder nicht herzpassagiertem H3N-39TS ($n=6$) bzw. H3N-375TS mit 1×10^8 pfu ($n=4$) infiziert. Kontrolltieren wurde 0,9 %-ge NaCl-Lösung injiziert ($n=4$). Der Untersuchungszeitraum betrug sieben Tage. **(A)** Herz- und Pankreasgewebe der infizierten NMRI-Mäuse wurde histologisch aufgearbeitet und mittels H&E-Färbung der Querschnitte analysiert. Dargestellt sind repräsentative Färbungen jeder Gruppe. Die Vergrößerung der Herzquerschnitte lag bei 25- und 200-fach, die des Pankreasgewebes bei 200-fach. **(B)** Expression von IL-6, TNF α im Herzgewebe von mit H3N-375TS (1×10^8 pfu) infizierten bzw. nicht infizierten Mäusen ermittelt über qRT-PCR. Alle Werte wurden auf die Expression der mitgeführten Referenzkontrolle 18S relativiert. Jedes Symbol zeigt den Wert eines Versuchstiers, zusätzlich dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte \pm SEM, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Auch wenn die histologische Analyse der kardialen Inflammation vereinzelt größere Inflammationsherde nach Infektion mit 1×10^8 pfu an H3N-375TS zeigte, wiesen H3N-375TS *hp* (5×10^6 pfu) und H3N-39TS (5×10^6 pfu) infizierte Tiere eine zueinander ähnliche, nur geringfügig schwächere kardiale Inflammation auf als Tiere, die mit 1×10^8 pfu H3N-375TS infiziert wurden. Basierend auf den gemittelten kardialen Inflammationsscores gab es jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchstiergruppen bezüglich der kardialen Inflammation. Dennoch resultierte die Infektion

mit H3N-375 *hp* bzw. die Infektion mit einer höheren initialen Virusdosis in einer Verstärkung der kardialen Inflammation gegenüber der Infektion mit nicht herzpasiertem H3N-375TS (vgl. **Abb. 33D-E**), trotz erfolgreicher Pankreasattenuation. Anschließend wurde die Hämodynamik der mit H3N-375TS i.v. infizierten Mäuse und der denen 0,9%-ige NaCl injiziert wurde, mittels eines Miniaturherzkatheters überprüft. Dabei konnten keine Unterschiede bezüglich der systolischen und diastolischen linksventrikulären Funktion des Herzens zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden (Ergebnisse nicht gezeigt).

Zur Charakterisierung der Immunantwort der NMRI-Mäuse auf die Infektion mit H3N-375TS wurde die kardiale Expression der Zytokine IL-6 und TNF α sowie des Typ II-Interferons IFN γ überprüft. Es ist bekannt, dass es zu einer verstärkten kardialen Expression dieser Mediatoren während der CVB3-Infektion in Mäusen kommt und diese somit an der Regulation der Immunantwort innerhalb der murinen CVB3-Infektion beteiligt sind^{286,287}.

Dafür wurde die Expressionen von IL-6, TNF α und IFN γ im Herzmuskelgewebe mittels qRT-PCR bestimmt. Die Expressionslevel von IL-6, TNF α und IFN γ waren in den mit 1×10^8 pfu H3N-375TS infizierten Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren deutlich erhöht (**Abb. 35B**).

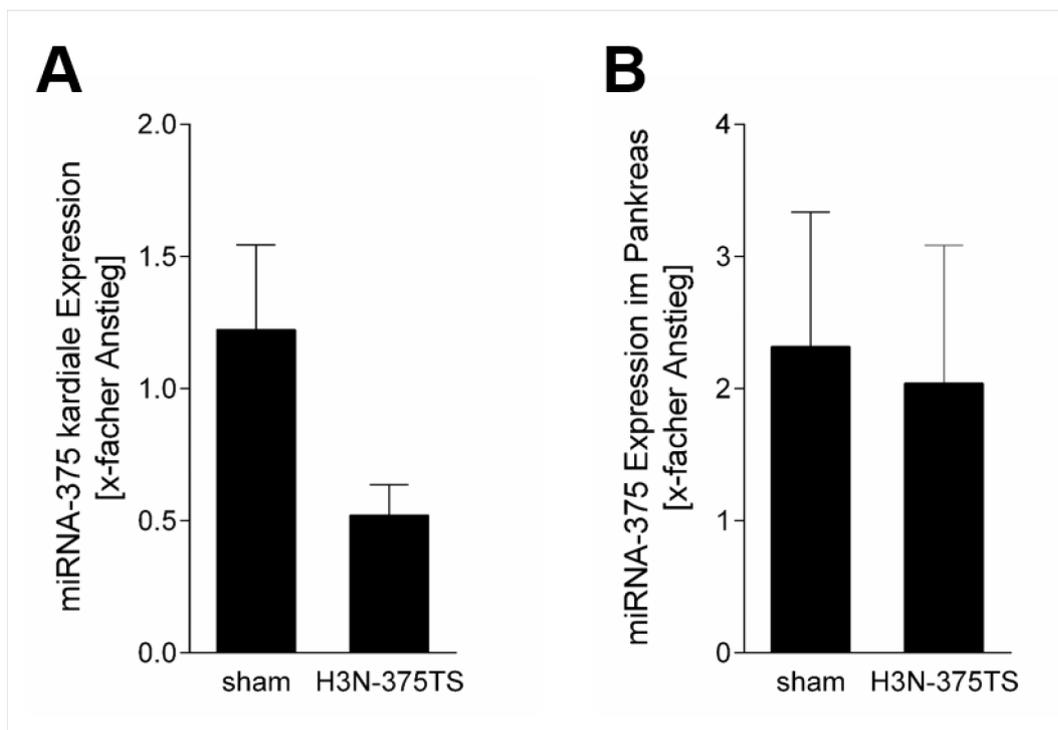


Abbildung 36: Expression der miRNA-375 im Herz- und Pankreasgewebe von H3N-375 infizierten Mäusen. NMRI-Mäuse wurden mit 1×10^8 pfu H3N-375TS infiziert bzw. wurde den Kontrolltieren (sham) 0,9% ige NaCl-Lösung injiziert. Aus den Pankreas -bzw. Herzgeweben wurde die Gesamt-RNA isoliert und mittels qRT-PCR unter Verwendung miRNA-375 spezifischer *stem-loop* Primer auf die Expression von miRNA-375 im (A) Herzen und (B) Pankreas analysiert. (A-B) Jede Probe wurde als technisches Triplikat gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM. n=2.

Um zu untersuchen, ob durch die Infektion von H3N-375TS eine Beeinflussung der endogenen miRNA-375 Expression erfolgt, wurde die miRNA-375-Expression im Herzen und Pankreas infizierter (H3N-375TS; 1×10^8 pfu) und nicht infizierter Tiere mittels qRT-PCR bestimmt. Weder im Herzen (**Abb. 36A**)

noch im Pankreas (**Abb. 36B**) konnten hierbei signifikanten Unterschiede in der miRNA-375 Expression festgestellt werden. Aufgrund der hohen Fehlerrate der RNA-abhängigen-RNA-Polymerase von CVB besteht die Möglichkeit, dass es zu Mutationen innerhalb der miRNA-375TS kommt, welche es den modifizierten Viren ermöglicht den RNAi-vermittelten Abbau ihres Genoms zu umgehen. Daher wurde die miRNA-375TS-Sequenz von H3N-375TS, welches nach siebentägiger Infektion aus NMRI-Mäusen isoliert wurde, nach dreimaliger Passagierung des Virus auf HeLa-Zellen, unter Behandlung mit miRNA-375-Mimics, sequenziert. Die Ergebnisse der Sequenzierung zeigten, dass trotz des hohen Selektionsdrucks *in vitro* als auch *in vivo* keine Mutationen innerhalb der inserierten TS der rekombinanten Viren auftraten.

3.16 Das chronische Modell der Mausmyokarditis

Schmidtke *et al.* zeigten, dass NMRI-Mäuse nach Infektion mit CVB3-H3 eine chronische Myokarditis entwickeln¹¹⁵. Um zu überprüfen, ob die in der vorliegenden Studie generierte CVB3-Variante H3N-375TS ebenfalls eine chronische Myokarditis verursacht, wurden NMRI-Mäuse mit H3N-375TS *hp* mit einer Dosis von 1×10^8 pfu i.v. infiziert. Den Tieren der Kontrollgruppe wurde eine 0,9 %-ge NaCl-Lösung injiziert. Die Versuchsdauer betrug 28 Tage.

Initial konnte eine starke Gewichtsabnahme am ersten und zweiten Tag nach der Virusinfektion beobachtet werden, die in den Kontrolltieren nicht auftrat. Diese ist vermutlich auf die hohe H3N-375TS *hp* Dosis von 1×10^8 pfu in Kombination mit dem operativen Eingriff zurück zu führen. Im Verlauf der 28-tägigen Infektionszeit nahmen die Tiere beider Gruppen um ca. 20 % zu (**Abb. 37A**). Der kardiale Inflammationsscore der infizierten Tiere lag im Mittel bei einem Wert von 1 (**Abb. 37B**). Im Herz konnten nur sehr niedrige Infektionsraten ermittelt werden, wobei ausschließlich virale RNA, aber keine infektiösen Viruspartikel detektiert werden konnten (**Abb. 37C**).

Die histopathologischen Untersuchungen zeigen, dass das Pankreas sowohl bei den infizierten als auch bei den nicht infizierten NMRI-Mäusen vollständig intakt war. Die Gewebeschnitte der Herzen wurden mit unterschiedlichen Färbemethoden angefärbt. Bei der H&E Färbung dient Hämatoxylin der Kernfärbung, Eosin wiederum ermöglicht die Unterscheidung zwischen baso- und azidophilen Zellstrukturen. Die hier verwendete Trichrom-Färbung nach Masson-Goldner kombiniert die Farbstoffe Eisenhämatoxylin, Azophloxin, Orange G und Lichtgrün SF, was eine selektive Darstellung von Kernstrukturen, Muskelfasern, Kollagen, Fibrin und Erythrozyten erlaubt. Diese differenzierte Darstellung des Bindegewebes ermöglicht somit eine exaktere Beurteilung fibrotischer Gewebeveränderungen infolge der CVB3-Infektion. So zeigte die Trichromfärbung eindeutige Zeichen einer chronischen Infektion mit fibrotischen Gewebeveränderung im Herzen der infizierten NMRI-Mäuse. Dabei waren erhebliche Unterschiede beim Vergleich der Tiere untereinander zu beobachten. Neben Tieren mit wenigen lokalen fibrotischen Arealen (kardialer Inflammationsscore von 1), gab es Tiere mit ausgedehnten entzündlich-fibrotischen Veränderungen (kardialer Inflammationsscore von 3) (**Abb. 37D**).

Auch für das chronische Versuchsmodell wurde am Ende der 28-tägigen Infektionszeit die Funktion des linken Ventrikels mittels eines Miniaturherzkatheters überprüft. Die systolischen und diastolischen Messwerte zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen den mit H3N-375TS *hp* infizierten Tieren und den uninfizierten Kontrolltieren (**Abb. 38A-B**).

Die Ergebnisse des 28-tägigen Infektionsversuches belegen dennoch, dass die selektive kardiale Infektion von NMRI-Mäusen mit pankreasattenuiertem H3N-375TS *hp* zur Entwicklung einer chronischen Myokarditis führt.

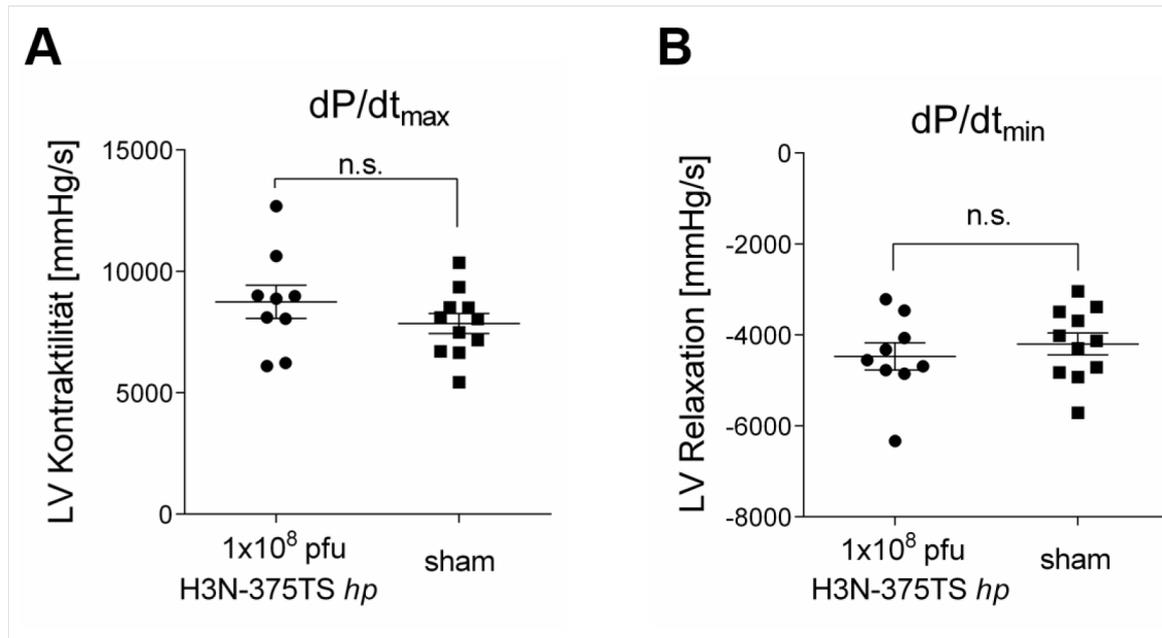


Abbildung 38: Hämodynamische Messungen von intravenös mit H3N-375TS infizierten Mäusen.

Mäuse wurden i.v. mit 1×10^8 pfu herzpassegierten (*hp*) H3N-375TS (n=9) infiziert oder mit NaCl (sham, n=11) behandelt. Hämodynamische Messungen erfolgten 28 Tage nach der Infektion. Die (A) Kontraktilität (dP/dt_{max}) und (B) Relaxation (dP/dt_{min}) des linken Ventrikels wurden jeweils über einen Zeitraum von 20 min mittels eines Herzkatheters aufgezeichnet. Jedes Symbol zeigt den Wert eines Versuchstiers, zusätzlich dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte \pm SEM; n.s. = nicht signifikant, n=12 Tiere pro Gruppe.

3.17 Die intravenöse Infektion von H3N-375TS verursacht in Balb/C-Mäusen eine akute Myokarditis, aber keine Pankreatitis

Bei den NMRI-Mäusen handelt es sich um eine Auszucht-Linie, welche eine höhere Variabilität bezüglich physiologischer Merkmale aufweist und so robuste Ergebnisse liefert, da die Tiere das physiologisch und genetisch deutlich diversere humane System besser als üblicherweise verwendete Inzuchtmäuse abbilden. Da jedoch der überwiegende Teil der publizierten Studien, in den das CVB3-Maus-Myokarditismodells adressiert wurde, Inzuchtlinien wie Balb/C oder C57BL/6 verwendete^{287,288}, muss die Reproduzierbarkeit der in der vorliegenden Studie generierten Daten auf eine solche Inzuchtlinie überprüft werden. Daher wurden Balb/C-Mäuse entsprechend des in Kapitel 3.15 beschriebenen Infektionsschemas für NMRI-Mäuse mit H3N-375TS bzw. mit H3N-39TS i.v. mit einer Dosis von 5×10^6 pfu infiziert. Weitere Tiere wurden, wie in Kapitel 3.15 beschrieben, i.v. mit einer

Dosis von 1×10^8 pfu H3N-375TS infiziert. Der Kontrollgruppe wurde eine 0,9 % -ge NaCl-Lösung injiziert. Mäuse, die mit H3N-39TS infiziert wurden, zeigten im Gegensatz zu NMRI-Mäusen (vgl. **Abb. 34A**) nach siebentägiger Infektion eine deutliche Gewichtsreduktion (**Abb. 39A**). Eines der Tiere dieser Gruppe verstarb infolge der durch die Infektion entwickelten Pankreatitis und Myokarditis vor Versuchsende. Dieses Ergebnis zeigt, dass Balb/C-Mäuse susceptibler für die Infektion mit H3N-39TS sind als die in Kapitel 3.15 verwendeten NMRI-Mäuse, was möglicherweise auf das geringere Körpergewicht der Balb/C-Mäuse bzw. auch auf deren stärkere Homogenität zurück zu führen ist. Die Tiere der anderen Versuchsgruppen nahmen leicht zu bzw. ihr Gewicht stagnierte (**Abb. 39A**). Auch die Beurteilung der physischen Konditionen mit einem Verhaltensscore von 1 zeigte, dass Mäuse, welche mit H3N-39TS infiziert wurden, klinische Anzeichen einer schweren CVB3-Infektion wie reduzierte Bewegung, gekrümmte Haltung und struppiges Fell aufwiesen. Tiere der beiden Gruppen, die mit 5×10^6 pfu bzw. 1×10^8 pfu H3N-375TS infiziert wurden, wurden jeweils mit einem Verhaltensscore von 4 bewertet. (**Abb. 39B**).

Die kardialen CVB3-Titer der mit H3N-375TS mit einer Dosis von 5×10^6 pfu bzw. 1×10^8 pfu infizierten Tiere lagen jeweils bei 1×10^4 pfu/g. Bei den mit H3N-39TS infizierten Tieren lag dieser bei ca. 10^5 pfu/g und war damit ca. 10x höher (**Abb. 39C**). Unabhängig von der injizierten Virusdosis konnten keine CVB3-Kopien im Pankreas der beiden mit H3N-375TS infizierten Gruppen nachgewiesen werden. Bei den mit H3N-39TS infizierten Tieren wurden hingegen über 5×10^6 CVB3-Kopien detektiert (**Abb. 39D**). Die kardiale Inflammation entsprach im Mittel einem Score von 1,7 bei Tieren, die mit rekombinanten H3N-375TS (5×10^6 pfu) infiziert wurden. Bei der höheren H3N-375TS-Dosis von 1×10^8 pfu ergab sich ein kardialer Inflammationsscore von 2, bei der Infektion mit H3N-39TS (5×10^6 pfu) lag der Wert bei 2,7 (**Abb. 39E**). Damit wurde bisher die höchste kardiale Inflammation mit der i.v. Applikationsroute erreicht bzw. eine Inflammation, die mit der aus der i.p. Injektion von NMRI Mäusen resultierenden Inflammation vergleichbar ist (vgl. **Abb. 39E** und **Abb. 32E**).

Die pathohistologischen Auswertungen bestätigten die bisher erzielten Ergebnisse in Balb/C-Mäusen. Das Pankreas der mit H3N-375TS infizierten bzw. der nicht infizierten Balb/C-Mäuse blieb intakt und wies keine entzündlichen Veränderungen auf. Bei den Tieren, welche mit H3N-39TS infiziert wurden, war das Pankreasgewebe hingegen sehr stark geschädigt (**Abb. 39F** und **Abb. 40**). Zudem wiesen diese Tiere ausgedehnte Inflammationsherde im Herzgewebe auf. Trotz des intakten, entzündungsfreien Pankreas traten ausgeprägte Inflammationsherde im Herzgewebe der mit H3N-375TS (5×10^6 pfu) und H3N-375TS (1×10^8 pfu) infizierten Tiere auf (**Abb. 40**).

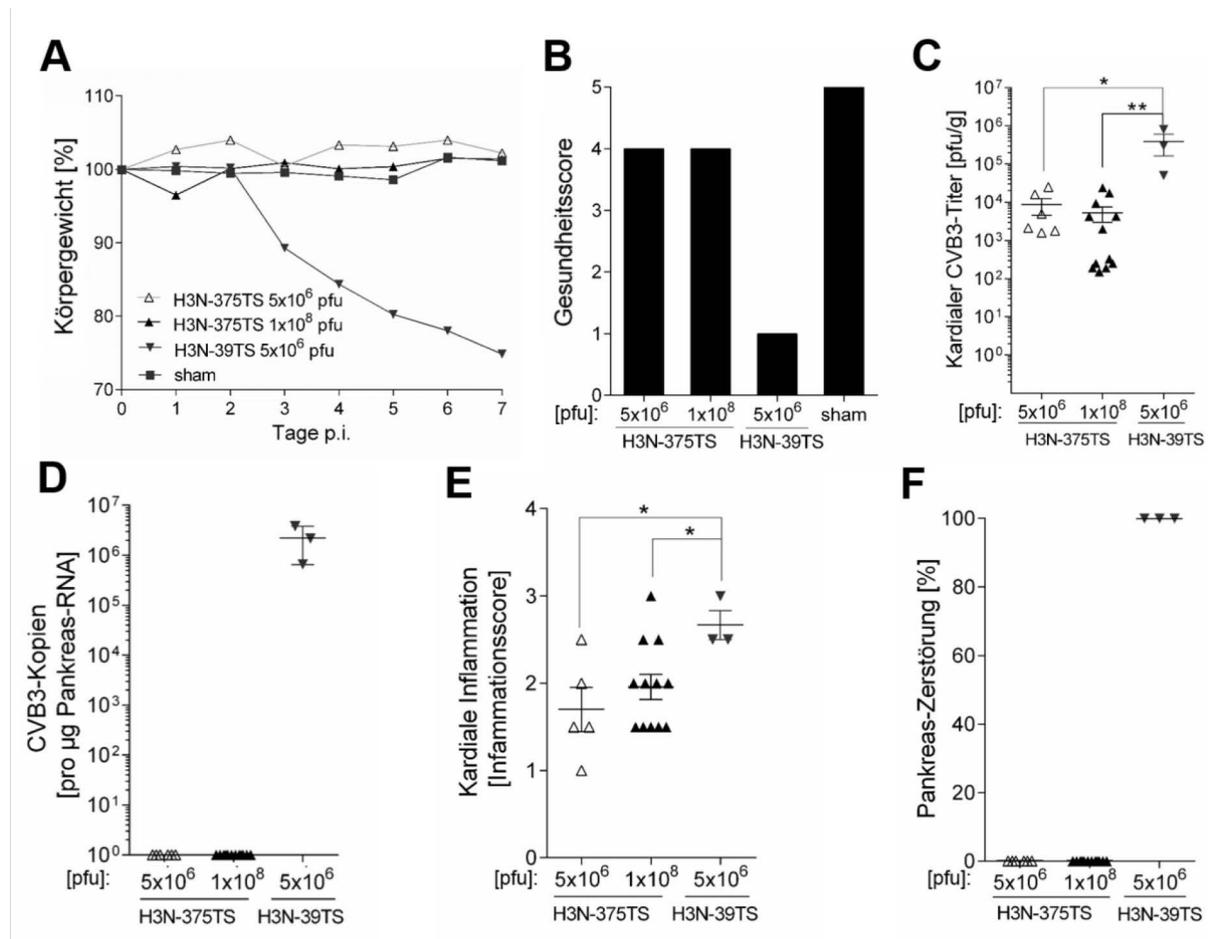


Abbildung 39: Die intravenöse Applikation von H3N-375TS verursacht in Balb/C-Mäusen eine akute Myokarditis, aber keine Pankreatitis.

Balb/C-Mäuse wurden mit 5×10^6 bzw. 1×10^8 pfu H3N-375TS ($n=6$ bzw. 12) oder mit 5×10^6 H3N-39TS ($n=4$) infiziert. Kontrolltieren wurde 0,9 %-ige NaCl-Lösung injiziert ($n=12$). Der Untersuchungszeitraum betrug sieben Tage. (A) Der Gewichtsverlauf wurde täglich überprüft. (B) Der Gesundheitsstatus der Mäuse wurde an Tag sieben nach Infektion anhand eines Gesundheitscores bewertet (0 [klinische Anzeichen einer schweren Infektionskrankheit] -5 [ohne gesundheitliche Einschränkungen]). (C) Die kardialen Titer von H3N-375TS, H3N-39TS und H3N wurden mittels Plaque Assay auf HeLa-Zellen bestimmt, jede Probe wurde als technisches Triplikat analysiert. (D) Aus den Pankreasgeweben wurde die Gesamt-RNA isoliert und mittels qRT-PCR die CVB3-Kopienzahl pro Mikrogramm Pankreas-RNA ermittelt, jede Probe wurde als technisches Triplikat gemessen. (E; F) Herz- und Pankreasgewebe wurden histologisch aufgearbeitet und bezüglich der (E) kardialen Inflammation bzw. (F) pankreatischen Destruktion beurteilt. (E) Kardiale Inflammation bewertet anhand eines Inflammationsscores zwischen 0-4 (0=keine Inflammation, 4= sehr starke Inflammation, Nekrose). (F) Pankreaszerstörung anhand einer Bewertungsskala von 0 (keine Gewebeeränderung) bis 100 % (komplette Organzerstörung). (C-F) Jedes Symbol zeigt den Wert eines Versuchstiers, zusätzlich dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte \pm SEM, * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$. Anmerkung 1: (C) Sechs Tage nach der Infektion verstarb eines der vier mit H3N-39TS infizierten Tiere. Anmerkung 2: (E) Eines der histologischen Schnittpräparate der mit 5×10^6 pfu an H3N-375TS infizierten Mäuse konnte aus technischen Gründen nicht ausgewertet werden.

Die hämodynamischen Messungen der mit H3N-375TS (1×10^8 pfu) infizierten Tiere bzw. den nicht infizierten Kontrolltieren zeigten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Kontraktilität (Abb. 41A) und Relaxation (Abb. 41B) des linken Ventrikels.

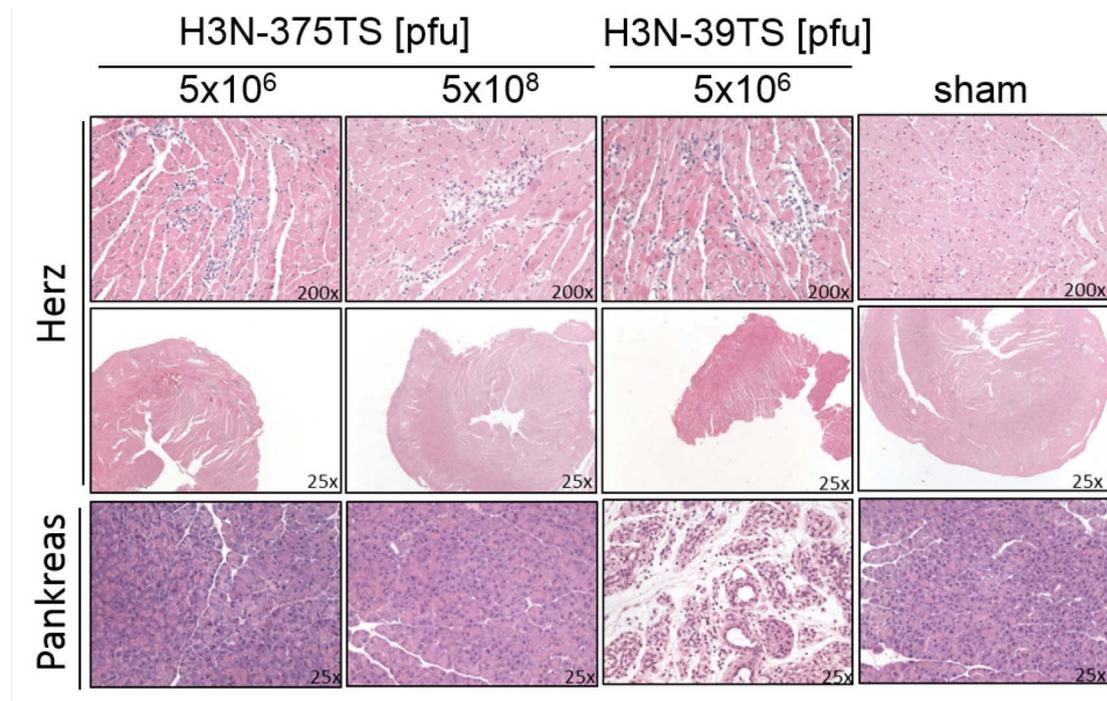


Abbildung 40: Die intravenöse Applikation von H3N-375TS verursacht in Balb/C-Mäusen eine Inflammation im Herzgewebe, nicht aber im Pankreas.

Balb/C-Mäuse wurden mit 5×10^6 bzw. 1×10^8 pfu H3N-375TS ($n=6$ bzw. 12) oder mit 5×10^6 H3N-39TS ($n=4$) infiziert. Kontrolltieren wurde 0,9 %-ige NaCl-Lösung injiziert ($n=12$). Der Untersuchungszeitraum betrug sieben Tage. Herz- und Pankreasgewebe der infizierten NMRI-Mäuse wurde histologisch aufgearbeitet und mittels H&E-Färbung der Querschnitte analysiert. Dargestellt sind repräsentative Färbungen jeder Gruppe. Die Vergrößerung der Herzquerschnitte lag bei 25- und 200-fach, die des Pankreasgewebes bei 200-fach. Anmerkung: Eines der histologischen Schnittpräparate der mit 5×10^6 pfu an H3N-375TS infizierten Mäuse konnte aus technischen Gründen nicht ausgewertet werden.

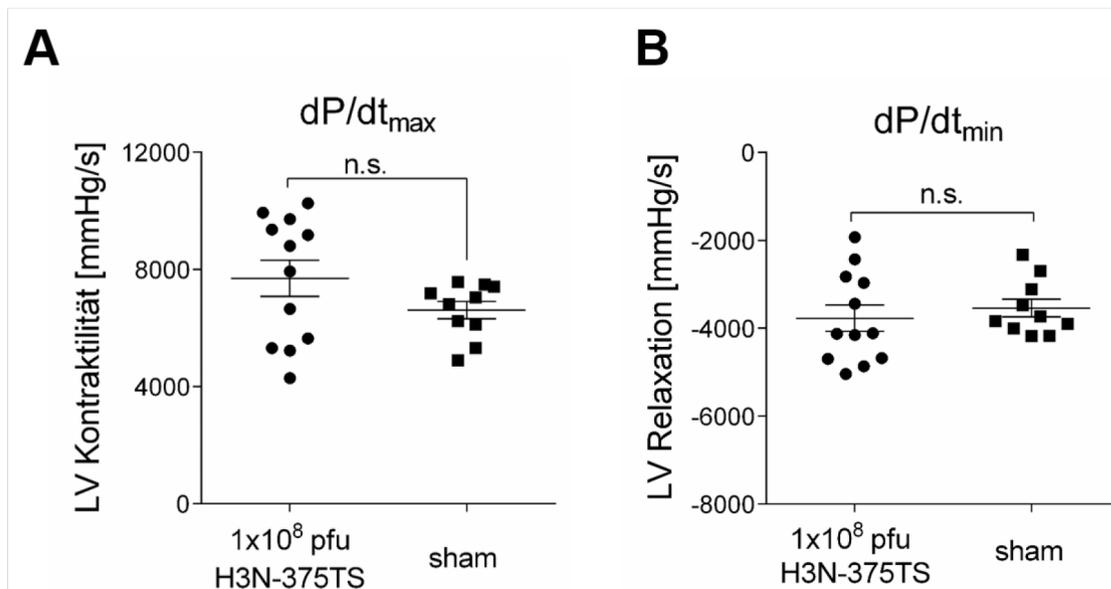


Abbildung 41: Hämodynamische Messungen von intravenös mit H3N-375TS infizierten Balb/C-Mäusen.

Mäuse wurden intravenös mit 1×10^8 pfu H3N-375TS ($n=12$) infiziert oder mit NaCl (sham, $n=10$) behandelt. Hämodynamische Messungen erfolgten sieben Tage nach der Infektion. Die (A) Kontraktilität (dP/dt_{max}) und (B) Relaxation (dP/dt_{min}) des linken Ventrikels (LV) wurden jeweils über einen Zeitraum von 20 min mittels eines Herzkatheters aufgezeichnet. Jedes Symbol zeigt den Wert eines Versuchstiers, zusätzlich dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte \pm SEM. n.s.= nicht signifikant.

4 Diskussion

Das CVB3-Maus-Myokarditismodell gilt als Standardtierversuchsmodell zur Untersuchung virus-induzierter Kardiomyopathien. Dennoch unterscheidet sich die murine Präsenz der CVB3-Infektion von der humanen bezüglich der Schwere der Infektion als auch hinsichtlich des Virustropismus. In experimentellen CVB3-Infektionsstudien mit Mäusen stellt das Pankreas innerhalb des systemischen Krankheitsverlaufes das suzeptibelste Organ für die Infektion dar, in welchem eine verstärkte Replikation des Virus stattfindet^{110,279}. Die infolge der hohen Viruslast ablaufenden pathophysiologischen Prozesse wiederum resultieren in einer extensiven Schädigung des Gewebes. Diese vorhergehende Replikation des Virus im Pankreas wird vielfach als Voraussetzung für die kardiale Infektion und somit für die Entwicklung einer Myokarditis angesehen, wohingegen gegenläufig postuliert wird, dass die Infektion des Pankreas nicht zwingend ausschlaggebend für die kardiale Infektion in Mäusen ist^{95,289}. Trotz der kontrovers diskutierten Bedeutung des Pankreas für die Ausprägung der murinen Myokarditis gibt es im Menschen lediglich vereinzelte Fälle, in denen das Auftreten einer CVB-induzierten Pankreatitis und Myokarditis im gleichen Patienten bestätigt wurde^{290,291}. Frequenter zeigt sich hingegen die Ausprägung CVB-induzierter Kardiomyopathien ohne eine vorhergehende Pankreatitis. Basierend auf diesen klinischen Befunden verläuft die kardiale CVB-Infektion im Menschen mit höherer Wahrscheinlichkeit ohne maßgebliche Beteiligung des Pankreas^{70,75,292}.

Das in der vorliegenden Arbeit etablierte pankreasattenuierte CVB3-Maus-Myokarditismodell ermöglichte es, auf Grundlage einer generierten gentechnisch modifizierten miRNA-375 suszeptiblen CVB3-Variante (H3N-375TS), in NMRI- als auch Balb/C-Mäusen, eine CVB3 induzierte Myokarditis ohne Ausprägung einer Pankreatitis zu induzieren. Die Ergebnisse zeigten, dass sieben Tage nach i.v. Applikation des Virus replizierendes H3N-375TS im Herzen detektierbar war, welches zu einer kardialen Schädigung, der Infiltration mononukleärer Immunzellen sowie zur Induktion verschiedener proinflammatorischer Zytokine im Herzen führte. Bedeutend dabei ist, dass ein i.v. appliziertes Kontrollvirus (H3N-39TS) sowohl das Pankreas als auch das Herz infizierte, was belegt, dass die i.v. Infektion *per se* nicht für die fehlende Pankreasinfektion von H3N-375TS ursächlich war. Diese pathophysiologischen Reaktionen repräsentieren typische Parameter einer akuten Myokarditis. Zudem ermöglichte der Einsatz von H3N-375TS die Etablierung eines 28-tägigen chronischen CVB3-Maus-Myokarditismodells, in welchem die Tiere im Verlauf der Versuchsdauer progressive fibrotische Veränderungen im Herzen aufwiesen. Mehr noch war am Ende der 28-tägigen Versuchsdauer im Herzgewebe der Mäuse persistierende virale RNA, aber kein infektiöses Virus nachweisbar, was typisch für die chronische kardiale CVB3-Infektion in Mäusen ist. Weder im chronischen noch im akuten Modell zeigten mit H3N-375TS infizierte Versuchstiere eine Infektion bzw. Schädigung des Pankreasgewebes. Gegenüber der i.v. Applikation waren nach i.p. Applikation von H3N-375TS weder

das Pankreas noch das Herz infiziert. Dies belegt, dass nach i.p. Applikation von CVB3 die Replikation im Pankreas essentiell für die kardiale CVB3-Infektion ist.

4.1 Evaluierung der miRNAs

Die Erzeugung miRNA-suszeptibler Viren durch die genetische Modifikation des viralen Genoms stellt eine neue, effektive Strategie dar, um gezielt den viralen Gewebs- bzw. Zelltropismus zu regulieren. Über den wirtseigenen Mechanismus der RNAi kommt es zum Abbau der genetisch modifizierten viralen RNA, indem die entsprechende endogen exprimierte miRNA an die in das Virusgenom inserierte miRNA-TS bindet.

Für die Generierung einer pankreasattenuierten CVB3-Variante stellte initial die Auswahl einer geeigneten miRNA einen entscheidenden Faktor dar. Hierfür wurden, unter Verwendung der Affymetrix-miRNA-Chip-Analyse sowie qRT-PCRs, die am stärksten exprimierten miRNAs im murinen Pankreas bestimmt. Dazu zählten die miRNA-375, miRNA-200c, miRNA-690, miRNA-217, miRNA-216a, miRNA-216b, miRNA-200b, and miRNA-200a (**Abb. 16**). Auch die Gruppen um Dixit *et al.* und Endo *et al.* zeigten, dass besagte miRNAs verstärkt im Pankreas von Mäusen bzw. Ratten exprimiert werden^{293,294}. Dagegen sollten diese miRNAs im Herzen fehlen oder möglichst gering exprimiert sein, um dort die Replikation eines mit korrespondierenden miRNA-TS versehenen CVB3 nicht zu inhibieren. Im Vergleich zu den anderen gemessenen miRNAs wurden die miRNA-375 -und 690 im Pankreas am stärksten exprimiert (insbesondere im exokrinen Pankreas). Da die miRNA-375 im Herzen fast um drei log₁₀-Stufen niedriger exprimiert wurde als die miRNA-690 (**Abb. 17**), wurde sie für die weiteren Untersuchungen ausgewählt.

Das Pankreas besteht Großteils aus Azinuszellen (exokrines Pankreas), nur vereinzelt treten Langerhanssche Inseln mit Inselzellen auf, welche das endokrine Pankreas bilden. **Abbildung 42** zeigt den H&E gefärbten Querschnitt murinen Pankreasgewebes und verdeutlicht die morphologische Unterscheidung und Verteilung beider Gewebetypen. Vielfach wurde gezeigt, dass CVB3 in Mäusen primär in Azinuszellen repliziert und diese zerstört, nicht jedoch in den Langerhansschen Inselzellen^{95,185,295,296}. Basierend darauf war es wichtig, dass die zu evaluierenden miRNAs hohe Expressionslevel im exokrinen Pankreas aufwiesen.

Studien der Arbeitsgruppen um Drescher und Bopegamage zeigten jedoch, dass Inselzellen möglicherweise eine Rolle innerhalb der chronischen Mausmyokarditis spielen^{297,298}. Während der akuten Phase der CVB3-Infektion wies ausschließlich das exokrine, nicht jedoch das endokrine Pankreas von i.p. mit CVB3 infizierten Swiss Albino Mäusen Läsionen und nekrotische Veränderungen auf. Immunhistologische Färbungen des Pankreas zeigten wiederum, dass die beiden viralen Antigene VP1 und 3A sowohl im exokrinen als auch im endokrinen Pankreas nachweisbar waren²⁹⁸. Damit einhergehend wurde gezeigt, dass Inselzellen sowohl CAR exprimieren als auch für die Infektion mit CVB3 suszeptibel sind²⁹⁷. Tracy *et al.* kamen zu dem Schluss, dass die Persistenz von CVB3 im Pankreas, entsprechend der Persistenz im Herzen, ebenfalls auf natürlich auftretenden Deletionen am 5'-Ende des

Genoms basiert. Je nach Länge der Deletion wirkten sich diese variierend auf die sekundäre *stem-loop* Struktur aus, gingen jedoch prinzipiell mit einer verlangsamten Replikation und einer Verringerung des zytopathischen Potentials einher²⁹⁹. Dabei adressierten sie den Effekt der pankreatischen CVB-Persistenz auf die Ausbildung einer Typ I Diabetes. In Anbetracht des Nachweises von VP1 in den Inselzellen von Typ I Diabetes Patienten^{54,300} schlussfolgerten sie, dass CVB nach Abklingen der akuten Infektion vermutlich in den Inselzellen persistieren kann²⁹⁹.

Da auch Inselzellen (endokrines Pankreas) CAR exprimieren²⁹⁷, sollte der Schutz des gesamten Pankreas über die Insertion der miRNA-TS gewährleistet werden. Daher sollte auch das endokrine Pankreas die ausgewählte miRNA in verstärktem Maße exprimieren. Neben der geringen Expression der miRNA-375 im Herzen (**Abb.17**), wies sie in beiden Pankreasteilen jeweils die höchsten Expressionslevel auf (**Abb. 16**).

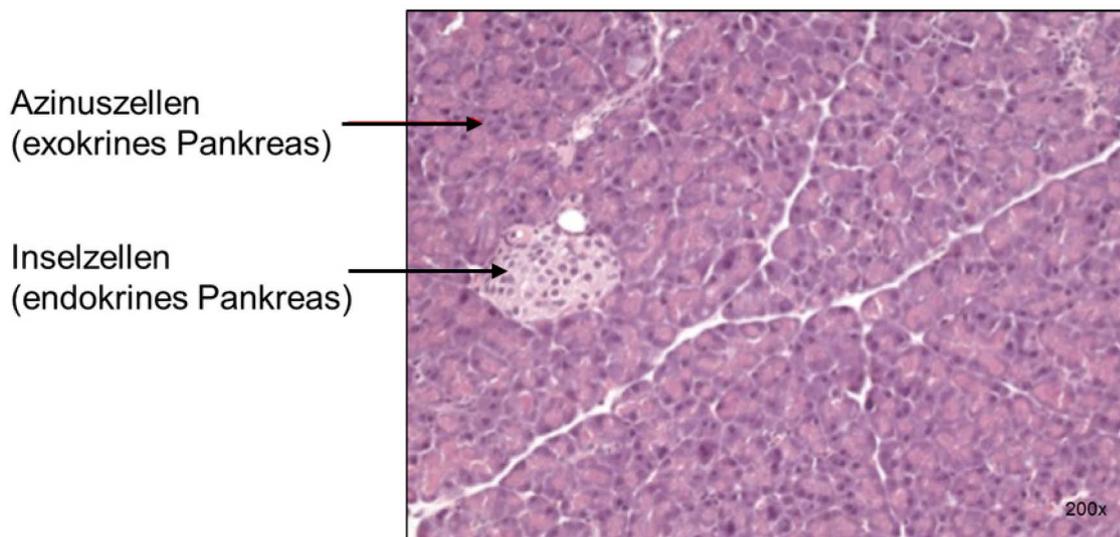


Abbildung 42: Histologisches Präparat des endo- und exokrinen Pankreas.

Pankreasgewebe wurde histologisch aufgearbeitet und mittels H&E-Färbung analysiert. Die mikroskopische Vergrößerung des Pankreasgewebes lag bei 200-fach (vgl. Kapitel 3.16, **Abb. 37D**).

4.2 Einfluss der Insertion von miRNA-TS auf die Replikation und Zytotoxizität von CVB3

Für die Effizienz der miRNA-TS basierten Pankreasattenuation von CVB3 musste zunächst die optimale Insertionsstelle der miRNA-375 in das Genom der CVB3-Variante rCVB3.1 ermittelt werden. Dabei durfte die Insertion die virale Replikation nicht unspezifisch beeinträchtigen und sollte gleichzeitig eine effektive pankreasspezifische CVB3-Attenuierung ermöglichen.

Daher wurden TS für die pankreasspezifische miRNA-375 sowohl in positiver als auch negativer-Orientierung in die 3'-bzw. 5'-Enden des Genoms der CVB3-Variante rCVB3.1 inseriert. Für die nicht in Mäusen exprimierte miRNA-39 wurden die TS nur in positiver-Orientierung in die 3'- bzw. 5'-Enden des CVB3-Genoms inseriert. Auf HeLa-Zellen, welche endogen keine der beiden besagten miRNAs exprimieren, waren die viralen Titer aller rekombinanten CVB3-Varianten mit Modifikationen am 3'-Ende vergleichbar mit dem des unmodifizierten Kontrollvirus rCVB3.1 (Wildtyp). Lediglich der

Virustiter von CVB3-39TS(3+) lag 8 h und 24 h nach Infektion etwa eine \log_{10} -Stufe niedriger als der des Wildtyps. Jedoch erreichte sie 48 h nach Infektion einen Titer, welcher mit denen der anderen CVB3-Varianten mit Modifikationen am 3'-Ende vergleichbar war. Bei den rekombinanten CVB3-Varianten mit Modifikationen am 5'-Ende war der Virustiter des Wildtyps am höchsten, gefolgt von den rekombinanten Varianten CVB3-39TS(5+) und CVB3-375TS(5+). Den niedrigsten Titer wies CVB3-375TS(5-) auf, der etwa eine \log_{10} -Stufe unter dem des Kontrollvirus rCVB3.1 lag (**Abb. 20A-B**).

Die visuelle Beurteilung der Plaquemorphologie der rekombinanten CVB3-Varianten zeigte, dass bis auf CVB3-375TS(5-) alle Varianten etwa gleich große Plaques ausbildeten. Die Plaques von CVB3-375TS(5-) waren deutlich kleiner, was in Anbetracht der ebenfalls verringerten Virustiter ebenfalls auf deren verminderte Replikation zurückführbar ist (**Abb. 20C**). Vermutlich führt die Insertion der miRNA-375TSs in negativer Orientierung in das CVB3-Genom bereits zu einer verlangsamten Replikation, die, wenn sie am 5'-Ende des Protein kodierenden Bereichs erfolgt, zu einer niedrigeren Replikation führt¹⁸³. Da die Insertion der miRNA-TSs am 5'-Ende am Beispiel der CVB3-375TS(5-)-Variante zu einer verringerten CVB3-Replikation führte, wurden für alle folgenden Versuche nur CVB3-Varianten mit Modifikationen am 3'-Ende verwendet. Alle anderen Insertionen von miRNA-TS wurden bezüglich des viralen Replikationsverhaltens von CVB3 toleriert.

Die Insertion der miRNA-375TS bzw. miRNA-39TS in die 3'UTR der CVB3-Variante H3N zeigte keinen Einfluss auf die virale Replikation (**Abb. 30A-B**). Die Plaques der CVB3-Variante H3N bzw. der aus dieser generierten H3N-miRNA-TS-Varianten waren deutlich größer als die der CVB3-Variante rCVB3.1 bzw. der aus dieser generierten CVB3-miRNA-TS-Varianten (**Abb. 30C**). Studien zeigten, dass kardiovirulente CVB3-Varianten, zu denen auch H3N zählt, größere Plaques ausbilden als pankreovirulente bzw. solche, die nur eine geringgradige Myokarditis in Mäusen auslösen, wie es auch für rCVB3.1 beschrieben wurde²⁷⁹. Ursächlich für die unterschiedliche Plaquemorphologie könnte sein, dass kardiovirulente Viren eine stärkere Replikation aufweisen bzw. sich besser an die Wirtszellen adaptiert haben, was zur Steigerung der viralen Fitness beiträgt. Dadurch wird eine größere Virusnachkommenschaft produziert, welche wiederum in der gleichen Zeit eine größere Anzahl neuer Zellen infizieren kann als eine langsamer replizierende Virusvariante. Folglich werden mehr Zellen lysiert, was vermutlich auch in der Bildung größerer Plaques resultiert^{289,301}.

Im Gegensatz zu einigen der in der vorliegenden Arbeit hergestellten CVB3-miRNA-TS-Varianten führte die Infektion mit modifiziertem CVB3, welchem GFP inseriert wurde, zur Ausbildung deutlich kleinerer Plaques. Die Begründung dafür scheint in der Überschreitung der maximal in das Virusgenom inserierbaren Nukleotidmengen zu liegen. Durch die Insertion von GFP kann somit das zu große Genom nicht bzw. nur langsamer in das Virion verpackt werden. Diese Menge an Nukleotiden ist von Virus zu Virus unterschiedlich, sollte aber 30% des viralen Genoms nicht überschreiten^{302,303}. Aus diesem Grund wurden nur drei Tandem-Kopien der miRNA-TSs in das CVB3-Genom inseriert.

4.2.1 Inhibierung von miRNA-375TS enthaltender CVB3-Varianten durch miRNA-375

Bezüglich der miRNA-375TS vermittelten Attenuierung der generierten CVB3-Varianten demonstrierten die *in vitro* Ergebnisse, dass sowohl die Insertion der miRNA-375TS in das 5'-Ende unmittelbar *upstream* der kodierenden Sequenz des VP4, als auch die Insertion unmittelbar *downstream* des Stop-Kodons innerhalb der 3'UTR des viralen Genoms, zu einer effizienten Inhibierung der viralen Replikation führen. *In vivo* konnte gezeigt werden, dass die Insertion der miRNA-375TS in die 3'UTR, eine effektive Suppression der Virusreplikation bewirkt, H3N-Varianten mit miRNA-TS-Insertionen in der 5'UTR wurden nicht getestet. Andere Studien, die ebenfalls Viren mit miRNA-TS ausrüsteten, um die virale Replikation in einzelnen Organen auszuschließen kamen in Bezug auf die Funktionalität der Viren zu ähnlichen Ergebnissen, andere aber auch zu davon abweichenden. So zeigten He *et al.*, dass Insertionen von miRNA-TS für zwei muskelspezifische miRNAs, miRNA-133 und miRNA-206, in die 3'UTR des Virusgenoms nicht durch das Virus toleriert wurden, so dass die modifizierten Viren generell nicht infektiös waren³⁰⁴. Interessanterweise führte die Insertion dieser miRNA-TSs in die 5'UTR des Virusgenoms zur gewünschten Attenuierung³⁰⁴.

Andere Studien zeigten, dass Sequenzinsertionen in das 3'-Ende (3'UTR) des Virusgenoms von Picornaviren besser toleriert werden³⁰⁵. Zudem zeigte die Gruppe um Dunn *et al.*, dass die 5'UTR entscheidend zur Ausprägung des kardiovirulenten Phänotyps innerhalb verschiedener CVB3-Stämme beiträgt³⁰⁶, so dass eine Modifikation in diesem Bereich des Virusgenoms eventuell die natürliche Virulenz negativ beeinflussen könnte.

In einem anderen Fall wurden Mengoviren mit miRNA-TSs ausgestattet. Dabei zeigte sich, dass die generierten vMV24-Varianten, welcher eine miRNA-TS für die miRNA-124 (exprimiert im Zentralnervensystem) in die 5'UTR und je eine miRNA-TS für die miRNA-133 und die miRNA-208- (beide exprimiert im Herzen) in die 3'UTR inseriert wurden, die Virusreplikation spezifisch im Nervengewebe und im Herzen unterdrückte, ohne das virale onkolytische Potential zu beeinträchtigen³⁰⁷. Anhand dieser Beispiele können die miRNA-TSs sowohl in die 3'UTR als auch in die 5'UTR bzw. in Kombination aus beiden, inseriert werden. Vielmehr scheinen der exakte Insertionsort, die ausgewählten miRNAs bzw. miRNA-TSs sowie deren Anzahl einen Einfluss auf die Replikation bzw. Spezifität zu haben.

Um die CVB3-Replikation im Pankreas möglichst stark zu supprimieren, wurden die inserierten miRNA-375TS für den während der Replikation gebildeten CVB3-Minus-RNA-Strang generiert. Der Minus-RNA-Strang, der während der CVB3-Replikation als Matrize für die Synthese neuer Plus-Stränge dient und im akuten CVB3-Infektionsverlauf im Pankreas in einem Verhältnis 1 : 50 (Minus : Plusstrang) vorliegt, sollte dadurch eine 50-fach höhere Suppression im Vergleich zum Plus-mRNA-Strang ermöglichen³⁰⁸.

In der vorliegenden Studie zeigten sich Unterschiede bezüglich der Attenuierungseffektivität zwischen rekombinanten CVB3-Varianten mit der miRNA-375TS-Insertion in positiver- bzw. negativer Orientierung. Lediglich die Replikation von CVB3-375TS(3+) und CVB3-375TS(5+) in Gegenwart der

miRNA-375, nicht jedoch die von CVB3-375TS(3-) bzw. CVB3-375TS(5-), konnten supprimiert werden (**Abb. 43**). Hingegen konnte mit den miRNA-375-Mimics auch die Replikation von CVB3-375TS(3-) bzw. CVB3-375TS(5-) inhibiert werden. MiRNA-Mimics, ähneln strukturell sehr stark siRNAs. Die Inhibierbarkeit der CVB3-Varianten mit negativ orientierten miRNA-375TS-Sequenzen mittels miRNA-375-Mimics basiert darauf, dass beide miRNA-Mimics-Stränge in den RISC-Komplex eingebaut werden können. Bei der miRNA-Prozessierung wird jedoch nur der Leitstrang in den miRISC-AGO2-Komplex eingebaut (**Abb. 5**) und somit wird nur die miRNA-375TS(+)-Sequenz im Plus-RNA-Strang supprimiert^{211,212}.

Mit keinem der Ansätze war es jedoch möglich den CVB3-Minus-RNA-Strang durch miRNA-375 zu inhibieren, da dieser während der Replikation der CVB3-Plus-RNA-Stränge durch den Replikationskomplex abgeschirmt wird^{34,309,310}. Aus diesem Grund wurden für die weiteren Untersuchungen CVB3-Varianten mit den Modifikationen am 3'-Ende mit den TSs in der (+)-Orientierung verwendet.

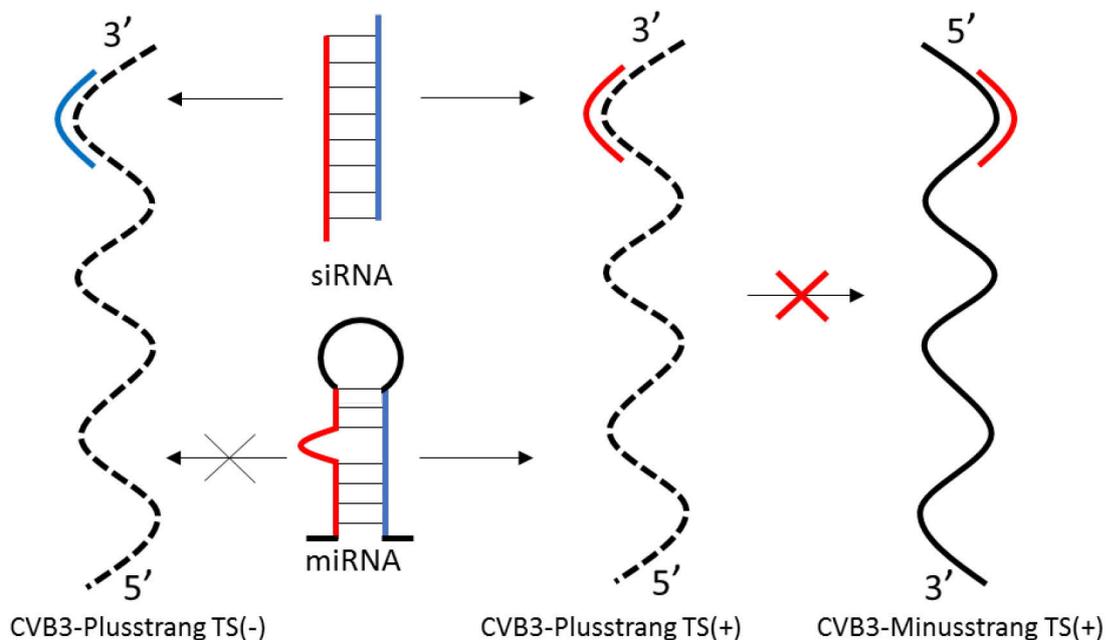


Abbildung 43: Schematische Darstellung der Angriffstellen der miRNA und siRNA.

Mit miRNA-375-Mimics (siRNA) wurden beide CVB3-Plusstränge mit den TSs in der (-) und (+)-Orientierung supprimiert, während die miRNA-375 nur den CVB3-Plusstrang mit den TSs in der (+)-Orientierung inhibierte. Der CVB3-Minusstrang wurde weder von siRNAs noch von miRNAs supprimiert.

Ein weiterer Faktor, der die Effektivität der Attenuierung beeinflusst, ist die Anzahl der inserierten miRNA-TS-Kopien. CVB3 ist aufgrund der 3D-Polymerase, welche keine Korrekturlesefunktion besitzt, stark durch das Auftreten von Mutationen gekennzeichnet, so dass die inserierte miRNA-TS inaktiviert werden könnte. Zum einen minimiert die Mehrfachinsertion von miRNA-TS-Kopien die Wahrscheinlichkeit, dass alle inserierten Sequenzen während der CVB3-Replikation Mutationen unterliegen, zum anderen kann sie den Effekt der Attenuierung verstärken.

In Anbetracht des Sicherheitsfaktors viraler Therapiestrategien verringert die Mehrfachinsertion von miRNA-TS das Risiko der Entstehung von *Escape*-Mutanten. So konnten Heiss *et al.* zeigen, dass die Schädigung des Zentralnervensystems durch mit Insertion mehrerer miRNA-TS-Kopien in neurotrophen Flaviviren deutlich reduziert werden kann. Obwohl bereits die Insertion einer miRNA-TS die Neurovirulenz des Virus verhinderte, erhielt das Virus durch Deletionen bzw. andere Mutationen innerhalb des viralen Genoms schnell seinen ursprünglichen neurovirulenten Phänotyp zurück. Erst durch die Erhöhung der Anzahl inserierter miRNA-TS innerhalb der 3'UTR des Virus konnte dessen neurovirulenter Phänotyp konstant unterbunden werden³¹¹.

Brown *et al.* zeigten, dass die Insertion von vier Tandemkopien einer miRNA-TS am effektivsten zur Suppression der Transgenexpression führt²⁴⁸. Kelly *et al.* zeigten, dass diese Effizienz nicht allein von der Anzahl der miRNA-TS-Kopien, sondern von deren Komplementarität zu der jeweiligen miRNA und deren Expression im Zielgewebe abhängig sind. So führte die Insertion von zwei Tandemkopien bestehend aus je zwei verschiedenen miRNA-TS-Elementen (miRNA-133TS und miRNA-206TS) zur stärkeren Restriktion der Genexpression als die Insertion vier Tandemkopien von nur einer miRNA-TS²⁰³.

Für die Pankreasattenuierung von CVB3 wurden drei vollständig komplementäre miRNA-375TS-Kopien in das virale Genom (3'UTR) inseriert, wodurch die virale Replikation in transient mit miRNA-375 transfizierten Zellkulturen etwa 10- bis 100-fach verringert wurde. In pankreatischen EndoC- β H1-Zellen, welche endogen die miRNA-375 exprimieren, konnte sogar eine 10000-fache Inhibierung beobachtet werden. Damit wurde eine effiziente Attenuierung bereits mit drei miRNA-375TSs erreicht werden.

4.3 Intraperitoneale Injektion von CVB3

4.3.1 rCVB3.1 verursacht keine Myokarditis in NMRI-Mäusen

Die Auswertungen der *in vivo* Experimente, bei denen NMRI-Mäuse mit der CVB3-Variante rCVB3.1 bzw. mit den aus dieser generierten, mittels-TS-modifizierten CVB3-Varianten infiziert wurden, zeigten keinen für CVB3 typischen Infektionsverlauf. Es konnte keine bzw. nur eine sehr geringe virale Replikation im Pankreas- und Herzgewebe nachgewiesen werden (**Abb. 29**).

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde geschlussfolgert, dass die über die aus rCVB3.1 hergestellten miRNA-375TS enthaltenden CVB3-Varianten zu keiner stabilen Induktion der Myokarditis führen würden und folglich ungeeignet für *in vivo* Untersuchungen bzw. für die Etablierung eines pankreasattenuierten CVB3-Maus-Myokarditismodells wären. Dieser Befund steht im Einklang mit den Daten von Slifka *et al.*, welche rCVB3.1 entwickelten und zeigten, dass die Infektion von Mäusen mit dieser CVB3-Variante eine mittelgradige Pankreatitis auslöste, jedoch eine wenig stark ausgeprägte Myokarditis verursachte²⁷⁹. Das für die Herstellung von rCVB3.1 verwendete pMKS1-Plasmid enthält das komplette Genom des kardiotropen CVB3-H3²⁸¹, in welches eine *Sfi*I- und 3C/3CD^{Pro}-Schnittstellen am 5'Ende der Proteinkodierenden Bereich des Virus inseriert wurden. Ein

Sequenzvergleich der cDNAs von rCVB3.1 und des kardiotropen CVB3 H3, welches für die Herstellung von rCVB3.1 als parentales Virus verwendet wurde, zeigte, dass bis auf die *Sfi*I -und 3C/3CD^{Pro}-Schnittstellen eine vollständige Sequenzübereinstimmung beider Virusgenome vorlag.

H3 : MGA QVS T... (Knowlton *et al.*²⁸¹)

rCVB3.1 : MGA GGA GGG GAL FQG A QV ST... (Slifka *et al.*²⁷⁹)

Mit der blauen Markierung wurde der Bereich gekennzeichnet, welcher die eingefügte *Sfi*I -und 3C/3CD^{Pro}-Schnittstellen enthielt.

Da der kodierende 5'-Bereich wichtig für die virale Replikation ist wird vermutet, dass die Insertion der *Sfi*I -und 3C/3CD^{Pro}-Schnittstellen mit 39 zusätzlichen Nukleotiden die Ursache für die geringe *in vivo* Replikation des CVB3 aus dem pMKS1-Plasmid sein könnte^{183,312,313}.

Im Gegensatz zu rCVB3.1 zeigte CVB3-H3 *in vivo* ein effektives Replikationsverhalten und einen typischen CVB3-Infektionsverlauf mit Entstehung einer starken Pankreatitis und Myokarditis (**Abb. 29A-E**). Bezüglich ihrer pathophysiologischen Präsenz entspricht die verwendete CVB3-Variante CVB3-H3 der hoch kardiotropen, herzpassagierten H3-Woodruff-Variante²⁸¹.

Basierend darauf, sowie in Anbetracht der Ergebnisse der *in vitro* Versuche, wurden für die *in vivo* Experimente ausschließlich rekombinante H3-Varianten (H3N, H3N-375TS und H3N-39TS) mit Modifikationen am 3'-Ende verwendet, denen die miRNA-TS in positiver Orientierung inseriert wurden.

4.3.2 H3N induziert eine Myokarditis nach i.v. Applikation in NMRI-Mäuse

Mit den neugenerierten CVB3-Varianten H3N (Wildtyp), H3N-39TS (Kontrolle zur Spezifität der miRNA-TS) und H3N-375TS wurden NMRI-Mäuse i.p. mit einer Dosis von 10⁵ pfu infiziert. Die beiden CVB3-Varianten H3N und H3N-39TS, nicht jedoch H3N-375TS, verursachten einen typischen Verlauf einer CVB3-Infektion mit einhergehender Gewichtsreduktion und eingeschränktem Gesundheitszustand. Es wurde erwartet, dass Mäuse, welche i.p. mit H3N bzw. H3N-39TS infiziert wurden, sowohl im Herzen als auch im Pankreas hohe Virustiter aufweisen, wohingegen für H3N-375TS infizierte Mäuse keine oder lediglich geringe Virustiter im Pankreas, aber hohe Virustiter in dem Herz erwartet wurden. Die Messung der Viruslast in den Gewebeproben sowie die histologischen Untersuchungen bestätigten, dass die Infektion mit H3N bzw. mit H3N-39TS zu hohen kardialen und pankreatischen CVB3-Titern führte. Die mit H3N-375TS infizierten Tiere wiesen entsprechend der miRNA-375 vermittelten Attenuierung eine sehr geringe CVB3-Kopienzahl im Pankreas auf, doch entgegen der Erwartungen konnte auch im Herzen nur ein geringer Virustiter nachgewiesen werden (**Abb. 31C-D**). Wie bereits mehrfach erwähnt, wurde die Rolle des Pankreas für die Entwicklung der CVB3 induzierten Myokarditis im Mausmodell kontrovers diskutiert.

Kallewaard *et al.* entwickelten ein Maus-*Knockout*-Modell, bei dem CAR in den für die Pathogenese von CVB3 wichtigen Organen, Herz (Hrt-KO) bzw. Pankreas (Panc-KO), deletiert wurde. Bei den mit CVB3-H3 infizierten Panc-KO-Mäusen wurde im Pankreas ein drei log₁₀-Stufen niedrigerer Virustiter

als bei den Kontrolltieren detektiert. Der Virustiter im Herzen war jedoch nur eine \log_{10} -Stufe niedriger, woraus geschlossen wurde, dass die CVB3-Infektion des Pankreas keinen großen Einfluss auf die Infektion des Herzens besitzt. Der direkte *Knockout* von CAR im Herzen hingegen zeigte eine stärkere Auswirkung auf die kardialen CVB3-Titer, da dieser in den mit CVB3-H3 infizierten Hrt-KO-Mäusen zwei \log_{10} -Stufen unter denen der Kontrollgruppe lag. Damit vergleichbare Ergebnisse zeigte der kombinierte *Knockout* von CAR in Herz und Pankreas und unterstützt damit die Vermutung, dass weniger die Replikation von CVB3 im Pankreas ausschlaggebend für die kardialen CVB3-Titer ist, als vielmehr die Expression von CAR im Herzen²⁸⁹.

Damit einhergehend zeigten die Befunde von Gomez *et al.*, welche in einer Studie Balb/C-Mäuse entweder mit einer pankreovirulenten bzw. mit einer kardiovirulenten CVB3-Variante i.p. infizierten, dass trotz ähnlich hoher CVB3-Titer im Pankreas nur die kardiovirulente CVB3-Variante eine Myokarditis induzierte. Ein hoher CVB3-Titer im Pankreas wäre demnach kein Indikator dafür, dass eine Myokarditis induziert wird²⁹⁵. Auch in NMRI-Mäusen konnte gezeigt werden, dass das Pankreas eine Rolle während der primären Replikation in CVB3-infizierten NMRI-Mäusen spielt, die virale Vermehrung im Pankreas jedoch nicht zwingend erforderlich zu sein scheint, um eine akute und/ oder chronische Myokarditis zu entwickeln¹¹⁵. Dementgegen stehen die Befunde von Tracy *et al.*, die zeigten, dass kardiovirulente CVB3-Stämme keine Myokarditis ohne eine vorhergehende Pankreatitis verursachen können. Dafür verwendeten sie neun sich genotypisch unterscheidende CVB3-Stämme, von denen einer avirulent für Herz und Pankreas war, acht der neun Stämme eine Pankreatitis (pankreovirulent) verursachten und von diesen acht wiederum lediglich drei eine Myokarditis (kardiovirulent) verursachten. Die Studie zeigte, dass alle i.p. applizierten Stämme während der achttägigen Versuchsdauer effizient im Pankreas replizierten, die kardiovirulenten Stämme jedoch tendenziell höhere Titer und eine längere Persistenz im Serum, im Pankreas und im Herzen aufwiesen als die nicht kardiovirulente Stämme. In der gleichen Studie zeigten sie *in vitro*, dass die kardiovirulenten Stämme höhere Virustiter erreichten als die nicht kardiovirulenten⁹⁵.

In einer weiteren Untersuchung zeigten Leipner *et al.*, dass 24 h nach i.p. Injektion des kardiovirulenten CVB3-Wildtyps in Balb/C -und C57BL/6-Mäusen lediglich im Blutserum, der Milz, dem Pankreas und dem mesenterialen Lymphsystem CVB3-Titer nachweisbar waren. Das deutet daraufhin, dass in der frühen Phase die CVB3-Infektion des Pankreas nötig ist und sich von dort ausgehend auf das Herz ausbreitet¹¹⁸. Demzufolge scheint bei i.p. Applikation von CVB3 das Fehlen der pankreatischen H3N-375TS Infektion ursächlich für die fehlende Infektion des Herzens mit CVB3 zu sein, so dass hier die pankreatische Infektion essentiell für die kardiale Infektion ist.

Darüber hinaus zeigen unsere Ergebnisse, dass die auf dem Mechanismus der RNAi basierende Strategie der Pankreasattenuation mittels H3N-375TS im Vergleich zu dem beschriebenen CAR-KO-Maus-Modell hocheffizient ist, da nahezu in allen untersuchten Tieren H3N-375TS im Pankreas nicht mehr detektiert werden konnte, während in Panc-KO-Mäusen die CVB3 Titer bei 1×10^4 pfu/g lagen²⁸⁹.

Zudem soll erwähnt werden, dass die miRNA-39TS-Insertion tendenziell einen, wenn auch nicht signifikanten, Einfluss auf die CVB3-Replikation zu haben scheint, da die Titer von H3N-39TS sowohl im Pankreas als auch im Herzen jeweils um ca. eine log₁₀-Stufe niedriger als die von H3N ausfielen. Auch die kardiale Inflammation sowie die Pankreaszerstörung war bei H3N-39TS geringer als bei H3N, was aus den geringeren Virustitern resultieren könnte (**Abb. 31C-F**).

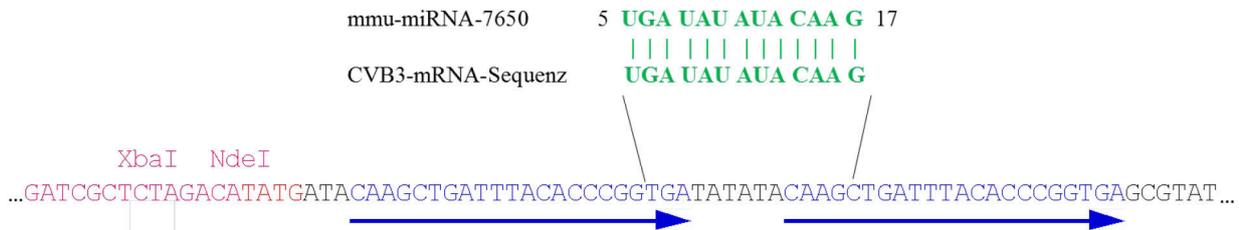


Abbildung 44: Schematische Darstellung der miRNA-7650-Angriffsstelle im CVB3-Genom.

Die grün markierten Stellen symbolisieren die Angriffsstelle der miRNA-7650 im CVB3-Genom. Mit den blauen Pfeilen sind die miRNA-39TSs dargestellt zwischen denen sich jeweils 6 bp lange *Spacer*-Sequenzen befinden. Angriffstelle der miRNA-7650, welche über 13 Nukleotide komplementär zum CVB3-Genom ist (grün).

Eine mögliche Ursache hierfür könnte eine unbeabsichtigt generierte Angriffsstelle für die miRNA-7650, welche ebenfalls im murinen Organismus exprimiert wird³¹⁴ und sich zwischen der ersten und zweiten miRNA-39TSs befindet (bei allen CVB3-Varianten mit miRNA-39TSs), sein (**Abb. 44**). In der Literatur finden sich keine Aussagen über die miRNA7650 bzw. über deren Expression im Pankreas, sodass diese Hypothese spekulativ ist und einer experimentellen Überprüfung bedarf.

Dennoch konnte sowohl mit H3N als auch mit H3N-39TS erfolgreich eine Myokarditis induziert werden, was belegt, dass die miRNA-Insertion *per se* die Infektiosität von CVB3 in den Mäusen nicht verhindert, sondern die ausbleibende Infektion des Pankreas mit H3N-375TS spezifisch auf die miRNA-375TS zurückzuführen ist. Innerhalb der i.p. Applikationsroute könnte somit die fehlende CVB3-Replikation im Pankreas von H3N-375TS ursächlich für den geringen Virustiter im Herzen und die dadurch ausbleibende Infektion des Herzens sein.

4.4 Intravenöse Injektion von CVB3

Basierend auf der Hypothese, dass CVB3 im Pankreas repliziert und sich anschließend über die Blutbahn systemisch ausbreitet und so das Herz infiziert¹¹⁸, konnten Freiberg *et al.* über die i.v. Applikation von CVB3 die virämische Ausbreitung des Virus nachahmen und so eine Infektion des Herzens und/oder die Ausbildung einer Myokarditis verursachen. Doch auch diese Strategie resultierte in der Infektion und letztlich der Zerstörung des Pankreasgewebes³¹⁵.

In der vorliegenden Arbeit wurde die pankreasattenuierte CVB3-Variante H3N-375TS i.v. in die linke *Vena jugularis* injiziert, um eine sofortige hämatogene Ausbreitung auszulösen und direkt das Herz zu infizieren. Zudem sollte überprüft werden, ob H3N-375TS, dessen Replikation im Pankreas stark supprimiert ist, nach i.v. Applikation eine Myokarditis induzieren kann.

4.4.1 Intravenöse Injektion von H3N-375TS verursacht eine Myokarditis

Da keine Erfahrungswerte vorlagen musste mit dem Ändern der Applikationsroute auf i.v. zunächst eine für die Infektion geeignete Infektionsdosis ermittelt werden. Mit steigender Dosis (Kapitel 3.14) von H3N-375TS (5×10^4 , 5×10^5 bzw. 5×10^6 pfu) stieg der Virustiter im Herzen an (**Abb. 33C**). Entsprechend stieg auch der kardiale Inflammationsscore und lag bei der höchsten Virusdosis im Mittel bei einem Wert von 0,7. Im Vergleich dazu resultierte die i.p. Applikation von H3N-39TS (1×10^5 pfu) in einem höheren kardialen Inflammationsscore von 1,3.

Dieser Versuch zeigte erstmals, dass durch die i.v. Applikation von H3N-375TS, auch ohne die vorherige CVB3-Replikation im Pankreas, eine Myokarditis induziert werden kann. Dies wiederum bedeutet, dass entgegen der Hypothese von Tracy „*keine Myokarditis ohne Pankreatitis*“⁹⁵ innerhalb der i.v. Applikation die Kardiovirulenz demnach nicht zwangsläufig die Replikation des Virus im Pankreas erfordert. Basierend auf diesem Befund scheinen sich die primäre pankreatische Replikation von i.p. injiziertem CVB3 und die dadurch verursachte Virämie entscheidend auf die kardiale CVB3-Infektion und somit auf die Ausprägung der Myokarditis auszuwirken.

Bei der i.v. Injektion von H3N-375TS wurden, wie erwartet, keine CVB3-Kopien im Pankreas infizierter Mäuse nachgewiesen. Auch die pathohistologischen Untersuchungen zeigten keine Infektionsherde oder Läsionen im Pankreas (**Abb. 33E**). Dies bestätigt auch der Gewichtsverlauf der NMRI-Mäuse über die siebentägige Versuchszeit, da in keinem der mit H3N-375TS infizierten Tiere eine Gewichtsreduktion festgestellt werden konnte (**Abb. 33A**). Damit übereinstimmend wurde der allgemeine Gesundheitszustand der infizierten Mäuse mit einem Score von 4-4,5 bewertet, was ebenfalls bestätigt, dass die Tiere nahezu klinisch unauffällig waren.

Die Daten zeigen, dass die mit pankreasattenuiertem H3N-375TS infizierten Mäuse keine pankreatische, jedoch eine stark ausgeprägte kardiale Inflammation aufwiesen, die in Ihrer Ausprägung ähnlich der des nicht-pankreasattenuierten Kontrollvirus war, welches sowohl im Pankreas als auch im Herzen replizierte. Dieser Befund deutete darauf hin, dass die pankreatische Virusreplikation infolge der i.v. Applikation die kardiale Infektion nicht wesentlich beeinflusst.

4.4.2 Vergleich der intraperitonealen und intravenösen Applikationsrouten

Bezüglich der kardialen Infektion sowie der Ausbildung der Myokarditis weisen das pankreasattenuierte CVB3-Maus-Myokarditismodell und das klassische CVB3-Maus-Myokarditismodell, bei dem vollständig aktives CVB3 verwendet wird, starke Ähnlichkeiten auf. Dennoch existieren auch Unterschiede. Diese beziehen sich weniger auf die Qualität der Infektion als vielmehr auf deren Quantität. So resultierte die i.v. Applikation von H3N-375TS trotz einer 50-fach höheren initial applizierten Virusdosis in ca. 1000-fach geringeren kardialen Virustitern im Vergleich zur i.p. Applikation des nicht modifizierten H3N. Zwei Befunde bestätigen, dass die geringe kardiale Viruslast nach i.v. Applikation nicht Resultat einer miRNA-375-vermittelten Attenuierung von H3N-375TS im Herzen ist. Zum einen wurde die miRNA-375 Expression im Herzen als sehr gering validiert, zum

anderen wies die nicht über miRNA-375 attenuierbare H3N-39TS CVB3-Variante vergleichbar niedrigere kardiale CVB3-Titer nach i.v. Applikation auf. Bei der i.p. Applikation repliziert Wildtyp-CVB3 zunächst über mehrere Tage im Pankreas. Dort werden große Mengen an CVB3 generiert, die in die Blutbahn gelangen, sodass das Herz frequent mit einer hohen Viruslast konfrontiert ist, was wiederum infolge der kardialen Infektion zu hohen CVB3-Titern im Herzen führt^{95,118}. Dementgegen erfolgt die Infektion des Herzens bei der i.v. Injektion des pankreasattenuierten H3N-375TS ausschließlich über eine zeitlich limitierte Aufnahme des einmalig in die Blutbahn injizierten Virus. Zudem unterstützt die Tatsache, dass auch die Erhöhung der i.v. injizierten H3N-375TS Dosis von 5×10^6 pfu auf 1×10^8 pfu nicht zu höheren kardialen Titern führte die Vermutung, dass eine Aufnahmekapazität, eine obere Grenze für das Infektionspotential des Virus, infolge der einmaligen i.v. Injektion besteht. In der Blutbahn befindet sich eine Vielzahl zellulärer Komponenten des Immunsystems, so dass es zu einer schnellen Aktivierung der angeborenen Immunantwort kommt. Infolge der Immunreaktion werden unter anderem proinflammatorische Chemo- und Zytokine wie IL-1, IL-6, TNF α bzw. Typ I und II IFN aus Makrophagen und Monozyten unmittelbar in den Blutstrom freigesetzt. Dies wiederum könnte mitunter zur rapiden chemotaktischen Anlockung weiterer Immunzellen wie NK-Zellen bzw. aktivierter T-Zellen führen und so zu einer schnellen Elimination viraler Pathogene beitragen. Folglich deuten die Ergebnisse daraufhin, dass die fehlende Pankreasreplikation innerhalb der i.v. Applikation ursächlich für die geringeren kardialen CVB3-Titer sein könnte.

Mehrere Studien zeigten, dass niedrigere kardiale CVB3-Titer zu einer weniger stark ausgeprägten akuten Myokarditis führten. Die Versuche von Tracy *et al.* verdeutlichten die Auswirkungen des natürlichen Virulenzphänotyps verschiedener CVB3-Varianten auf die Virustiter in Herz und Pankreas bzw. auf die Ausprägung der Myokarditis⁹⁵. Horwith *et al.* beobachteten, dass CVB3 infizierte transgenen Mäuse, welche in ihren pankreatischen Zellen verstärkt IFN γ exprimierten, geringere kardiale Virustiter besaßen und seltener eine CVB3 induzierte Myokarditis ausprägten. Sie schlussfolgerten, dass die frühzeitige Eliminierung der Virämie die Schädigung des Herzens minimiert und auch die Wahrscheinlichkeit einer CVB3 induzierten autoimmunen Myokarditis reduziert³¹⁶. Entsprechend dieser Erwartungen zeigten auch die in der vorliegenden Studie verwendeten Balb/C-Mäuse, dass die aus der i.v. Applikation von H3N-375TS resultierenden geringeren kardialen Virustiter mit der verringerten Ausprägung der kardialen Inflammation bzw. der weniger gravierenden Verschlechterung des Gesundheitsstaus der Mäuse korrelierten.

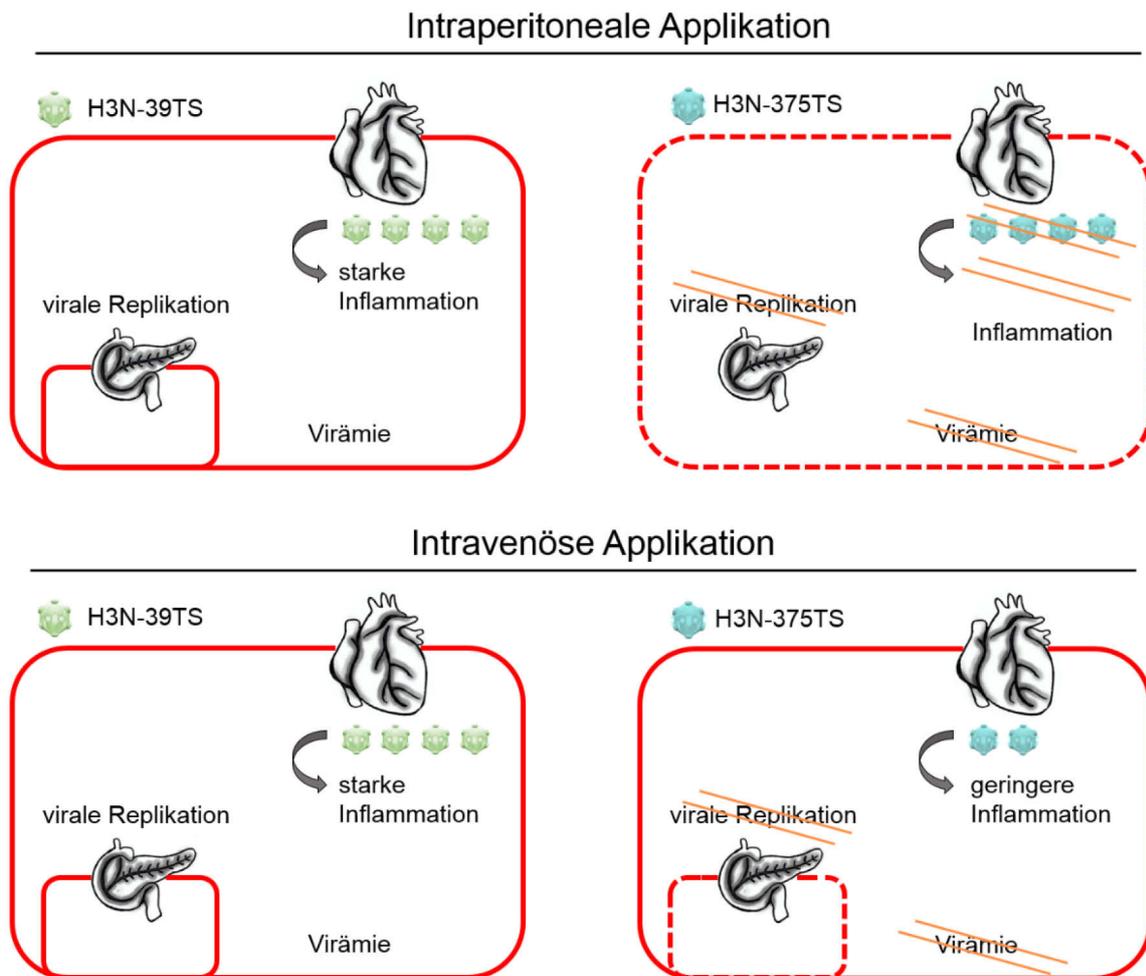


Abbildung 45: Schematische Darstellung des Infektionsverlaufes von pankreasattenuiertem und nicht-pankreasattenuiertem H3N in Abhängigkeit von der Applikationsroute.

Dargestellt sind das Ausmaß der pankreatischen Replikation, Virämie und der resultierenden kardialen Inflammation nach intraperitonealer und intravenöser Applikation von pankreasattenuiertem H3N (H3N-375TS) und nicht pankreasattenuiertem H3N (H3N-39TS). Die roten Linien symbolisieren den Blutkreislauf, die orangefarbenen Querstriche verdeutlichen das Ausbleiben des jeweiligen betrachteten virologischen/pathophysiologischen Aspektes.

Abbildung 45 zeigt zusammenfassend den Infektionsverlauf von pankreasattenuiertem H3N-375TS und nicht-pankreasattenuiertem H3N-39TS in Abhängigkeit der i.v. und i.p. Applikationsroute. Bei der i.p. Applikation von H3N-375TS wurde dieses im Pankreas komplett supprimiert, konnte daher nicht in den Blutkreislauf gelangen (gestrichelte Linie) und folglich keine kardiale Infektion auslösen. Dagegen replizierte das i.p. injizierte Kontrollvirus H3N-39TS im Pankreas, gelangte über die Blutbahn in das Herz und verursachte eine Myokarditis. Demnach ist bei der i.p. Applikationsroute die CVB3-Replikation im Pankreas essentiell für die Auslösung einer Myokarditis. Nach i.v. Applikation induzierten sowohl H3N-39TS als auch H3N-375TS eine Myokarditis. Die H3N-375TS-Variante wurde auch nach i.v. Applikation im Pankreas supprimiert, konnte jedoch durch die direkte Injektion des Virus in den Blutkreislauf das Herz infizieren. Dennoch unterschieden sich H3N-39TS und H3N-375TS signifikant bezüglich ihrer kardialen Titer sowie der von ihnen ausgelösten kardialen Inflammation voneinander. Bei der gleichen initialen Viruslast lagen beide Parameter bei der pankreasattenuierten

H3N-375TS-Variante deutlich niedriger. Die Bestimmung der viralen Titer im Herzen erfolgte sieben Tage nach Infektion. Innerhalb dieses Zeitraums gelangte das nicht-pankreasattenuierte H3N-39TS infolge der systemischen Ausbreitung über die Blutbahn in das Pankreas, wo es stark replizierte. Von dort aus gelangte wiederholt H3N-39TS über die Blutbahn zurück zum Herzen. Das pankreasattenuierte H3N-375TS hingegen replizierte nicht im Pankreas, so dass vermutlich die Viruslast im Blutstrom und folglich die im Herzen geringer war als die von H3N-39TS.

4.4.3 Vergleich des H3N-375TS-Myokarditismodells in NMRI -und Balb/C-Mäusen

Für das akute CVB3-Maus-Myokarditismodell zeigten sich die Inzucht-Mausstämme wie Balb/C und C57BL/6 (Black6) als besonders geeignet, da beide eine akute Myokarditis entwickeln^{108,287}. Da CVB3 jedoch im Herzgewebe von Balb/C-Mäusen im Vergleich zu C57BL/6 -Mäusen langsamer eliminiert wird, wurden in der vorliegenden Studie Balb/C-Mäuse für das akute CVB3-Maus-Myokarditismodell verwendet¹¹⁸. Ähnlich wie in dem in Kapitel 3.15 beschriebenen Versuchsaufbau wurden Balb/C-Mäuse i.v. mit H3N-375TS bzw. H3N-39TS mit einer Dosis von 5×10^6 pfu bzw. H3N-375TS mit 1×10^8 pfu infiziert. Der wohl markanteste Unterschied bei der i.v. CVB3-Infektion zwischen NMRI-und Balb/C-Mäusen wurde anhand der Gewichtskurven sowie der Beurteilung des allgemeinen Gesundheitszustands deutlich. NMRI-Mäuse verloren über den siebentägigen Versuchszeitraum sowohl nach Infektion mit H3N-375TS als auch mit H3N-39TS kein Körpergewicht. Balb/C-Mäuse hingegen nahmen ab dem zweiten Tag nach Infektion mit H3N-39TS stetig ab und verloren insgesamt über 20% Körpergewicht. Bei den mit H3N-375TS infizierten Mäusen konnte, wie bereits bei den NMRI-Mäusen, keine Gewichtsreduktion beobachtet werden (**Abb. 39A**). In beiden Mausstämmen führte, unabhängig von der Gewichtsabnahme, die Infektion mit H3N-39TS zu einer nahezu kompletten Zerstörung des Pankreas. Der höchste in Balb/C-Mäusen ermittelte kardiale H3N-39TS-Titer (1×10^6 pfu/g) war mit dem i.p. infizierter NMRI-Mäuse vergleichbar, lag aber deutlich über dem i.v. infizierter NMRI-Mäuse (1×10^4 pfu/g). Zudem war der in mit H3N-39TS infizierten Balb/C-Mäusen ermittelte durchschnittliche Inflammationsscore von 2,7 der höchste Grad der Inflammation, der innerhalb dieser Studie erreicht wurde. Der Anstieg dieser beiden Parameter infolge der Infektion mit H3N-39TS im Vergleich zu den mit H3N-375TS infizierten Gruppen bestätigt die Annahme, dass die CVB3-Replikation im Pankreas als eine Art „Booster“ wirkt, der die nötige Virämie generiert, welche zu höheren kardialen CVB3-Titern und der Inflammation im Herzen führt. In den gleichermaßen i.v. infizierten NMRI-Mäusen konnte keine adäquate Reflektion der kardialen CVB3-Titer in der Ausprägung der Myokarditis festgestellt werden. Unterschiede zwischen den beiden Mausstämmen bezüglich der CVB3-Suszeptibilität und folglich der Ausprägung der Myokarditis könnten ursächlich für diese Beobachtungen sein. Bei näherer Betrachtung der CVB3-Titer im Herzen, der CVB3-Kopien im Pankreas, der Pankreaszerstörung sowie der kardialen Inflammationsscores einzelner Tiere innerhalb einer Gruppe wird ersichtlich, dass es eine starke Streuung gab, welche auf die Heterogenität der NMRI-Mäuse zurückführbar sein könnte. Die Gewichtsunterschiede zwischen NMRI-Mäusen innerhalb einer Gruppe betragen fast 16%, bei Balb/C-

Mäusen war es dagegen nur 5%. Im Durchschnitt waren die NMRI-Mäuse 33% schwerer als Balb/C-Mäuse, so dass sich bei einer initialen Virusdosis von 5×10^6 pfu für NMRI-Mäuse eine Viruslast von $1,8 \times 10^5$ pfu/g Körpergewicht und bei den Balb/C-Mäusen $2,8 \times 10^5$ pfu/g Körpergewicht ergab. Trotz der Gewichtsunterschiede wurde allen Mäusen die gleiche Virusdosis verabreicht, was zu einer unterschiedlichen Kompensation bzw. Ausprägung der Infektion führen kann. So zeigte die Gruppe um Li *et al.* anhand von C57BL/6-Mäusen, dass sich das initiale Körpergewicht in Kombination mit der initial eingesetzten CVB3-Dosis entscheidend auf die Entstehung bzw. die Präsenz der viralen Myokarditis auswirkte¹¹⁹. Weisen Inzuchtlinien nur geringe Unterschiede bezüglich des Körpergewichtes auf, unterscheidet es sich bei Auszuchtstämmen wie dem NMRI-Stamm gravierend, da die Variationen hier bis zu einem Drittel bzw. Viertel des Gesamtkörpergewichtes ausmachen können. Die Verwendung einer auf das Körpergewicht der Versuchstiere angepassten Virusdosis könnte demnach zu einer verringerten Streuung besagter Inflammations- bzw. Infektionsparameter beitragen.

Die erhöhte Suszeptibilität von Balb/C-Mäusen gegenüber der H3N-39TS-Infektion zeigte sich auch in der Bewertung des allgemeinen Gesundheitsstatus mit einem sehr niedrigen Wert von 1 (**Abb. 39B**), wohingegen gleichermaßen i.v. infizierte NMRI-Mäuse einen Wert von 3 aufwiesen (**Abb. 34B**). Im Laufe der Versuchsdauer veränderten die Balb/C-Mäuse ihre Physionomie (struppiges Fell), das Fressverhalten und waren in ihrer Bewegung stark eingeschränkt, was auf die stark ausgeprägte Pankreatitis zurückführbar scheint. Bei den mit H3N-375TS infizierten Balb/C-Mäusen lag der allgemeine Gesundheitsstatus hingegen bei einem Wert von 4, das Pankreas blieb unbeschädigt.

Diese Befunde decken sich mit Beobachtungen der Gruppe um Zhang *et al.*, in denen CVB3 infizierte SWR-Mäuse sich trotz gleicher initial applizierter CVB3-Dosis aktiver als Balb/C-Mäuse verhielten. Zudem wiesen die SWR-Mäuse, verglichen mit den Balb/C-Mäusen, eine geringere Letalität auf. Interessanter Weise konnte jedoch in den SWR-Mäusen eine stärker ausgeprägte Myokarditis als in den Balb/C-Mäusen induziert werden, wengleich sich der allgemeine Gesundheitszustand der SWR-Mäuse nur minimal änderte. Die Grundlage hierfür sahen Zhang *et al.* in der unterschiedlichen Ausprägung der Immunantwort beider Mausstämmen auf die CVB3-Infektion³⁰¹.

Tracy *et al.* zeigten, dass verschiedene kardiovirulente CVB3-Stämme (CVB3 AS und ZU) in A/J bzw. C3H/HeJ-Mäusen gleichermaßen zu einer massiven Zerstörung der pankreatischen Azinuszellen führten, jedoch war der Gesundheitszustand der A/J-Mäuse im Vergleich zur C3H/HeJ-Mäusen deutlich schlechter. Somit schlussfolgerten auch sie, dass es immunologische oder aber auch genetische Faktoren geben muss, die zum schlechteren Gesundheitszustand führten⁹⁵.

4.4.4 Herzpassagierung von CVB3

In dieser Arbeit wurde rekombinantes, kardiotropes H3N-375TS durch die einmalige *in vivo* Herzpassagierung in NMRI-Mäusen so verändert, dass es anschließend eine höhere Herzpathogenität aufwies¹⁰⁸. Die neu entstandene rekombinante H3N-375TS *hp* Variante wies im Vergleich zu ihrer nicht herzpassegierten Vorläufervariante eine stärkere Tendenz zur Infektion kardialen Gewebes auf, so dass

nach erneuter Infektion von NMRI-Mäusen auch bei einer niedrigeren Virusdosis vergleichbare bzw. höhere kardiale CVB3-Titer sowie eine stärkere Inflammation im Herzen nachgewiesen wurden (**Abb. 34E**). Innerhalb der Arbeit wurden keine molekularen Analysen durchgeführt, so dass der genaue Mechanismus der Adaption von H3N-375TS bisher nicht geklärt ist.

Eine besondere Eigenschaft von Viren, insbesondere RNA-Viren, ist ihre Anpassungsfähigkeit an äußere Bedingungen. Die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase (RdRP) verfügt über keine *proofreading* Funktion, wodurch CVB3 eine hohe Mutationsrate besitzt. Innerhalb eines einzigen Replikationszyklus baut die RdRP alle 1000-2000 bp einen Fehler in das CVB3-Genom ein³¹⁷. Dieser Umstand führt beispielsweise dazu, dass Mutationen im VP1-Protein eine effizientere Bindung von CAR vermitteln können. Auch wenn alle Strukturproteine (VP1-VP4) an der Rezeptorbindung beteiligt sind, wurde ein Großteil der Interaktionen mit CAR für das VP1-Protein nachgewiesen¹⁸. Einzig die Modifikation der Aminosäure Threonin-129 im VP1-Protein von CVB4 ist für dessen Virulenz verantwortlich³¹⁸. Die Mutation zweier Basen im VP1-Protein von CVB3 führte dazu, dass Lysin durch Serin ersetzt wurde, was in einer vergrößerten Plaque-Morphologie resultierte³¹². Veränderungen an Position N63Y des VP3 Proteins von CVB3 führten ebenfalls zur Ausbildung größerer Plaques³¹⁹.

Während der Passagierung des avirulenten CVB3-Stammes CVB3/0³²⁰ wurde dieser durch die Modifikation eines einzigen Nukleotids kardiovirulent. Allein der Austausch des Nukleotids Cytosin (C) zu Uracil (U) an Position 234 in der 5'UTR des CVB3-Genoms war dafür ausreichend³²¹.

Deletionen am 5'-Ende von CVB3, speziell in der 5'UTR, können dagegen zu einer niedrigeren Replikationsrate und fehlerhafter Translation führen^{183,322}.

Bei der Produktion der Viren bzw. auch während der Lagerung der generierten Virusstocks können Picornaviren, wie alle RNA-Viren, in einer Mischung unterschiedlicher Genotypen vorliegen, welche als Quasi-Spezies bezeichnet werden. Dabei zeigte sich, dass sich mutierte Genotypen, welche durch die Mutation einen Selektionsvorteil erhalten hatten, besser durchsetzen konnten als Genotypen ohne die entsprechende Mutation^{323,324}.

4.4.5 Das chronische Modell der CVB3-Mausmyokarditis

CVB3 induziert in A/J -und NMRI-Mäusen eine chronische Myokarditis, welche einen ähnlichen Krankheitsverlauf wie beim Menschen hat^{115,325}. Resistente Mausstämmen, wie der Stamm C57BL/6, dagegen entwickeln zwar eine akute, jedoch keine chronische Myokarditis^{108,287}.

Nach akuter und subakuter Phase der CVB3-Infektion, welche sich durch die Virusvermehrung und Schädigung des Myokards auszeichnen, folgt die chronische Phase der Myokarditis.

Charakteristische Merkmale für die chronische Myokarditis sind die CVB3-mRNA-Persistenz, ohne den Nachweis funktioneller CVB3-Partikel, sowie das Auftreten fibrotischer Areale (*Remodelling*) im zuvor geschädigten Herzgewebe^{115,296}.

Wie es CVB3 gelingt im Herzen zu persistieren ist bislang noch nicht ins Detail verstanden, jedoch sind terminale Deletionen im 5'-Bereich der genomischen RNA maßgeblich in die virale Persistenz

involviert. 2005 zeigten Kim *et al.*, dass ein Zusammenhang zwischen der Bildung nicht-zytopathischer Viren aus der genomischen CVB3-RNA mit terminalen Deletionen der 5'UTR und der Persistenz und bzw. oder der Aufrechterhaltung der persistenten Infektion des Herzens besteht³²⁶. Zudem fanden sich vergleichbare terminale Deletionen der 5'UTR in Biopsien von Patienten mit chronischer Kardiomyopathie³²⁷. Smith *et al.* zeigten, dass diese terminalen Deletionen der 5'UTR des CVB3-Genoms verglichen mit unmodifiziertem Wildtyp-CVB3 zur deutlichen Verringerung der Virusreplikation führten³²⁸. Wie bereits in Kapitel 4.1 diskutiert besteht zudem die Annahme der Persistenz von CVB3 in den pankreatischen Inselzellen, welche ebenfalls auf terminale Deletionen innerhalb der 5'UTR ihres Genoms zurückführbar ist²⁹⁷⁻²⁹⁹.

Bei dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten heterogenem NMRI-Mausstamm wurden nach 28-tägiger Versuchsdauer keine infektiösen CVB3-Partikel im Herzen nachgewiesen, hingegen konnten geringe Mengen von CVB3-mRNA im Herzen detektiert werden, was charakteristisch für die chronische Myokarditis ist (**Abb. 37C**).

Mittels der Trichrom-Färbung der Herzgewebeschnitten waren die Veränderungen des Myokards infolge der CVB3-Infektion sowie fibrotische Veränderungen gut sichtbar. Auch hier zeigte sich erneut die Heterogenität der NMRI-Mäuse bezüglich der Infektion mit CVB3. So wies eine der mit H3N-375TS *hp* infizierten NMRI-Mäuse, welche mit einem Inflammationsscore von 3 bewertet wurde, viele myofibrillär geschädigte Areale im Myokard auf (**Abb.37D**, 25-fach Vergrößerung). Bei einem anderen Tier der gleichen Versuchsgruppe hingegen ergab sich ein kardialer Inflammationsscore von 1, die Schädigung des Myokards, gemessen an der Häufigkeit sowie der Größe solcher Areale, war deutlich geringer.

4.4.6 Hämodynamische Messungen

Um weitere objektive Aussagen über die pathophysiologischen Auswirkungen der mit CVB3 induzierten Myokarditis treffen zu können wurden hämodynamische Messungen der kardialen Funktionsparameter durchgeführt. Aus der Literatur ist es bekannt, dass hauptsächlich das links-ventrikuläre Myokard von kardiovirulenten CVB3 attackiert wird²⁸⁸. Aus diesem Grund wurde die maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit [dP/dt_{max} (mmHg/s)], der links-ventrikuläre systolische Druck, welche die Kontraktilität beschreibt, sowie die maximale Druckabfallgeschwindigkeit [dP/dt_{min} (mmHg/s)] des links-ventrikulären diastolischen Drucks quantifiziert, welche wiederum die Relaxationsfähigkeit (*Compliance*) angibt.

Im akuten Modell konnten zwischen den i.p. mit H3N bzw. mit H3N-39TS infizierten NMRI-Mäusen und den mit 0,9%iger NaCl-Lösung behandelten Kontrolltieren (sham) signifikante Unterschiede bezüglich dP/dt_{max} (H3N-39TS vs. sham) und dP/dt_{min} (H3N als auch H3N-39TS vs. sham) detektiert werden. Aufgrund der ausbleibenden Replikation von H3N-375TS nach i.p. Applikation gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den mit H3N-375TS infizierten Mäusen und den Kontrolltieren (**Abb. 32 B-C**).

Durch die Änderung der Applikationsroute auf i.v. in Kombination mit der Steigerung der applizierten Virusdosis sowie der Herzpassagierung konnte im akuten Modell die Myokarditis mit deutlichen histopathologischen Veränderungen auch mit H3N-375TS in NMRI-Mäusen induziert werden. Dennoch waren die CVB3-Titer im Herzen sowie der kardiale Inflammationsscore geringer als bei den i.p. mit H3N-39TS bzw. H3N infizierten NMRI-Mäusen. Diese beiden Parameter wurden als Indikatoren messbarer, hämodynamischer Veränderungen gewertet. Überraschender Weise konnten nach i.v. Applikation von H3N-375TS weder in Balb/C-Mäusen im akuten Modell, noch in NMRI-Mäusen im akuten als auch im chronischen Modell, kardiale Dysfunktionen festgestellt werden. Dabei verwunderte, dass der kardiale Inflammationsscore H3N-375TS (1×10^8 pfu) infizierter Balb/C-Mäuse bei einem Wert von 2 lag, was dem Inflammationsscore der i.p. mit H3N infizierten NMRI-Mäusen entsprach, welche wiederum signifikante Beeinträchtigungen der Hämodynamik aufwiesen. Unter Betracht der kardialen CVB3-Titer wird jedoch ersichtlich, dass das i.v. applizierte H3N-375TS in Balb/C-Mäusen lediglich 10^4 pfu/g erreicht wohingegen die von i.p. appliziertem H3N bzw. H3N-39TS etwa zwei- drei \log_{10} -Stufen darüber lagen. Somit könnte der kardiale CVB3-Titer eine entscheidende Rolle für signifikante hämodynamische Veränderungen spielen. Diese Befunde H3N-375TS infizierter Balb/C-Mäuse stehen dabei im Kontrast zu vorherigen Daten der Arbeitsgruppe, in denen Balb/C-Mäuse signifikante kardiale Dysfunktionen zeigten wenn sie i.p. mit Wildtyp-CVB3 infiziert wurden³²⁹.

Auch wenn NMRI-Mäuse, wenngleich seltener als Inzuchtmäuse, zur Untersuchung CVB3 induzierter Myokarditen verwendet wurden, adressierten die bislang publizierten Studien kaum die Auswirkungen der Infektion auf die Hämodynamik, sondern vielmehr immunologische Parameter. Da der überwiegende Teil der Studien die chronische Myokarditis an Parametern wie der Expression verschiedener Zytokine festmacht, sind die Messungen der in der vorliegenden Studie vorgenommenen Hämodynamik nicht mit der Literatur vergleichbar. Für den Vergleich könnten in Folgeexperimenten ebenfalls Zytokin- und Interferonprofile der H3N-375TS infizierten NMRI-Mäuse im chronischen Modell ermittelt werden. Schmitdke *et al.* zeigten, dass in CVB3 infizierten NMRI-Mäusen während der akuten Phase eine verstärkte kardiale Expression der IFN β - und IL-6 mRNA bis zu sieben Tage nach der i.p. Infektion messbar war. Die mRNAs von TNF α , IL-1 α , IL-10, IL-12 und IFN γ wurden sogar bis zu 14 Tage nach Infektion im Myokard verstärkt exprimiert³³⁰. Damit übereinstimmend zeigten Glück *et al.*, dass im chronischen Modell in CVB3 infizierten NMRI-Mäusen die mRNA-Expression von TNF α , IL-1 α , IFN γ , IL-10, IL-18, MIP-1a, TGF β sowie der iNOS bis zu 98 Tagen nach Infektion im Herzen anhielt¹²⁵. In einer späteren Studie zeigten Schmitdke *et al.*, dass in NMRI-Mäusen sowohl eine akute als auch chronische CVB3 induzierte Myokarditis generiert werden kann, doch auch hier wurden keine hämodynamischen Messungen durchgeführt¹¹⁵. Innerhalb dieser Studie induzierte die CVB3-Infektion keine gravierenden Verletzungen des Myokards. Zudem zeigte sich, dass es keine pathophysiologische Verbindung zwischen Herz und Pankreas der infizierten NMRI-Mäuse gab. So stimmte die induzierte IgG-Antwort sowie der Grad der Pankreaszerstörung als auch die erhöhte Menge an detektierter viraler RNA in der Milz nicht mit der histopathologischen Analyse des Myokards überein, die nahe zu keine

destruktiven Veränderungen aufwies. Im Gegensatz dazu waren hohe persistierende kardiale RNA-Level des Virus charakteristisch für die Entwicklung der chronischen Myokarditis, woraus geschlussfolgert wurde, dass eine hohe kardiale Viruslast während der akuten Phase der Myokarditis zusammen mit großen Mengen von im Herzen persistierender CVB3-RNA geeignete Marker zur Vorhersage der chronischen Myokarditis darstellen.

Auch der virale Genotyp war ein entscheidender Faktor im Verlauf der CV3-induzierten Infektion des Herzens in NMRI-Mäusen, insbesondere Aminosäuresubstitutionen innerhalb der viralen Kapsidproteine, hier VP1, führten zu einer Veränderung des Zelltropismus¹¹⁵. In Abhängigkeit des spezifischen Aminosäureaustausches innerhalb von VP1 der eingesetzten CVB3-Varianten unterschieden sich die Viren innerhalb ihres kardialen Replikationsverhaltens bzw. der Mengen an im Herzen persistierender RNA, was folglich die Ausprägung der chronischen Myokarditis beeinflusste. Vorherige Untersuchungen der gleichen Arbeitsgruppe zeigten, dass der CVB3-Stamm Nancy auf primären humanen Fibroblasten keine zytopathischen Effekte verursachte, wohingegen die auf Nancy basierende CVB3-Variante PD, die gleichen Zellen lysierte. Als ursächlich dafür wurden sechs Aminosäuresubstitutionen im Kapsidprotein VP1 befunden³³⁰, durch welche CVB3-PD *in vitro* über die Verwendung des zusätzlichen zellulären Rezeptors Heperansulfat einen breiteren Zelltropismus aufweist.³³¹ *In vivo* jedoch führten diese Aminosäuremodifikationen zu einer schnelleren Eliminierung des Virus.¹¹⁵

Wie bereits beim Kapitel 4.4.2 diskutiert repliziert das pankreasattenuierte H3N-375TS nicht im Pankreas, so dass vermutlich die Viruslast im Blutstrom und folglich die im Herzen zu gering ausfällt, um das Myokard zu infizieren und signifikante Unterschiede mittels hämodynamischer Messungen zu detektieren.

4.5 Umsetzung des 3R-Gedankens

Das etablierte Modell ermöglicht unabhängig von der Ausprägung der Pankreatitis die Analyse der murinen Myokarditis. Zum einen hat dies klinische, zum anderen aber auch tierschutzrechtliche Relevanz. Die Implementierung der 3R Prinzipien, *Replacement*, *Reduction* und *Refinement* zum Schutz der für wissenschaftlichen Zwecke verwendeten Tiere stellt dabei sogar eine gesetzliche Richtlinie dar³³², welche im Gesetztestext der Europäischen Union (Richtlinie 2010/63/EU) verankert ist. Darin ist in 55 Punkten geschildert inwiefern dieser Schutz, wann immer möglich, umzusetzen ist. Im Sinne des Aspektes *Refinement* verbesserte das pankreasattenuierte CVB3-Maus-Myokarditismodell das Wohl der infizierten Tiere auf zwei Wegen. Zum einen führte die pankreasattenuierte CVB3-Variante H3N-375TS, im Vergleich zu nicht modifiziertem H3N, zu einer Verringerung des Leidens i.v. infizierter Balb/C-Mäuse, was der ermittelte Verhaltensscore (**Abb. 39B**; H3N-375TS: Score 4, H3N: Score 1) verdeutlichte. Zum anderen war auch die i.v. Applikation von H3N-375TS in NMRI-Mäusen mit einer geringeren gesundheitlichen Beeinträchtigung verbunden als die i.p. Applikation des nicht pankreasattenuierten H3N. Ursächlich für die bessere Gesundheit der infizierten Mäuse könnte auf den

ersten Blick demnach die Pankreasattenuation sein, welche die fulminante Infektion und damit verbundene Destruktion dieses Gewebes unterbindet. Tracy *et al.* kamen jedoch zu dem Befund, dass bei der i.p. Applikation keine direkte Korrelation zwischen dem Grad der Zerstörung des Pankreasgewebes und dem Wohlbefinden der CVB3 infizierten Mäuse besteht.⁹⁵ In der hier vorliegenden Arbeit besaßen i.v. mit CVB3 infizierte NMRI-Mäuse unabhängig von der Infektion bzw. Zerstörung des Pankreas einen besseren Gesundheitszustand als solche, die i.p. infiziert wurden und eine stärkere Destruktion des Pankreas aufwiesen. Vielmehr zeigt die vorliegende Studie, dass möglicherweise eine Korrelation zwischen den kardialen CVB3-Titern und dem Wohlbefinden der Mäuse besteht. So wiesen Tiere mit hohen kardialen Titern einen schlechten Gesundheitszustand auf, wohingegen Tiere, welche niedrige kardiale CVB3-Titer zeigten ein verbesserter Gesundheitsscore zugewiesen werden konnte. Doch auch basierend auf dieser Korrelation wäre es vermessen zu behaupten, dass der Grad der kardialen Infektion ausschlaggebend für das Wohlbefinden der infizierten Tiere steht. Vielmehr indizieren die kardialen Virustiter die Stärke der systemischen Infektion von CVB3, welche innerhalb einer sehr komplexen Regulation den Gesundheitsstatus der Tiere beeinflusst. Neben dem Aspekt des *Refinement* trägt das etablierte Modell auch zur Erfüllung des Aspektes *Reduction* bei. In klassischen CVB3-Mausmyokarditismodellen versterben Tiere teilweise vorzeitig vor dem geplanten Versuchsende bzw. müssen vorzeitig getötet werden. Um trotzdem eine ausreichende, gleichmäßige Anzahl an Tieren innerhalb aller Versuchsgruppen zu haben, die in die Analyse eingehenden, ist es daher oftmals nötig größere Tierzahlen einzusetzen. Im Sinne des Aspektes *Reduction* ermöglicht die etablierte Pankreasattenuation den Einsatz kleiner Versuchsgruppen, da diese zu einer weniger fulminanten Ausprägung des Krankheitsverlaufes führt.

4.6 Ausblick

Das in der Arbeit etablierte murine CVB3-Myokarditismodell, welches auf der RNAi vermittelten Pankreasattenuation mittels miRNA-TS modifiziertem CVB3 basiert, ermöglicht es den Virustropismus nach i.v. Applikation der modifizierten CVB3-Variante H3N-375TS gezielt zu ändern. Dadurch war es erstmals möglich in Mäusen eine Myokarditis zu induzieren, ohne dabei eine Pankreatitis auszulösen. Um das Modell noch effizienter zu machen bzw. es bezüglich pathophysiologischer Aspekte hin zu verbessern sollten dennoch wichtige Punkte adressiert werden. Ein äußerst gravierender Punkt, welcher bis dato nahe zu kaum in der Arbeit adressiert wurde, ist die Verwendung weiblicher statt männlicher Mäuse. Mehrfach wurde gezeigt, dass es geschlechtsspezifische Unterschiede im Verlauf der CVB3 induzierten Myokarditis und damit auch in der Ausbildung der DCM gibt. Dies trifft sowohl auf den murinen als auch den humanen Organismus zu. Es ist bislang nicht eindeutig geklärt, worauf diese geschlechtsspezifischen Unterschiede basieren, dennoch konnte gezeigt werden, dass Faktoren des Immunsystems, hier insbesondere Sexualhormone wie Östrogen und Testosteron, welche zu einer unterschiedlichen Aktivierung der Th1- bzw. Th2-vermittelten Immunantwort führen, entscheidend dazu beitragen. Basierend auf den Befunden von McNamara *et al.*, die zeigten, dass männliche Patienten

deutlich häufiger eine DCM ausbildeten als weibliche³³³, publizierten Fairweather *et al.* 2013 eine detaillierte Zusammenfassung potentieller pathophysiologischer Kausalitäten dieses Befundes⁸⁰. Daher sollten die Versuche im Vergleich mit männlichen Tieren wiederholt werden, um zu überprüfen, ob es geschlechtsspezifische Unterschiede gibt bzw. ob pankreasattenuiertes CVB3 eine DCM in männlichen Mäusen induzieren kann. Da jedoch beide Geschlechter von der virus-induzierten Myokarditis betroffen sind und daher das Verständnis des Krankheitsverlaufes in beiden Geschlechtern von klinischer Relevanz ist, sollte auch die Analyse in weiblichen Mäusen weiter vorangetrieben werden³³⁴.

Ein weiterer zu untersuchender Faktor ist die Suszeptibilität der beiden verwendeten Mausstämme NMRI und Balb/C gegenüber der CVB3-Infektion. Hierbei fiel auf, dass für die Etablierung des Modells der homogenere Inzuchtstamm Balb/C besser geeignet ist, da die Heterogenität des NMRI-Stammes bereits enorme Schwankungen innerhalb gleichbehandelter Tiere mit sich brachte. Auch wenn die Heterogenität der NMRI-Mäuse die Situation in der noch diverseren humanen Population besser widerspiegelt, sollte zumindest für die Etablierungsphase ein homogeneres System gewählt werden, welches sowohl die Analyse der akuten als auch chronischen Myokarditis ermöglicht. Die Verwendung des pankreasattenuierten H3N-375 ermöglicht hierbei auch die Untersuchung der Myokarditis, insbesondere der chronischen Myokarditis, bei hochsuszeptiblen Mausstämmen (schlechter klinischer Zustand aufgrund der induzierten Pankreatitis), welche in nicht pankreasattenuierten Versuchsmodellen mitunter frühzeitig im Versuchsverlauf versterben würden.

Um detailliertere Kenntnisse über die systemische Ausbreitung von i.v. appliziertem CVB3 zu gewinnen sollten die viralen Titer, neben Pankreas und Herz, auch in weiteren Organen innerhalb definierter zeitlicher Abstände innerhalb des siebentägigen Infektionszeitraumes überprüft werden. Zusätzlich wäre es interessant, die Viruslast im Blut sowie die Expression verschiedener proinflammatorischer Zytokine bzw. die generelle Aktivierung verschiedener Signalwege wie die des *mitogen activated protein kinase* (MAPK)- oder den JAK/STAT-Weg zu analysieren. In diesem Zusammenhang sollte zudem die Rekrutierung und Aktivierung verschiedener Immunzellen innerhalb der Organe bzw. im Blut bestimmt werden.

Bezüglich der Hämodynamik wäre es denkbar eine mehrfach wiederholte i.v. Injektionen von pankreasattenuierten CVB3-Varianten durchzuführen, um messbare kardiale Dysfunktionen zu erhalten und so die Untersuchung der Myokarditis ohne Nebenwirkungen der Pankreatitis zu gewährleisten. Dabei muss jedoch abgewogen werden, ob die damit verbundenen zusätzlichen operativen Eingriff wiederum nicht eine zu große Belastung für die Tiere darstellen. Zudem wird bereits durch die Erstinjektion des Virus das Immunsystem aktiviert, so dass zu überprüfen bleibt, ob infolge der wiederholten Injektionen dieses schnell reagiert und zu einer unmittelbaren *Clearance* des Virus führt. Eine Limitierung des Modells ist die i.v. Injektion, welche die Handhabung durch den operativen Eingriff erschwert. In Vorversuchen mit NMRI-Mäusen, welche i.p. mit CVB3-375TS (mit nur einer TS) und mit CVB3-216aTS (drei TSs) infiziert wurden, ergaben sich die gleichen kardialen CVB3-Titer (Daten nicht gezeigt). Dadurch könnte, durch den Einsatz einer Kombination von im Pankreas weniger stark

exprimierten miRNAs sowie einer weiteren Optimierung der Anzahl der inserierten miRNA-TSs, die Stärke der induzierten Myokarditis kontrolliert werden.

Zusätzlich zeigten die Befunde von Dixit *et al.* sowie Endo *et al.*, dass während einer induzierten Pankreatitis die Expressionslevel der miRNA-216a, -216b bzw. der miRNA-217 deutlich anstiegen^{335,336}. Basierend auf dem Prinzip „*Induction by disease*“ wäre es möglich, durch die Modifikation von CVB3 mit den zuvor erwähnten miRNAs, die CVB3-Replikation während der akuten Phase der Infektion zu verringern. Dadurch könnte die nötige Virämie, welche zur Ausbildung der Myokarditis nötig ist, generiert werden ohne CVB3 i.v. applizieren zu müssen, sondern die in der Mehrheit der publizierten Studien verwendete i.p. Applikationsroute beizubehalten. Zudem sollte geklärt werden, welchen Effekt die Insertion der miRNA-TS in das Genom von CVB3 tatsächlich besitzt, da auch die nicht durch murine miRNAs erkannte miRNA-39TS-Insertion geringfügige Effekte bezüglich der Replikation zeigte. Gegebenfalls sollte diese durch eine andere Kontroll-miRNA-TS ersetzt und überprüft werden bzw. es sollten die Spacer zwischen den miRNA-39TS Kopien verändert werden, um potentielle Bindesequenzen anderer miRNAs ausschließen zu können.

Literaturverzeichnis

1. Dalldorf G, Sickles GM. An unidentified, filtrable agent isolated from the feces of children with paralysis. *Science (80-)*. 1948;108(2794):61-62. <https://doi.org/doi:10.1126/science.108.2794.61>.
2. Melnick JL. My role in the discovery and classification of the enteroviruses. *Annu Rev Microbiol*. 1996. <https://doi.org/doi:10.1146/annurev.micro.50.1.1>
3. Gifford R, Dalldorf G. The Morbid Anatomy of Experimental Coxsackie Virus Infection. *Am J Pathol*. 1951;27(6):1047-1063. [PMC1937323](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1937323/).
4. Garmaroudi FS, Marchant D, Hendry R, et al. Coxsackievirus B3 replication and pathogenesis. *Future Microbiol*. 2015;10(4):629-653. <https://doi.org/doi:10.2217/Fmb.15.5>.
5. Melnick JL, Kaplan AS, Zabin E, Contreras G, Larkum NW. An epidemic of paralytic poliomyelitis characterized by dual infections with poliomyelitis and Coxsackie viruses. *J Exp Med*. 1951;94(6):471-492. <https://doi.org/doi:10.1084/jem.94.6.471>.
6. Hall CB, Miller DG. The detection of a silent coxsackie B-5 virus perinatal infection. *J Pediatr*. 1969;75(1):124-127. [https://doi.org/doi:10.1016/S0022-3476\(69\)80112-5](https://doi.org/doi:10.1016/S0022-3476(69)80112-5).
7. Jenista JA, Powell KR, Menegus MA. Epidemiology of neonatal enterovirus infection. *J Pediatr*. 1984;104(5):685-690. [https://doi.org/doi:10.1016/S0022-3476\(84\)80944-0](https://doi.org/doi:10.1016/S0022-3476(84)80944-0).
8. Cooper J. *Myocarditis: From Bench to Bedside*. Springer Science & Business Media; 2002.
9. Kandolf R. [Virus etiology of inflammatory cardiomyopathy]. *Dtsch Med Wochenschr*. 2004. <https://doi.org/doi:10.1055/s-2004-831863>.
10. Whitton JL, Cornell CT, Feuer R. Host and virus determinants of picornavirus pathogenesis and tropism. *Nat Rev Microbiol*. 2005;3(10):765-776. <https://doi.org/doi:10.1038/nrmicro1284>.
11. Jang SK, Kräusslich HG, Nicklin MJ, Duke GM, Palmenberg AC, Wimmer E. A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation. *J Virol*. 1988. <https://doi.org/doi:10.1196/annals.1307.020>.
12. Zell R, Delwart E, Gorbalenya AE, et al. ICTV virus taxonomy profile: Picornaviridae. *J Gen Virol*. 2017;98(10):2421-2422. <https://doi.org/doi:10.1099/jgv.0.000911>.
13. Melnick JL. Enteroviruses: Polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Channock RM, Melnick JL, Monath TP, Roizman B, Straus SE. *Fields virology*. *Fields Virol*. 1996.
14. Pallansch MA, Oberste MS, Whitton JL. Chapter 17 Enteroviruses: Polioviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses, and Newer Enteroviruses. *Fields Virol 6th Ed*. 2013.
15. Rossmann MG, He Y, Kuhn RJ. Picornavirus-receptor interactions. *Trends Microbiol*. 2002;10(7):324-331. [https://doi.org/doi:10.1016/S0966-842X\(02\)02383-1](https://doi.org/doi:10.1016/S0966-842X(02)02383-1).

16. Bergelson JM, Cunningham JA, Droguett G, et al. Isolation of a common receptor for coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* (80-). 1997. <https://doi.org/doi:10.1126/science.275.5304.1320>.
17. Muckelbauer JK, Kremer M, Minor I, et al. The structure of coxsackievirus B3 at 3.5 Å resolution. *Structure*. 1995;3(7):653-667. [https://doi.org/doi:10.1016/S0969-2126\(01\)00201-5](https://doi.org/doi:10.1016/S0969-2126(01)00201-5).
18. He Y, Chipman PR, Howitt J, et al. Interaction of coxsackievirus B3 with the full length coxsackievirus-adenovirus receptor. *Nat Struct Biol*. 2001. <https://doi.org/doi:10.1038/nsb1001-874>.
19. Jiang P, Liu Y, Ma H-C, Paul A V., Wimmer E. Picornavirus Morphogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2014;78(3):418-437. <https://doi.org/doi:10.1128/MMBR.00012-14>.
20. Rossmann MG, Arnold E, Erickson JW, et al. Structure of a human common cold virus and functional relationship to other picornaviruses. *Nature*. 1985;317(6033):145-153. <https://doi.org/doi:10.1038/317145a0>.
21. Wimmer E. Genome-linked proteins of viruses. *Cell*. 1982. [https://doi.org/doi:10.1016/0092-8674\(82\)90335-X](https://doi.org/doi:10.1016/0092-8674(82)90335-X).
22. Rueckert RR. Picornaviruses and their replication. *Fields BN al, eds Fields Virol 2nd Ed Raven Press New York*. 1990:507-548.
23. Modrow, Falke D, Truyen U, Schätzl H. Viren mit einzelsträngigem, segmentierten RNA-Genom in Negativstrangorientierung. In: *Molekulare Virologie*. ; 2010. <https://doi.org/doi:10.1007/978-3-8274-2241-5>.
24. Hellen CUT, Sarnow P. Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules. *Genes Dev*. 2001;15(13):1593-1612. <https://doi.org/doi:10.1101/gad.891101>.
25. Pelletier J, Sonenberg N. Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature*. 1988. <https://doi.org/doi:10.1038/334320a0>.
26. Jang SK, Pestova T V., Hellen CUT, Witherell GW, Wimmer E. Cap-independent translation of picornavirus RNAs: Structure and function of the internal ribosomal entry site. *Enzyme*. 1990. <https://doi.org/doi:10.1159/000468766>.
27. Jackson RJ, Howell MT, Kaminski A. The novel mechanism of initiation of picornavirus RNA translation. *Trends Biochem Sci*. 1990. [https://doi.org/doi:10.1016/0968-0004\(90\)90302-R](https://doi.org/doi:10.1016/0968-0004(90)90302-R).
28. Vogt DA, Andino R. An RNA element at the 5'-end of the poliovirus genome functions as a general promoter for RNA synthesis. *PLoS Pathog*. 2010. <https://doi.org/doi:10.1371/journal.ppat.1000936>.
29. Herold J, Andino R. Poliovirus RNA replication requires genome circularization through a protein-protein bridge. *Mol Cell*. 2001. [https://doi.org/doi:10.1016/S1097-2765\(01\)00205-2](https://doi.org/doi:10.1016/S1097-2765(01)00205-2).
30. Andino R, Rieckhof GE, Baltimore D. A functional ribonucleoprotein complex forms around the 5' end of poliovirus RNA. *Cell*. 1990. [https://doi.org/doi:10.1016/0092-8674\(90\)90170-J](https://doi.org/doi:10.1016/0092-8674(90)90170-J).

31. Parsley TB, Towner JS, Blyn LB, Ehrenfeld E, Semler BL. Poly (rC) binding protein 2 forms a ternary complex with the 5'-terminal sequences of poliovirus RNA and the viral 3CD proteinase. *RNA*. 1997. <https://doi.org/doi:10.1128/JVI.74.22.10359-10370.2000>.
32. Price BD, Rueckert RR, Ahlouist P. Complete replication of an animal virus and maintenance of expression vectors derived from it in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci*. 1996. <https://doi.org/doi:10.1073/pnas.93.18.9465>.
33. Hogle J, Chow M, Filman D. Three-dimensional structure of poliovirus at 2.9 Å resolution. *Science (80-)*. 1985;229(4720):1358-1365. <https://doi.org/doi:10.1126/science.2994218>.
34. Kelly EJ, Hadac EM, Cullen BR, Russell SJ. MicroRNA antagonism of the picornaviral life cycle: Alternative mechanisms of interference. *PLoS Pathog*. 2010;6(3). <https://doi.org/doi:10.1371/journal.ppat.1000820>.
35. Tomko RP, Xu R, Philipson L. HCAR and MCAR: The human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses. *Proc Natl Acad Sci*. 1997. <https://doi.org/doi:10.1073/pnas.94.7.3352>.
36. Carson SD, Chapman NN, Tracy SM. Purification of the putative coxsackievirus B receptor from HeLa cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997. <https://doi.org/doi:10.1006/bbrc.1997.6449>.
37. Bergelson JM, Krithivas A, Celi L, et al. The murine CAR homolog is a receptor for coxsackie B viruses and adenoviruses. *J Virol*. 1998.
38. Patel KP, Coyne CB, Bergelson JM. Dynamin- and Lipid Raft-Dependent Entry of Decay-Accelerating Factor (DAF)-Binding and Non-DAF-Binding Coxsackieviruses into Nonpolarized Cells. *J Virol*. 2009. <https://doi.org/doi:10.1128/JVI.01016-09>.
39. Milstone AM, Petrella J, Sanchez MD, Mahmud M, Whitbeck JC, Bergelson JM. Interaction with coxsackievirus and adenovirus receptor, but not with decay-accelerating factor (DAF), induces A-particle formation in a DAF-binding coxsackievirus B3 isolate. *J Virol*. 2005;79(1):655-660. <https://doi.org/doi:10.1128/JVI.79.1.655-660.2005>.
40. Bergelson JM, Mohanty JG, Crowell RL, St John NF, Lublin DM, Finberg RW. Coxsackievirus B3 adapted to growth in RD cells binds to decay-accelerating factor (CD55). *J Virol*. 1995;69(3):1903-1906. [PMC188804](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/188804/)
41. Shafren DR, Dorahy DJ, Ingham RA, Burns GF, Barry RD. Coxsackievirus A21 binds to decay-accelerating factor but requires intercellular adhesion molecule 1 for cell entry. *J Virol*. 1997. [PMC191695](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/191695/)
42. Shieh JTC, Bergelson JM. Interaction with decay-accelerating factor facilitates coxsackievirus B infection of polarized epithelial cells. *J Virol*. 2002;76(18):9474-9480. <https://doi.org/doi:10.1128/JVI.76.18.9474-9480.2002>.
43. Nicholson-Weller A, Wang CE. Structure and function of decay accelerating factor CD55. *J Lab Clin Med*. 1994. <https://doi.org/doi:10.1096/fj.14-264796>.

44. Coyne CB, Bergelson JM. Virus-induced Abl and Fyn kinase signals permit coxsackievirus entry through epithelial tight junctions. *Cell*. 2006;124(1):119-131. <https://doi.org/doi:10.1016/j.cell.2005.10.035>.
45. Carson SD, Chapman NM, Hafenstein S, Tracy S. Variations of Coxsackievirus B3 Capsid Primary Structure, Ligands, and Stability Are Selected for in a Coxsackievirus and Adenovirus Receptor-Limited Environment. *J Virol*. 2011;85(7):3306-3314. <https://doi.org/doi:10.1128/JVI.01827-10>.
46. van der Linden L, Wolthers KC, van Kuppeveld FJM. Replication and inhibitors of enteroviruses and parechoviruses. *Viruses*. 2015. <https://doi.org/doi:10.3390/v7082832>.
47. Adams P, Kandiah E, Effantin G, Steven AC, Ehrenfeld E. Poliovirus 2C protein forms homooligomeric structures required for ATPase activity. *J Biol Chem*. 2009. <https://doi.org/doi:10.1074/jbc.M109.031807>.
48. Leong LE-C, Cornell CT, Semler BL. Processing Determinants and Functions of Cleavage Products of Picornavirus Polyproteins. In: *Molecular Biology of Picornavirus*. ; 2002. <https://doi.org/doi:10.1128/9781555817916.ch16>.
49. Xiang W, Cuconati a, Hope D, Kirkegaard K, Wimmer E. Complete protein linkage map of poliovirus P3 proteins: interaction of polymerase 3Dpol with VPg and with genetic variants of 3AB. *J Virol*. 1998;72(8):6732-6741.
50. Cathcart AL, Baggs EL, Semler BL. Picornaviruses: Pathogenesis and Molecular Biology. In: *Reference Module in Biomedical Sciences*. ; 2015. <https://doi.org/doi:10.1016/B978-0-12-801238-3.00272-5>.
51. Hohenadl C, Klingel K, Mertsching J, Hofschneider PH, Kandolf R. Strand-specific detection of enteroviral RNA in myocardial tissue by in situ hybridization. *Mol Cell Probes*. 1991. [https://doi.org/doi:10.1016/0890-8508\(91\)90033-G](https://doi.org/doi:10.1016/0890-8508(91)90033-G).
52. Paul A V., Van Boom JH, Filippov D, Wimmer E. Protein-primed RNA synthesis by purified poliovirus RNA polymerase. *Nature*. 1998;393(6682):280-284. doi:10.1038/30529.
53. Wells VR, Plotch SJ, DeStefano JJ. Determination of the mutation rate of poliovirus RNA-dependent RNA polymerase. *Virus Res*. 2001. [https://doi.org/doi:10.1016/S0168-1702\(00\)00256-2](https://doi.org/doi:10.1016/S0168-1702(00)00256-2).
54. Richardson SJ, Leete P, Bone AJ, Foulis AK, Morgan NG. Expression of the enteroviral capsid protein VP1 in the islet cells of patients with type 1 diabetes is associated with induction of protein kinase R and downregulation of Mcl-1. *Diabetologia*. 2013. <https://doi.org/doi:10.1007/s00125-012-2745-4>.
55. Hayashi-Nishino M, Fujita N, Noda T, Yamaguchi A, Yoshimori T, Yamamoto A. A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation. *Nat Cell Biol*. 2009. <https://doi.org/doi:10.1038/ncb1991>.

56. Van der Vaart A, Griffith J, Reggiori F. Exit from the Golgi Is Required for the Expansion of the Autophagosomal Phagophore in Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*. 2010. <https://doi.org/doi:10.1091/mbc.E09-04-0345>.
57. Hailey DW, Rambold AS, Satpute-Krishnan P, et al. Mitochondria Supply Membranes for Autophagosome Biogenesis during Starvation. *Cell*. 2010. <https://doi.org/doi:10.1016/j.cell.2010.04.009>.
58. Berg TO, Fengsrud M, Strømhaug PE, Berg T, Seglen PO. Isolation and characterization of rat liver amphisomes: Evidence for fusion of autophagosomes with both early and late endosomes. *J Biol Chem*. 1998. <https://doi.org/doi:10.1074/jbc.273.34.21883>.
59. Deretic V, Levine B. Autophagy, Immunity, and Microbial Adaptations. *Cell Host Microbe*. 2009. <https://doi.org/doi:10.1016/j.chom.2009.05.016>.
60. Delorme-Axford E, Morosky S, Bomberger J, Stolz DB, Jackson WT, Coyne CB. BPIFB3 regulates autophagy and coxsackievirus B replication through a noncanonical pathway independent of the core initiation machinery. *MBio*. 2014. <https://doi.org/doi:10.1128/mBio.02147-14>.
61. Wong J, Zhang J, Si X, et al. Autophagosome Supports Coxsackievirus B3 Replication in Host Cells. *J Virol*. 2008. <https://doi.org/doi:10.1128/JVI.00641-08>.
62. Alirezaei M, Flynn CT, Wood MR, Whitton JL. Pancreatic acinar cell-specific autophagy disruption reduces coxsackievirus replication and pathogenesis in vivo. *Cell Host Microbe*. 2012. <https://doi.org/doi:10.1016/j.chom.2012.01.014>.
63. Jackson WT, Giddings TH, Taylor MP, et al. Subversion of cellular autophagosomal machinery by RNA viruses. *PLoS Biol*. 2005. <https://doi.org/doi:10.1371/journal.pbio.0030156>.
64. Itakura E, Kishi-Itakura C, Mizushima N. The hairpin-type tail-anchored SNARE syntaxin 17 targets to autophagosomes for fusion with endosomes/lysosomes. *Cell*. 2012. <https://doi.org/doi:10.1016/j.cell.2012.11.001>.
65. McManus BM, Chow LH, Wilson JE, et al. Direct myocardial injury by enterovirus: A central role in the evolution of murine myocarditis. *Clin Immunol Immunopathol*. 1993. <https://doi.org/doi:10.1006/clin.1993.1113>.
66. Bodian D. Histopathologic basis of clinical findings in poliomyelitis. *Am J Med*. 1949. [https://doi.org/doi:10.1016/0002-9343\(49\)90130-8](https://doi.org/doi:10.1016/0002-9343(49)90130-8).
67. Muehlenbachs A, Bhatnagar J, Zaki SR. Tissue tropism, pathology and pathogenesis of enterovirus infection†. *J Pathol*. 2015. <https://doi.org/doi:10.1002/path.4438>.
68. Modlin JF, Onorato IM, McBean AM, et al. The Humoral Immune Response to Type 1 Oral Poliovirus Vaccine in Children Previously Immunized With Enhanced Potency Inactivated Poliovirus Vaccine or Live Oral Poliovirus Vaccine. *Am J Dis Child*. 1990. <https://doi.org/doi:10.1001/archpedi.1990.02150280102022>.

69. Olsen EGJ. What is myocarditis? *Heart Vessels*. 1985;1(1):1-3. <https://doi.org/doi:10.1007/BF02072348>.
70. Martino TA, Liu P, Sole MJ. Viral infection and the pathogenesis of dilated cardiomyopathy. *Circ Res*. 1994.
71. Beck MA, Levander OA, Handy J. Selenium deficiency and viral infection. *J Nutr*. 2003. <https://doi.org/doi:10.1093/jn/133.5.1463S>.
72. Lyden DC, Olszewski J, Feran M, Job LP, Huber SA. Coxsackievirus B-3-induced myocarditis. Effect of sex steroids on viremia and infectivity of cardiocytes. *Am J Pathol*. 1987. [PMC1899641](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1899641/).
73. Huber SA, Job LP, Woodruff JF. Sex-related differences in the pattern of coxsackievirus B-3-induced immune spleen cell cytotoxicity against virus-infected myofibers. *Infect Immun*. 1981. [PMC350588](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/350588/).
74. Huber SA, Pfaeffle B. Differential Th1 and Th2 cell responses in male and female BALB/c mice infected with coxsackievirus group B type 3. *J Virol*. 1994. [PMC236456](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/236456/).
75. Grodums EI, Dempster G. Myocarditis in experimental Coxsackie B-3 infection. *Can J Microbiol*. 1959;5:605-615. [PMC236456](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/236456/).
76. Mahrholdt H, Wagner A, Deluigi CC, et al. Presentation, patterns of myocardial damage, and clinical course of viral myocarditis. *Circulation*. 2006. <https://doi.org/doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.606509>.
77. Mason JW, O'Connell JB, Herskowitz A, et al. A clinical trial of immunosuppressive therapy for myocarditis. The Myocarditis Treatment Trial Investigators. *N Engl J Med*. 1995. <https://doi.org/doi:10.1056/NEJM199508033330501>.
78. Hufnagel G, Pankuweit S, Maisch B. Therapie der dilatativen Kardiomyopathie mit und ohne Entzündung. *Med Klin*. 1998;93(4):240-251. <https://doi.org/doi:10.1007/BF03044800>.
79. Kytö V, Sipilä J, Rautava P. The effects of gender and age on occurrence of clinically suspected myocarditis in adulthood. *Heart*. 2013. <https://doi.org/doi:10.1136/heartjnl-2013-304449>.
80. Fairweather DL, Cooper LT, Blauwet LA. Sex and Gender Differences in Myocarditis and Dilated Cardiomyopathy. *Curr Probl Cardiol*. 2013. <https://doi.org/doi:10.1016/j.cpcardiol.2012.07.003>.
81. G.W. Dec, I.F. Palacios, J.T. Fallon et al. Active myocarditis in the spectrum of acute dilated cardiomyopathies. *N Engl J Med*. 1985. <https://doi.org/doi:10.1056/NEJM198504043121404>.
82. Kim KS, Hufnagel G, Chapman NM, Tracy S. The group B coxsackieviruses and myocarditis. *Rev Med Virol*. 2001. <https://doi.org/doi:10.1002/rmv.326>.
83. Schultheiss H-P, Kühl U, Cooper LT, et al. The management of myocarditis. *Eur Heart J*. 2011. <https://doi.org/doi:10.1093/eurheartj/ehr165>.

84. Manolio TA, Baughman KL, Rodeheffer R, et al. Prevalence and etiology of idiopathic dilated cardiomyopathy (summary of a National Heart, Lung, and Blood Institute Workshop). *Am J Cardiol.* 1992. [https://doi.org/doi:10.1016/0002-9149\(92\)90901-A](https://doi.org/doi:10.1016/0002-9149(92)90901-A).
85. GBD 2013 Mortality and Causes of Death Collaborators. Global , regional and national levels of age-specific mortality and 240 causes of death , 1990-2013 : A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet.* 2015. [https://doi.org/doi:10.1016/S0140-6736\(14\)61682-2](https://doi.org/doi:10.1016/S0140-6736(14)61682-2).
86. Baboonian C, Treasure T. Meta-analysis of the association of enteroviruses with human heart disease. *Heart.* 1997;78(6):539-543. [PMCID1892342](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1892342/).
87. Pauschinger M, Bowles NE, Fuentes-Garcia FJ, et al. Detection of adenoviral genome in the myocardium of adult patients with idiopathic left ventricular dysfunction. *Circulation.* 1999. <https://doi.org/doi:10.1161/01.CIR.99.10.1348>.
88. Matsumori A, Matoba Y, Sasayama S. Dilated cardiomyopathy associated with hepatitis C virus infection. *Circulation.* 1995. <https://doi.org/doi:10.1161/01.CIR.92.9.2519>.
89. Maze SS, Adolph RJ. Myocarditis: Unresolved issues in diagnosis and treatment. *Clin Cardiol.* 1990. <https://doi.org/doi:10.1002/clc.4960130203>.
90. Strikas RA, Anderson LJ, Parker RA. Temporal and geographic patterns of isolates of nonpolio enterovirus in the united states, 1970-1983. *J Infect Dis.* 1986. <https://doi.org/doi:10.1093/infdis/153.2.346>.
91. Bodian D. Emerging concept of poliomyelitis infection. *Science (80-).* 1955. <https://doi.org/doi:10.1126/science.122.3159.105>.
92. Horstmann DM, Mccollum RW, Mascola AD. Viremia in Human Poliomyelitis. *J Exp Med.* 1954. <https://doi.org/doi:10.1084/jem.99.4.355>.
93. Chow LH, Gauntt CJ, McManus BM. Differential effects of myocarditic variants of Coxsackievirus B3 in inbred mice. A pathologic characterization of heart tissue damage. *Lab Invest.* 1991. [PMID1990209](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1990209/).
94. Woodruff JF. Viral myocarditis. A review. *Am J Pathol.* 1980. [PMCID1903609](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1903609/).
95. Tracy S, Höfling K, Pirruccello S, Lane PH, Reyna SM, Gauntt CJ. Group B coxsackievirus myocarditis and pancreatitis: Connection between viral virulence phenotypes in mice. *J Med Virol.* 2000. [https://doi.org/doi:10.1002/1096-9071\(200009\)62:1<70::AID-JMV11>3.0.CO;2-R](https://doi.org/doi:10.1002/1096-9071(200009)62:1<70::AID-JMV11>3.0.CO;2-R).
96. Klingel K, Stephan S, Sauter M, et al. Pathogenesis of murine enterovirus myocarditis: virus dissemination and immune cell targets. *J Virol.* 1996. [PMCID190986](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/190986/).
97. Melnick JL. Enteroviruses: Polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Channock RM, Melnick JL, Monath TP, RoizmanB, Straus SE. *Fields virology.* *Fields Virol.* 1996:655–712.

98. Xatzipsalti M, Kyraana S, Tsolia M, et al. Rhinovirus viremia in children with respiratory infections. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005. <https://doi.org/doi:10.1164/rccm.200502-315OC>.
99. Cheng H-Y, Huang Y-C, Yen T-Y, et al. The correlation between the presence of viremia and clinical severity in patients with enterovirus 71 infection: a multi-center cohort study. *BMC Infect Dis*. 2014. <https://doi.org/doi:10.1186/1471-2334-14-417>.
100. Kandolf R, Canu A, Hofschneider PH. Coxsackie B3 virus can replicate in cultured human foetal heart cells and is inhibited by interferon. *J Mol Cell Cardiol*. 1985. [https://doi.org/doi:10.1016/S0022-2828\(85\)80019-5](https://doi.org/doi:10.1016/S0022-2828(85)80019-5).
101. Saraste A, Arola A, Vuorinen T, et al. Cardiomyocyte apoptosis in experimental coxsackievirus B3 myocarditis. *Cardiovasc Pathol*. 2003. [https://doi.org/doi:10.1016/S1054-8807\(03\)00077-2](https://doi.org/doi:10.1016/S1054-8807(03)00077-2).
102. Henke A, Huber S, Stelzner A, Whitton JL. The role of CD8+ T lymphocytes in coxsackievirus B3-induced myocarditis. *J Virol*. 1995. [PMC189582](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/189582/).
103. Nishio R, Matsumori A, Shioi T, Ishida H, Sasayama S. Treatment of experimental viral myocarditis with interleukin-10. *Circulation*. 1999. <https://doi.org/doi:10.1161/01.CIR.100.10.1102>.
104. Woodruff JF, Woodruff JJ. Involvement of T lymphocytes in the pathogenesis of coxsackie virus B3 heart disease. *J Immunol (Baltimore, Md 1950)*. 1974;113(6):1726-1734. [PMID4610045](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4610045/).
105. Wolff PG, Kühl U, Schultheiss HP. Laminin distribution and autoantibodies to laminin in dilated cardiomyopathy and myocarditis. *Am Heart J*. 1989. [https://doi.org/doi:10.1016/0002-8703\(89\)90410-9](https://doi.org/doi:10.1016/0002-8703(89)90410-9).
106. Caforio ALP, Calabrese F, Angelini A, et al. A prospective study of biopsy-proven myocarditis: Prognostic relevance of clinical and aetiopathogenetic features at diagnosis. *Eur Heart J*. 2007. <https://doi.org/doi:10.1093/eurheartj/ehm076>.
107. Takata S, Nakamura H, Umemoto S, et al. Identification of autoantibodies with the corresponding antigen for repetitive coxsackievirus infection-induced cardiomyopathy. *Circ J*. 2004. <https://doi.org/doi:10.1253/circj.68.677>.
108. Fairweather DL, Rose NR. Coxsackievirus-induced myocarditis in mice: A model of autoimmune disease for studying immunotoxicity. *Methods*. 2007. <https://doi.org/doi:10.1016/j.ymeth.2006.07.009>.
109. Esfandiarei M, McManus BM. Molecular biology and pathogenesis of viral myocarditis. *Annu Rev Pathol*. 2008. <https://doi.org/doi:10.1146/annurev.pathmechdis.3.121806.151534>.
110. Vuorinen T, Kallajoki M, Hyypiä T, Vainionpää R. Coxsackievirus B3-induced acute pancreatitis: analysis of histopathological and viral parameters in a mouse model. *Br J Exp Pathol*. 1989. [PMC2040566](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2040566/).
111. Ramsingh AI. Coxsackieviruses and pancreatitis. *Front Biosci*. 1997. <https://doi.org/doi:10.2741/A227>.

112. Gauntt CJ, Godeny EK, Lutton CW. Host factors regulating viral clearance. *Pathol Immunopathol Res.* 1988. <https://doi.org/doi:10.1159/000157121>.
113. Huber SA, Lodge PA. Coxsackievirus B-3 myocarditis. Identification of different pathogenic mechanisms in DBA/2 and Balb/c mice. *Am J Pathol.* 1986. [PMC1888112](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1888112/).
114. Fairweather D, Stafford KA, Sung YK. Update on coxsackievirus B3 myocarditis. *Curr Opin Rheumatol.* 2012. <https://doi.org/doi:10.1097/BOR.0b013e328353372d>.
115. Schmidtke M, Merkle I, Klingel K, Hammerschmidt E, Zautner AE, Wutzler P. The viral genetic background determines the outcome of coxsackievirus B3 infection in outbred NMRI mice. *J Med Virol.* 2007. <https://doi.org/doi:10.1002/jmv.20933>.
116. Arnesjo B, Eden T, Ihse I, Nordenfelt E, Ursing B. Enterovirus infections in acute pancreatitis - a possible etiological connection. *Scand J Gastroenterol.* 1976. [PMID996429](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/996429/).
117. Foulis AK, Farquharson MA, Cameron SO, McGill M, Schönke H, Kandolf R. 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.* 1990. <https://doi.org/doi:10.1007/BF00403323>.
118. Leipner C, Grün K, Schneider I, Glück B, Sigusch HH, Stelzner A. Coxackievirus B3-induced myocarditis: Differences in the immune response of C57BL/6 and Balb/c mice. *Med Microbiol Immunol.* 2004. <https://doi.org/doi:10.1007/s00430-003-0199-5>.
119. Li M, Wang X, Xie Y, et al. Initial weight and virus dose: Two factors affecting the onset of acute coxsackievirus B3 myocarditis in C57BL/6 mouse - A histopathology-based study. *Cardiovasc Pathol.* 2013;22(1):96-101. <https://doi.org/doi:10.1016/j.carpath.2012.06.004>.
120. Koenig A, Buskiewicz I, Huber SA. Age-associated changes in estrogen receptor ratios correlate with increased female susceptibility to coxsackievirus B3-induced myocarditis. *Front Immunol.* 2017;8(NOV). <https://doi.org/doi:10.3389/fimmu.2017.01585>.
121. Kandolf R, Sauter M, Aepinus C, Schnorr JJ, Selinka HC, Klingel K. Mechanisms and consequences of enterovirus persistence in cardiac myocytes and cells of the immune system. *Virus Res.* 1999. [https://doi.org/doi:10.1016/S0168-1702\(99\)00041-6](https://doi.org/doi:10.1016/S0168-1702(99)00041-6).
122. Klingel K, McManus BM, Kandolf R. Enterovirus-infected immune cells of spleen and lymph nodes in the murine model of chronic myocarditis: a role in pathogenesis? *Eur Heart J.* 1995. https://doi.org/doi:10.1093/eurheartj/16.suppl_O.42.
123. Liu J, Xu C, Hsu LC, Luo Y, Xiang R, Chuang TH. A five-amino-acid motif in the undefined region of the TLR8 ectodomain is required for species-specific ligand recognition. *Mol Immunol.* 2010. <https://doi.org/doi:10.1016/j.molimm.2009.11.003>.
124. Yajima T. Viral myocarditis: Potential defense mechanisms within the cardiomyocyte against virus infection. *Future Microbiol.* 2011. <https://doi.org/doi:10.2217/fmb.11.40>.

125. Glück B, Schmidtke M, Merkle I, Stelzner A, Gemsa D. Persistent expression of cytokines in the chronic stage of CVB3-induced myocarditis in NMRI mice. *J Mol Cell Cardiol.* 2001. <https://doi.org/doi:10.1006/jmcc.2001.1416>.
126. Shioi T, Matsumori A, Sasayama S. Persistent expression of cytokine in the chronic stage of viral myocarditis in mice. *Circulation.* 1996;94(11):2930-2937. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.94.11.2930>
127. Kawai C. From myocarditis to cardiomyopathy: Mechanisms of inflammation and cell death: Learning from the past for the future. *Circulation.* 1999. <https://doi.org/doi:10.1161/01.CIR.99.8.1091>.
128. Mena I, Perry CM, Harkins S, Rodriguez F, Gebhard J, Whitton JL. The role of B lymphocytes in coxsackievirus B3 infection. *Am J Pathol.* 1999. [https://doi.org/doi:10.1016/S0002-9440\(10\)65223-6](https://doi.org/doi:10.1016/S0002-9440(10)65223-6).
129. Takeuchi O, Akira S. Review-Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell.* 2010. <https://doi.org/doi:10.1016/j.cell.2010.01.022>.
130. Crozat K, Hoebe K, Ugolini S, et al. *Jinx*, an MCMV susceptibility phenotype caused by disruption of *Unc13d*: a mouse model of type 3 familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *J Exp Med.* 2007. <https://doi.org/doi:10.1084/jem.20062447>.
131. Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- κ B by Toll-like receptor 3. *Nature.* 2001. <https://doi.org/doi:10.1038/35099560>.
132. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature.* 2000. <https://doi.org/doi:10.1038/35047123>.
133. Pestka S, Langer JA, Zoon KC, Samuel CE. Interferons and their Actions. *Annu Rev Biochem.* 1987. <https://doi.org/doi:10.1146/annurev.bi.56.070187.003455>.
134. Roberts RM, Liu L, Guo Q, Leaman D, Bixby J. The evolution of the type I interferons. *J Interf Cytokine Res Off J Int Soc Interf Cytokine Res.* 1998;18(10):805-816. <https://doi.org/doi:10.1089/jir.1998.18.805>.
135. Kühl U, Pauschinger M, Schwimmbeck PL, et al. Interferon- γ treatment eliminates cardiotropic viruses and improves left ventricular function in patients with myocardial persistence of viral genomes and left ventricular dysfunction. *Circulation.* 2003. <https://doi.org/doi:10.1161/01.CIR.0000072766.67150.51>.
136. Wessely R, Klingel K, Knowlton KU, Kandolf R. Cardiospecific infection with coxsackievirus B3 requires intact type I interferon signaling: Implications for mortality and early viral replication. *Circulation.* 2001. <https://doi.org/doi:10.1161/01.CIR.103.5.756>.
137. Deonarain R, Cerullo D, Fuse K, Liu PP, Fish EN. Protective role for interferon-beta in coxsackievirus B3 infection. *Circulation.* 2004. <https://doi.org/doi:10.1161/01.CIR.0000136824.73458.20>.

138. Jensen S, Thomsen AR. Sensing of RNA Viruses: a Review of Innate Immune Receptors Involved in Recognizing RNA Virus Invasion. *J Virol.* 2012. <https://doi.org/doi:10.1128/JVI.05738-11>.
139. Liu S, Cai X, Wu J, et al. Phosphorylation of innate immune adaptor proteins MAVS, STING, and TRIF induces IRF3 activation. *Science* (80-). 2015. <https://doi.org/doi:10.1126/science.aaa2630>.
140. Honda K, Takaoka A, Taniguchi T. Type I Interferon Gene Induction by the Interferon Regulatory Factor Family of Transcription Factors. *Immunity.* 2006. <https://doi.org/doi:10.1016/j.immuni.2006.08.009>.
141. Plataniias LC. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat Rev Immunol.* 2005. <https://doi.org/doi:10.1038/nri1604>.
142. Wang JP, Cerny A, Asher DR, Kurt-Jones EA, Bronson RT, Finberg RW. MDA5 and MAVS Mediate Type I Interferon Responses to Coxsackie B Virus. *J Virol.* 2010. <https://doi.org/doi:10.1128/JVI.00631-09>.
143. Negishi H, Osawa T, Ogami K, et al. A critical link between Toll-like receptor 3 and type II interferon signaling pathways in antiviral innate immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008. <https://doi.org/doi:10.1073/pnas.0810372105>.
144. Mukherjee A, Morosky SA, Delorme-Axford E, et al. The coxsackievirus B 3Cprotease cleaves MAVS and TRIF to attenuate host type I interferon and apoptotic signaling. *PLoS Pathog.* 2011. <https://doi.org/doi:10.1371/journal.ppat.1001311>.
145. Triantafyllou K, Orthopoulos G, Vakakis E, et al. Human cardiac inflammatory responses triggered by Coxsackie B viruses are mainly Toll-like receptor (TLR) 8-dependent. *Cell Microbiol.* 2005. <https://doi.org/doi:10.1111/j.1462-5822.2005.00537.x>.
146. Wang JP, Asher DR, Chan M, Kurt-Jones EA, Finberg RW. Cutting Edge: Antibody-Mediated TLR7-Dependent Recognition of Viral RNA. *J Immunol.* 2007. <https://doi.org/doi:10.4049/jimmunol.178.6.3363>.
147. Kemball CC, Alirezaei M, Whitton JL. Type B coxsackieviruses and their interactions with the innate and adaptive immune systems. *Future Microbiol.* 2010. <https://doi.org/doi:10.2217/fmb.10.101>.
148. Richer MJ, Lavallée DJ, Shanina I, Horwitz MS. Toll-like receptor 3 signalling on macrophages is required for survival following coxsackievirus B4 infection. *PLoS One.* 2009. <https://doi.org/doi:10.1371/journal.pone.0004127>.
149. Gorbea C, Makar KA, Pauschinger M, et al. A role for toll-like receptor 3 variants in host susceptibility to enteroviral myocarditis and dilated cardiomyopathy. *J Biol Chem.* 2010. <https://doi.org/doi:10.1074/jbc.M109.047464>.
150. Godeny EK, Gauntt CJ. Murine natural killer cells limit coxsackievirus B3 replication. *J Immunol.* 1987. [PMID3036947](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3036947/).

151. Huber SA, Job LP. Cellular immune mechanisms in Coxsackievirus group B, type 3 induced myocarditis in Balb/C mice. *Adv Exp Med Biol*. 1983. [PMID6307010](#).
152. Barin JG, Rose NR, Čiháková D. Macrophage diversity in cardiac inflammation: A review. *Immunobiology*. 2012. <https://doi.org/doi:10.1016/j.imbio.2011.06.009>.
153. Gauntt CJ, Godeny EK, Lutton CW, Fernandes G. Role of natural killer cells in experimental murine myocarditis. *Springer Semin Immunopathol*. 1989;11(1):51-59. <https://doi.org/doi:10.1007/BF00197084>.
154. Henke A, Spengler HP, Stelzner A, Nain M, Gemsa D. Lipopolysaccharide suppresses cytokine release from coxsackie virus-infected human monocytes. *Res Immunol*. 1992. [https://doi.org/doi:10.1016/0923-2494\(92\)80081-U](https://doi.org/doi:10.1016/0923-2494(92)80081-U).
155. Henke A, Mohr C, Sprenger H, et al. Coxsackievirus B3-induced production of tumor necrosis factor-alpha, IL-1 beta, and IL-6 in human monocytes. *J Immunol (Baltimore, Md 1950)*. 1992;148(7):2270-2277. [PMID1312105](#).
156. Poffenberger MC, Straka N, El Warry N, Fang D, Shanina I, Horwitz MS. Lack of IL-6 during coxsackievirus infection heightens the early immune response resulting in increased severity of chronic autoimmune myocarditis. *PLoS One*. 2009. <https://doi.org/doi:10.1371/journal.pone.0006207>.
157. Bonilla FA, Oettgen HC. Adaptive immunity. *J Allergy Clin Immunol*. 2010. <https://doi.org/doi:10.1016/j.jaci.2009.09.017>.
158. Wucherpfennig KW, Gagnon E, Call MJ, Huseby ES, Call ME. Structural biology of the T-cell receptor: insights into receptor assembly, ligand recognition, and initiation of signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010. <https://doi.org/doi:10.1101/cshperspect.a005140>.
159. Dorries R, Ter Meulen V. Specificity of IgM antibodies in acute human coxsackievirus B infections, analysed by indirect solid phase enzyme immunoassay and immunoblot technique. *J Gen Virol*. 1983. <https://doi.org/doi:10.1099/0022-1317-64-1-159>.
160. Lodge PA, Herzum M, Olszewski J, Huber SA. Coxsackievirus B-3 myocarditis. Acute and chronic forms of the disease caused by different immunopathogenic mechanisms. *Am J Pathol*. 1987. [PMC1899672](#).
161. Sauter P, Hober D. Mechanisms and results of the antibody-dependent enhancement of viral infections and role in the pathogenesis of coxsackievirus B-induced diseases. *Microbes Infect*. 2009. <https://doi.org/doi:10.1016/j.micinf.2009.01.005>.
162. Leipner C, Borchers M, Merkle I, Stelzner A. Coxsackievirus B3-induced myocarditis in MHC class II-deficient mice. *J Hum Virol*. 1999. [PMID10225212](#).
163. Hashimoto I, Komatsu T. Myocardial changes after infection with Coxsackie virus B3 in nude mice. *Br J Exp Pathol*. 1978. [PMC2041316](#).
164. Huber S a, Pfaeffle B. Differential Th1 and Th2 cell responses in male and female BALB/c mice infected with coxsackievirus group B type 3. *J Virol*. 1994. [PMC236456](#).

165. Jarasch N, Martin U, Zell R, Wutzler P, Henke A. Influence of pan-caspase inhibitors on coxsackievirus B3-infected CD19 + B lymphocytes. *Apoptosis*. 2007. <https://doi.org/doi:10.1007/s10495-007-0084-6>.
166. Geller TJ, Condie D. A case of protracted coxsackie virus meningoencephalitis in a marginally immunodeficient child treated successfully with intravenous immunoglobulin. *J Neurol Sci*. 1995. [https://doi.org/doi:10.1016/0022-510X\(94\)00261-L](https://doi.org/doi:10.1016/0022-510X(94)00261-L).
167. Chow LH, Beisel KW, McManus BM. Enteroviral infection of mice with severe combined immunodeficiency. Evidence for direct viral pathogenesis of myocardial injury. *Lab Invest*. 1992. [PMID1309927](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1309927/).
168. Sato S, Tsutsumi LR, Burke A, et al. Persistence of replicating coxsackievirus B3 in the athymic murine heart is associated with development of myocarditic lesions. *J Gen Virol*. 1994. <https://doi.org/doi:10.1099/0022-1317-75-11-2911>.
169. Schnurr DP, Schmidt NJ. Coxsackievirus B3 persistence and myocarditis in NFR nu/nu and +/-nu mice. *Med Microbiol Immunol*. 1984. <https://doi.org/doi:10.1007/BF02123563>.
170. Weinzierl AO, Rudolf D, Maurer D, et al. Identification of HLA-A*01- and HLA-A*02-restricted CD8+ T-cell epitopes shared among group B enteroviruses. *J Gen Virol*. 2008. <https://doi.org/doi:10.1099/vir.0.2008/000711-0>.
171. Jäkel S, Kuckelkorn U, Szalay G, et al. Differential interferon responses enhance viral epitope generation by myocardial immunoproteasomes in murine enterovirus myocarditis. *Am J Pathol*. 2009. <https://doi.org/doi:10.2353/ajpath.2009.090033>.
172. Voigt A, Jäkel S, Textoris-Taube K, et al. Generation of in silico predicted coxsackievirus B3-derived MHC class I epitopes by proteasomes. *Amino Acids*. 2010. <https://doi.org/doi:10.1007/s00726-009-0434-5>.
173. Kemball CC, Harkins S, Whitmire JK, Flynn CT, Feuer R, Whitton JL. Coxsackievirus B3 inhibits antigen presentation in vivo, exerting a profound and selective effect on the MHC class I pathway. *PLoS Pathog*. 2009. <https://doi.org/doi:10.1371/journal.ppat.1000618>.
174. Cornell CT, Kiosses WB, Harkins S, Whitton JL. Inhibition of Protein Trafficking by Coxsackievirus B3: Multiple Viral Proteins Target a Single Organelle. *J Virol*. 2006. <https://doi.org/doi:10.1128/JVI.02572-05>.
175. Wessels E, Duijsings D, Notebaart RA, et al. A proline-rich region in the coxsackievirus 3A protein is required for the protein to inhibit endoplasmic reticulum-to-golgi transport. *J Virol*. 2005. <https://doi.org/doi:10.1128/JVI.79.8.5163-5173.2005>.
176. Wessels E, Duijsings D, Niu TK, et al. A Viral Protein that Blocks Arf1-Mediated COP-I Assembly by Inhibiting the Guanine Nucleotide Exchange Factor GBF1. *Dev Cell*. 2006. <https://doi.org/doi:10.1016/j.devcel.2006.06.005>.

177. Wessels E, Duijsings D, Lanke KHW, et al. Effects of Picornavirus 3A Proteins on Protein Transport and GBF1-Dependent COP-I Recruitment. *J Virol.* 2006. <https://doi.org/doi:10.1128/JVI.01225-06>.
178. De Jong AS, Visch HJ, De Mattia F, et al. The coxsackievirus 2B protein increases efflux of ions from the endoplasmic reticulum and Golgi, thereby inhibiting protein trafficking through the Golgi. *J Biol Chem.* 2006. <https://doi.org/doi:10.1074/jbc.M511766200>.
179. de Jong AS, de Mattia F, Van Dommelen MM, et al. Functional Analysis of Picornavirus 2B Proteins: Effects on Calcium Homeostasis and Intracellular Protein Trafficking. *J Virol.* 2008. <https://doi.org/doi:10.1128/JVI.02076-07>.
180. Kim YJ, Yun SH, Lim BK, et al. Systemic analysis of a novel coxsackievirus gene delivery system in a mouse model. *J Microbiol Biotechnol.* 2009. <https://doi.org/doi:10.4014/jmb.0803.237>.
181. Tracy S, Oberste MS, Drescher KM. *Group B Coxsackieviruses*. Springer Science & Business Media; 2008.
182. Dan M, Chantler JK. A genetically engineered attenuated coxsackievirus B3 strain protects mice against lethal infection. *J Virol.* 2005. <https://doi.org/doi:10.1128/jvi.79.14.9285-9295.2005>.
183. Hunziker IP, Cornell CT, Whitton JL. Deletions within the 5'UTR of coxsackievirus B3: Consequences for virus translation and replication. *Virology.* 2007;360(1):120-128. <https://doi.org/doi:10.1016/j.virol.2006.09.041>.
184. Lim CS, Chua JJE, Wilkerson J, Chow VTK. Differential dengue cross-reactive and neutralizing antibody responses in BALB/c and Swiss albino mice induced by immunization with flaviviral vaccines and by infection with homotypic dengue-2 virus strains. *Viral Immunol.* 2006;19(1):33-41. <https://doi.org/doi:10.1089/vim.2006.19.33>.
185. Yanagawa B, Spiller OB, Proctor DG, et al. Soluble recombinant coxsackievirus and adenovirus receptor abrogates coxsackievirus B3-mediated pancreatitis and myocarditis in mice. *J Infect Dis.* 2004. <https://doi.org/doi:10.1086/382598>.
186. Galama JMD, Vogels MTE, Jansen GH, Gielen M, Heesen FWA. Antibodies against enteroviruses in intravenous Ig preparations: Great variation in titres and poor correlation with the incidence of circulating serotypes. *J Med Virol.* 1997. [https://doi.org/doi:10.1002/\(SICI\)1096-9071\(199711\)53:3<273::AID-JMV16>3.0.CO;2-I](https://doi.org/doi:10.1002/(SICI)1096-9071(199711)53:3<273::AID-JMV16>3.0.CO;2-I).
187. Crotty S, Maag D, Arnold JJ, et al. The broad-spectrum antiviral ribonucleoside ribavirin is an RNA virus mutagen. *Nat Med.* 2000. <https://doi.org/doi:10.1038/82191>.
188. Crotty S, Andino R. Implications of high RNA virus mutation rates: Lethal mutagenesis and the antiviral drug ribavirin. *Microbes Infect.* 2002. [https://doi.org/doi:10.1016/S1286-4579\(02\)00008-4](https://doi.org/doi:10.1016/S1286-4579(02)00008-4).

189. Schmidtke M, Hammerschmidt E, Schüler S, et al. Susceptibility of coxsackievirus B3 laboratory strains and clinical isolates to the capsid function inhibitor pleconaril: Antiviral studies with virus chimeras demonstrate the crucial role of amino acid 1092 in treatment. *J Antimicrob Chemother.* 2005. <https://doi.org/doi:10.1093/jac/dki263>.
190. Strating JRPM, van der Linden L, Albulescu L, et al. Itraconazole inhibits enterovirus replication by targeting the oxysterol-binding protein. *Cell Rep.* 2015. <https://doi.org/doi:10.1016/j.celrep.2014.12.054>.
191. Yuan J, Cheung PKA, Zhang HM, Chau D, Yang D. Inhibition of coxsackievirus B3 replication by small interfering RNAs requires perfect sequence match in the central region of the viral positive strand. *J Virol.* 2005. <https://doi.org/doi:10.1128/JVI.79.4.2151-2159.2005>.
192. Tan EL, Wong APY, Poh CL. Development of potential antiviral strategy against coxsackievirus B4. *Virus Res.* 2010. <https://doi.org/doi:10.1016/j.virusres.2010.02.017>.
193. Werk D, Schubert S, Lindig V, et al. Developing an effective RNA interference strategy against a plus-strand RNA virus: Silencing of coxsackievirus B3 and its cognate coxsackievirus-adenovirus receptor. *Biol Chem.* 2005. <https://doi.org/doi:10.1515/BC.2005.100>.
194. Sin J, Mangale V, Thienphrapa W, Gottlieb RA, Feuer R. Recent progress in understanding coxsackievirus replication, dissemination, and pathogenesis. *Virology.* 2015. <https://doi.org/doi:10.1016/j.virol.2015.06.006>.
195. Janssen HLA, Reesink HW, Lawitz EJ, et al. Treatment of HCV Infection by Targeting MicroRNA. *N Engl J Med.* 2013. <https://doi.org/doi:10.1056/NEJMoa1209026>.
196. Chakraborty C, Sharma AR, Sharma G, Doss CGP, Lee SS. Therapeutic miRNA and siRNA: Moving from Bench to Clinic as Next Generation Medicine. *Mol Ther - Nucleic Acids.* 2017. <https://doi.org/doi:10.1016/j.omtn.2017.06.005>.
197. Gottlieb J, Zamora MR, Hodges T, et al. ALN-RSV01 for prevention of bronchiolitis obliterans syndrome after respiratory syncytial virus infection in lung transplant recipients. *J Hear Lung Transplant.* 2016. <https://doi.org/doi:10.1016/j.healun.2015.08.012>.
198. Hubé F, Francastel C. “Pocket-sized RNA-Seq”: A Method to Capture New Mature microRNA Produced from a Genomic Region of Interest. *Non-coding RNA.* 2015;1(2):127-138. <https://doi.org/doi:10.3390/ncrna1020127>.
199. Amaral PP, Mattick JS. Noncoding RNA in development. *Mamm Genome.* 2008. <https://doi.org/doi:10.1007/s00335-008-9136-7>.
200. Amaral PP, Dinger ME, Mattick JS. Non-coding RNAs in homeostasis, disease and stress responses: An evolutionary perspective. *Brief Funct Genomics.* 2013. <https://doi.org/doi:10.1093/bfgp/elt016>.
201. Berindan-Neagoe I, Calin GA. Molecular pathways: microRNAs, cancer cells, and microenvironment. *Clin Cancer Res An Off J Am Assoc Cancer Res.* 2014;20(24):6247-6253. <https://doi.org/doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-2500>.

202. Lam JKW, Chow MYT, Zhang Y, Leung SWS. siRNA versus miRNA as therapeutics for gene silencing. *Mol Ther - Nucleic Acids*. 2015. <https://doi.org/doi:10.1038/mtna.2015.23>.
203. Kelly EJ, Hadac EM, Greiner S, Russell SJ. Engineering microRNA responsiveness to decrease virus pathogenicity. *Nat Med*. 2008;14(11):1278-1283. <https://doi.org/doi:10.1038/nm.1776>.
204. Bader AG, Brown D, Stoudemire J, Lammers P. Developing therapeutic microRNAs for cancer. *Gene Ther*. 2011;18(12):1121-1126. <https://doi.org/doi:10.1038/gt.2011.79>.
205. Chandra PK, Kundu AK, Hazari S, et al. Inhibition of hepatitis C virus replication by intracellular delivery of multiple siRNAs by nanosomes. *Mol Ther*. 2012;20(9):1724-1736. <https://doi.org/doi:10.1038/mt.2012.107>.
206. Daka A, Peer D. RNAi-based nanomedicines for targeted personalized therapy. *Adv Drug Deliv Rev*. 2012;64(13):1508-1521. <https://doi.org/doi:10.1016/j.addr.2012.08.014>.
207. Agrawal N, Dasaradhi PVN, Mohammed A, Malhotra P, Bhatnagar RK, Mukherjee SK. RNA Interference: Biology, Mechanism, and Applications. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2003;67(4):657-685. <https://doi.org/doi:10.1128/MMBR.67.4.657-685.2003>.
208. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998. <https://doi.org/doi:10.1038/35888>.
209. Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21±nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*. 2001. <https://doi.org/doi:10.1038/35078107>.
210. Hammond SM, Boettcher S, Caudy AA, Kobayashi R, Hannon GJ. Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science (80-)*. 2001. <https://doi.org/doi:10.1126/science.1064023>.
211. Bartel DP. MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell*. 2009. <https://doi.org/doi:10.1016/j.cell.2009.01.002>.
212. Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014. doi:10.1038/nrm3838.
213. Lee I, Ajay SS, Jong IY, et al. New class of microRNA targets containing simultaneous 5'-UTR and 3'-UTR interaction sites. *Genome Res*. 2009. <https://doi.org/doi:10.1101/gr.089367.108>.
214. Grey F, Tirabassi R, Meyers H, et al. A viral microRNA down-regulates multiple cell cycle genes through mRNA 5'UTRs. *PLoS Pathog*. 2010. <https://doi.org/doi:10.1371/journal.ppat.1000967>.
215. Duursma AM, Kedde M, Schrier M, Le Sage C, Agami R. miR-148 targets human DNMT3b protein coding region. *RNA*. 2008. <https://doi.org/doi:10.1261/rna.972008>.
216. Rigoutsos I. New tricks for animal micrornas: Targeting of amino acid coding regions at conserved and nonconserved sites. *Cancer Res*. 2009. <https://doi.org/doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-0352>.

217. Jopling CL, Yi MK, Lancaster AM, Lemon SM, Sarnow P. Molecular biology: Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science* (80-). 2005. <https://doi.org/doi:10.1126/science.1113329>.
218. Triboulet R, Mari B, Lin YL, et al. Suppression of MicroRNA-silencing pathway by HIV-1 during virus replication. *Science* (80-). 2007. <https://doi.org/doi:10.1007/s10812-011-9439-4>.
219. Ye X, Zhang HM, Qiu Y, et al. Cocksackievirus-Induced miR-21 Disrupts Cardiomyocyte Interactions via the Downregulation of Intercalated Disk Components. *PLoS Pathog*. 2014. <https://doi.org/doi:10.1371/journal.ppat.1004070>.
220. Tong L, Lin L, Wu S, et al. MiR-10*up-regulates coxsackievirus B3 biosynthesis by targeting the 3D-coding sequence. *Nucleic Acids Res*. 2013. <https://doi.org/doi:10.1093/nar/gkt058>.
221. Corsten MF, Papageorgiou A, Verhesen W, et al. MicroRNA Profiling Identifies MicroRNA-155 as an Adverse Mediator of Cardiac Injury and Dysfunction during Acute Viral Myocarditis. *Circ Res*. 2012. <https://doi.org/doi:10.1161/CIRCRESAHA.112.267443>.
222. Umbach JL, Kramer MF, Jurak I, Karnowski HW, Coen DM, Cullen BR. MicroRNAs expressed by herpes simplex virus 1 during latent infection regulate viral mRNAs. *Nature*. 2008. <https://doi.org/doi:10.1038/nature07103>.
223. Pfeffer S, Zavolan M, Grässer FA, et al. Identification of Virus-Encoded MicroRNAs. *Science* (80-). 2004. <https://doi.org/doi:10.1126/science.1096781>.
224. Dhungel B, Ramlogan-Steel CA, Steel JC. Microrna-regulated gene delivery systems for research and therapeutic purposes. *Molecules*. 2018. <https://doi.org/doi:10.3390/molecules23071500>.
225. Jiang Q, Meng X, Meng L, et al. Small indels induced by CRISPR/Cas9 in the 5' region of microRNA lead to its depletion and Drosha processing retardance. *RNA Biol*. 2014. <https://doi.org/doi:10.1080/15476286.2014.996067>.
226. Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell*. 2004. [https://doi.org/doi:10.1016/S0092-8674\(04\)00045-5](https://doi.org/doi:10.1016/S0092-8674(04)00045-5).
227. Kim VN, Han J, Siomi MC. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009. <https://doi.org/doi:10.1038/nrm2632>.
228. Okada C, Yamashita E, Lee SJ, et al. A high-Resolution structure of the pre-microRNA nuclear export machinery. *Science* (80-). 2009. <https://doi.org/doi:10.1126/science.1178705>.
229. Bartel DP. Metazoan MicroRNAs. *Cell*. 2018. <https://doi.org/doi:10.1016/j.cell.2018.03.006>.
230. Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: Are the answers in sight? *Nat Rev Genet*. 2008. <https://doi.org/doi:10.1038/nrg2290>.
231. Yang S, Phillips MD, Betel D, et al. Widespread regulatory activity of vertebrate microRNA* species. *RNA*. 2011. <https://doi.org/doi:10.1261/rna.2537911>.

232. Biasiolo M, Sales G, Lionetti M, et al. Impact of host genes and strand selection on miRNA and miRNA* expression. *PLoS One*. 2011. <https://doi.org/doi:10.1371/journal.pone.0023854>.
233. Yang X, Du WW, Li H, et al. Both mature miR-17-5p and passenger strand miR-17-3p target TIMP3 and induce prostate tumor growth and invasion. *Nucleic Acids Res*. 2013. <https://doi.org/doi:10.1093/nar/gkt680>.
234. Fabian MR, Sonenberg N, Filipowicz W. Regulation of mRNA Translation and Stability by microRNAs. *Annu Rev Biochem*. 2010. <https://doi.org/doi:10.1146/annurev-biochem-060308-103103>.
235. Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM. Principles of microRNA-target recognition. In: *PLoS Biology*. ; 2005. <https://doi.org/doi:10.1371/journal.pbio.0030085>.
236. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*. 2005. <https://doi.org/doi:10.1016/j.cell.2004.12.035>.
237. Doench JG, Sharp PA. Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev*. 2004. <https://doi.org/doi:10.1101/gad.1184404>.
238. Gentner B, Naldini L. Exploiting microRNA regulation for genetic engineering. *Tissue Antigens*. 2012. <https://doi.org/doi:10.1111/tan.12002>.
239. Grimson A, Farh KKH, Johnston WK, Garrett-Engle P, Lim LP, Bartel DP. MicroRNA Targeting Specificity in Mammals: Determinants beyond Seed Pairing. *Mol Cell*. 2007. <https://doi.org/doi:10.1016/j.molcel.2007.06.017>.
240. Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev*. 2001. <https://doi.org/doi:10.1101/gad.862301>.
241. Denzler R, McGeary SE, Title AC, Agarwal V, Bartel DP, Stoffel M. Impact of MicroRNA Levels, Target-Site Complementarity, and Cooperativity on Competing Endogenous RNA-Regulated Gene Expression. *Mol Cell*. 2016. <https://doi.org/doi:10.1016/j.molcel.2016.09.027>.
242. Geisler A, Schön C, Gröbl T, et al. Application of mutated miR-206 target sites enables skeletal muscle-specific silencing of transgene expression of cardiotropic AAV9 vectors. In: *Molecular Therapy*. ; 2013. <https://doi.org/doi:10.1038/mt.2012.276>.
243. Kim SJ, Lee CH, Lee S-W. Targeting the MicroRNA Passenger Strand for Regulating Therapeutic Transgenes. *Nucleic Acid Ther*. 2015. <https://doi.org/doi:10.1089/nat.2015.0543>.
244. Sakurai F, Katayama K, Mizuguchi H. MicroRNA-regulated transgene expression systems for gene therapy and virotherapy. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2011. [PMID21622184](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21622184/).
245. Mullokandov G, Baccarini A, Ruzo A, et al. High-throughput assessment of microRNA activity and function using microRNA sensor and decoy libraries. *Nat Methods*. 2012. <https://doi.org/doi:10.1038/nmeth.2078>.

246. Geisler A, Jungmann A, Kurreck J, et al. MicroRNA122-regulated transgene expression increases specificity of cardiac gene transfer upon intravenous delivery of AAV9 vectors. *Gene Ther.* 2011. <https://doi.org/doi:10.1038/gt.2010.141>.
247. Kozomara A, Hunt S, Ninova M, Griffiths-Jones S, Ronshaugen M. Target repression induced by endogenous microRNAs: Large differences, small effects. *PLoS One.* 2014. <https://doi.org/doi:10.1371/journal.pone.0104286>.
248. Brown BD, Gentner B, Cantore A, et al. Endogenous microRNA can be broadly exploited to regulate transgene expression according to tissue, lineage and differentiation state. *Nat Biotechnol.* 2007. <https://doi.org/doi:10.1038/nbt1372>.
249. Geisler A, Fechner H. MicroRNA-regulated viral vectors for gene therapy. *World J Exp Med.* 2016. <https://doi.org/doi:10.5493/wjem.v6.i2.37>.
250. Brown BD, Naldini L. Exploiting and antagonizing microRNA regulation for therapeutic and experimental applications. *Nat Rev Genet.* 2009. <https://doi.org/doi:10.1038/nrg2628>.
251. Wu C, Lin J, Hong M, et al. Combinatorial control of suicide gene expression by tissue-specific promoter and microRNA regulation for cancer therapy. *Mol Ther.* 2009. <https://doi.org/doi:10.1038/mt.2009.225>.
252. Forman JJ, Collier HA. The code within the code: MicroRNAs target coding regions. *Cell Cycle.* 2010. <https://doi.org/doi:10.4161/cc.9.8.11202>.
253. Ylosmaki E, Hakkarainen T, Hemminki A, Visakorpi T, Andino R, Saksela K. Generation of a Conditionally Replicating Adenovirus Based on Targeted Destruction of E1A mRNA by a Cell Type-Specific MicroRNA. *J Virol.* 2008. <https://doi.org/doi:10.1128/JVI.01608-08>.
254. Lytle JR, Yario TA, Steitz JA. Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR. *Proc Natl Acad Sci.* 2007. <https://doi.org/doi:10.1073/pnas.0703820104>.
255. Papapetrou EP, Kovalovsky D, Beloeil L, Sant'Angelo D, Sadelain M. Harnessing endogenous miR-181a to segregate transgenic antigen receptor expression in developing versus post-thymic T cells in murine hematopoietic chimeras. *J Clin Invest.* 2009. <https://doi.org/doi:10.1172/JCI37216>.
256. Haas G, Cetin S, Messmer M, et al. Identification of factors involved in target RNA-directed microRNA degradation. *Nucleic Acids Res.* 2016. <https://doi.org/doi:10.1093/nar/gkw040>.
257. Mayya VK, Duchaine TF. On the availability of microRNA-induced silencing complexes, saturation of microRNA-binding sites and stoichiometry. *Nucleic Acids Res.* 2015. <https://doi.org/doi:10.1093/nar/gkv720>.
258. Arvey A, Larsson E, Sander C, Leslie CS, Marks DS. Target mRNA abundance dilutes microRNA and siRNA activity. *Mol Syst Biol.* 2010. <https://doi.org/doi:10.1038/msb.2010.24>.
259. Gentner B, Schira G, Giustacchini A, et al. Stable knockdown of microRNA in vivo by lentiviral vectors. *Nat Methods.* 2009. <https://doi.org/doi:10.1038/nmeth.1277>.

260. Ebert MS, Neilson JR, Sharp PA. MicroRNA sponges: Competitive inhibitors of small RNAs in mammalian cells. *Nat Methods*. 2007. <https://doi.org/doi:10.1038/nmeth1079>.
261. Grimm D, Büning H. Small but increasingly mighty - Latest advances in AAV vector research, design and evolution. *Hum Gene Ther*. 2017. <https://doi.org/doi:10.1089/hum.2017.172>.
262. Ameres SL, Martinez J, Schroeder R. Molecular Basis for Target RNA Recognition and Cleavage by Human RISC. *Cell*. 2007. <https://doi.org/doi:10.1016/j.cell.2007.04.037>.
263. Tay FC, Lim JK, Zhu H, Hin LC, Wang S. Using artificial microRNA sponges to achieve microRNA loss-of-function in cancer cells. *Adv Drug Deliv Rev*. 2015. <https://doi.org/doi:10.1016/j.addr.2014.05.010>.
264. Xie J, Xie Q, Zhang H, et al. MicroRNA-regulated, systemically delivered rAAV9: A step closer to CNS-restricted transgene expression. *Mol Ther*. 2011. <https://doi.org/doi:10.1038/mt.2010.279>.
265. Broderick JA, Salomon WE, Ryder SP, Aronin N, Zamore PD. Argonaute protein identity and pairing geometry determine cooperativity in mammalian RNA silencing. *RNA*. 2011. <https://doi.org/doi:10.1261/rna.2778911>.
266. Sætrom P, Heale BSE, Snøve O, Aagaard L, Alluin J, Rossi JJ. Distance constraints between microRNA target sites dictate efficacy and cooperativity. *Nucleic Acids Res*. 2007. <https://doi.org/doi:10.1093/nar/gkm133>.
267. Hirosawa M, Fujita Y, Parr CJC, et al. Cell-type-specific genome editing with a microRNA-responsive CRISPR-Cas9 switch. *Nucleic Acids Res*. 2017. <https://doi.org/doi:10.1093/nar/gkx309>.
268. Di Stefano B, Maffioletti SM, Gentner B, et al. A microRNA-based system for selecting and maintaining the pluripotent state in human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells*. 2011. <https://doi.org/doi:10.1002/stem.726>.
269. Bofill-De Ros X, Rovira-Rigau M, Fillat C. Implications of MicroRNAs in Oncolytic Virotherapy. *Front Oncol*. 2017. <https://doi.org/doi:10.3389/fonc.2017.00142>.
270. Ruiz AJ, Russell SJ. MicroRNAs and oncolytic viruses. *Curr Opin Virol*. 2015. <https://doi.org/doi:10.1016/j.coviro.2015.03.007>.
271. Yao W, Guo G, Zhang Q, Fan L, Wu N, Bo Y. The application of multiple miRNA response elements enables oncolytic adenoviruses to possess specificity to glioma cells. *Virology*. 2014. <https://doi.org/doi:10.1016/j.virol.2014.04.007>.
272. Callegari E, Elamin BK, D'Abundo L, et al. Anti-Tumor Activity of a miR-199-dependent Oncolytic Adenovirus. *PLoS One*. 2013. <https://doi.org/doi:10.1371/journal.pone.0073964>.
273. Ros XB De, Gironella M, Fillat C. MiR-148a- And miR-216a-regulated Oncolytic Adenoviruses Targeting Pancreatic Tumors Attenuate Tissue Damage Without Perturbation of miRNA Activity. *Mol Ther*. 2014. <https://doi.org/doi:10.1038/mt.2014.98>.

274. Fu X, Rivera A, Tao L, De Geest B, Zhang X. Construction of an oncolytic herpes simplex virus that precisely targets hepatocellular carcinoma cells. *Mol Ther*. 2012. <https://doi.org/doi:10.1038/mt.2011.265>.
275. Hikichi M, Kidokoro M, Haraguchi T, et al. MicroRNA regulation of glycoprotein B5R in oncolytic vaccinia virus reduces viral pathogenicity without impairing its antitumor efficacy. *Mol Ther*. 2011. <https://doi.org/doi:10.1038/mt.2011.36>.
276. Lauring AS, Jones JO, Andino R. Rationalizing the development of live attenuated virus vaccines. *Nat Biotechnol*. 2010. <https://doi.org/doi:10.1038/nbt.1635>.
277. Schaar K, Geisler A, Kraus M, et al. Anti-adenoviral Artificial MicroRNAs Expressed from AAV9 Vectors Inhibit Human Adenovirus Infection in Immunosuppressed Syrian Hamsters. *Mol Ther - Nucleic Acids*. 2017;8:300-316. <https://doi.org/doi:10.1016/j.omtn.2017.07.002>.
278. Fechner H, Sipo I, Westermann D, et al. Cardiac-targeted RNA interference mediated by an AAV9 vector improves cardiac function in coxsackievirus B3 cardiomyopathy. *J Mol Med*. 2008. <https://doi.org/doi:10.1007/s00109-008-0363-x>.
279. Slifka MK, Pagarigan R, Mena I, Feuer R, Whitton JL. Using recombinant coxsackievirus B3 to evaluate the induction and protective efficacy of CD8+ T cells during picornavirus infection. *J Virol*. 2001. <https://doi.org/doi:10.1128/JVI.75.5.2377-2387.2001>.
280. Feuer R, Mena I, Pagarigan R, Slifka MK, Whitton JL. Cell cycle status affects coxsackievirus replication, persistence, and reactivation in vitro. *J Virol*. 2002. <https://doi.org/doi:10.1016/j.biotechadv.2011.08.021.Secreted>.
281. Knowlton KU, Jeon ES, Berkley N, Wessely R, Huber S. A mutation in the puff region of VP2 attenuates the myocarditic phenotype of an infectious cDNA of the Woodruff variant of coxsackievirus B3. *J Virol*. 1996. [PMC190851](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/190851/).
282. Cardullo RA, Agrawal S, Flores C, Zamecnik PC, Wolf DE. Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988. <https://doi.org/doi:10.1109/ISCAS.2008.4542133>.
283. Mao F, Leung WY, Xin X. Characterization of EvaGreen and the implication of its physicochemical properties for qPCR applications. *BMC Biotechnol*. 2007. <https://doi.org/doi:10.1186/1472-6750-7-76>.
284. Hvid H, Thorup I, Oleksiewicz MB, Sjögren I, Jensen HE. An alternative method for preparation of tissue sections from the rat mammary gland. *Exp Toxicol Pathol*. 2011. <https://doi.org/doi:10.1016/j.etp.2010.02.005>.
285. Mullany LE, Herrick JS, Wolff RK, Slattery ML. MicroRNA Seed Region Length Impact on Target Messenger RNA Expression and Survival in Colorectal Cancer. *PLoS One*. 2016;11(4):e0154177. <https://doi.org/doi:10.1371/journal.pone.0154177>.

286. Stein EA, Pinkert S, Becher PM, et al. Combination of RNA interference and virus receptor trap exerts additive antiviral activity in coxsackievirus B3-induced myocarditis in mice. *J Infect Dis.* 2015;211(4):613-622. <https://doi.org/doi:10.1093/infdis/jiu504>.
287. Becher PM, Gotzhein F, Klingel K, et al. Cardiac Function Remains Impaired Despite Reversible Cardiac Remodeling after Acute Experimental Viral Myocarditis. *J Immunol Res.* 2017. <https://doi.org/doi:10.1155/2017/6590609>.
288. Tschöpe C, Westermann D, Steendijk P, et al. Hemodynamic characterization of left ventricular function in experimental coxsackieviral myocarditis: Effects of carvedilol and metoprolol. *Eur J Pharmacol.* 2004. <https://doi.org/doi:10.1016/j.ejphar.2004.03.032>.
289. Kallewaard NL, Zhang L, Chen JW, Guttenberg M, Sanchez MD, Bergelson JM. Tissue-Specific Deletion of the Coxsackievirus and Adenovirus Receptor Protects Mice from Virus-Induced Pancreatitis and Myocarditis. *Cell Host Microbe.* 2009;6(1):91-98. <https://doi.org/doi:10.1016/j.chom.2009.05.018>.
290. Persichino J, Garrison R, Krishnan R, Sutjita M. Effusive-constrictive pericarditis, hepatitis, and pancreatitis in a patient with possible coxsackievirus B infection: A case report. *BMC Infect Dis.* 2016. <https://doi.org/doi:10.1186/s12879-016-1752-3>.
291. Coplan NL, Atallah V, Mediratta S, Bruno MS, DePasquale NP. Cardiac, pancreatic, and liver abnormalities in a patient with coxsackie-B infection. *Am J Med.* 1996;101(3):325-326. [https://doi.org/doi:10.1016/S0002-9343\(97\)89436-3](https://doi.org/doi:10.1016/S0002-9343(97)89436-3).
292. Selinka HC, Wolde A, Sauter M, Kandolf R, Klingel K. Virus-receptor interactions of coxsackie B viruses and their putative influence on cardiotropism. *Med Microbiol Immunol.* 2004. <https://doi.org/doi:10.1007/s00430-003-0193-y>.
293. Kong XY, Du YQ, Li L, et al. Plasma mir-216a as a potential marker of pancreatic injury in a rat model of acute pancreatitis. *World J Gastroenterol.* 2010. <https://doi.org/doi:10.3748/wjg.v16.i36.4599>.
294. Dixit E, Boulant S, Zhang Y, et al. Peroxisomes Are Signaling Platforms for Antiviral Innate Immunity. *Cell.* 2010. <https://doi.org/doi:10.1016/j.cell.2010.04.018>.
295. Gomez RM, Cui X, Castagnino CG, Berria MI. Differential behaviour in pancreas and heart of two coxsackievirus B3 variants. *Intervirology.* 1993. <https://doi.org/doi:10.1159/000150334>.
296. Merkle I, Tonew M, Glück B, Schmidtke M, Egerer R, Stelzner A. Coxsackievirus B3-induced chronic myocarditis in outbred NMRI mice. *J Hum Virol.* 1999. [PMID10774554](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10774554/).
297. Drescher KM, Kono K, Bopegamage S, Carson SD, Tracy S. Coxsackievirus B3 infection and type 1 diabetes development in NOD mice: Insulinitis determines susceptibility of pancreatic islets to virus infection. *Virology.* 2004. <https://doi.org/doi:10.1016/j.virol.2004.06.049>.
298. Bopegamage S, Kovacova J, Vargova A, et al. Coxsackie B virus infection of mice: Inoculation by the oral route protects the pancreas from damage, but not from infection. *J Gen Virol.* 2005. <https://doi.org/doi:10.1099/vir.0.81249-0>.

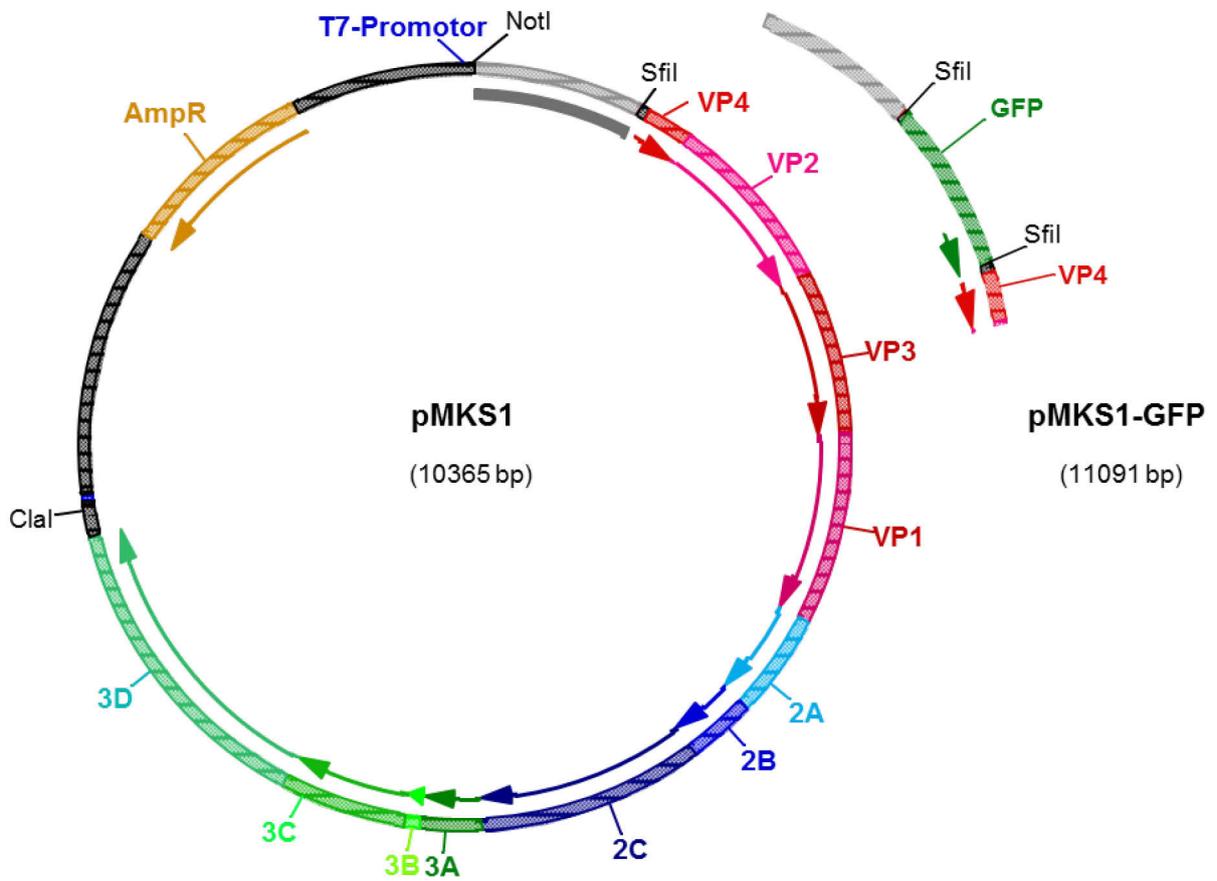
299. Tracy S, Smithee S, Alhazmi A, Chapman N. Coxsackievirus can persist in murine pancreas by deletion of 5' terminal genomic sequences. *J Med Virol.* 2015. <https://doi.org/doi:10.1002/jmv.24039>.
300. Willcox a., Richardson SJ, Bone a. J, Foulis a. K, Morgan NG. Immunohistochemical analysis of the relationship between islet cell proliferation and the production of the enteroviral capsid protein, VP1, in the islets of patients with recent-onset type 1 diabetes. *Diabetologia.* 2011. <https://doi.org/doi:10.1007/s00125-011-2192-7>.
301. Zhang H, Yousef GE, Ouyang X, Archard LC. Characterization of a murine model of myocarditis induced by a reactivated coxsackievirus B3. *Int J Exp Pathol.* 1994;75(2):99-110. [PMC2002107](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2002107/).
302. Sakai Y, Kiyotani K, Fukumura M, et al. Accommodation of foreign genes into the Sendai virus genome: Sizes of inserted genes and viral replication. *FEBS Lett.* 1999. [https://doi.org/doi:10.1016/S0014-5793\(99\)00960-6](https://doi.org/doi:10.1016/S0014-5793(99)00960-6).
303. Hermonat PL, Quirk JG, Bishop BM, Han L. The packaging capacity of adeno-associated virus (AAV) and the potential for wild-type-plus AAV gene therapy vectors. *FEBS Lett.* 1997;407(1):78-84. [PMID9141485](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9141485/).
304. He F, Yao H, Wang J, et al. Coxsackievirus B3 Engineered To Contain MicroRNA Targets for Muscle-Specific MicroRNAs Displays Attenuated Cardiotropic Virulence in Mice. *J Virol.* 2015. <https://doi.org/doi:10.1128/JVI.02933-14>.
305. Rohll JB, Moon DH, Evans DJ, Almond JW. The 3' untranslated region of picornavirus RNA: features required for efficient genome replication. *J Virol.* 1995. [PMC189727](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/189727/).
306. Dunn JJ, Chapman NM, Tracy S, Romero JR. Genomic determinants of cardiovirulence in coxsackievirus B3 clinical isolates: localization to the 5' nontranslated region. *J Virol.* 2000. <https://doi.org/doi:10.1128/JVI.74.10.4787-4794.2000>.
307. Ruiz AJ, Hadac EM, Nace RA, Russell SJ. MicroRNA-Detargeted Mengovirus for Oncolytic Virotherapy. *J Virol.* 2016. <https://doi.org/doi:10.1128/JVI.02810-15>.
308. Hwang IS, Jun EJ, Ye JS, Joo CH, Lee H, Kim YK. Expression of Plus- and Minus-strand Viral RNA in Coxsackievirus B3-Infected A/J Mice. *J Bacteriol Virol.* 2008;38(4):239. <https://doi.org/doi:10.4167/jbv.2008.38.4.239>.
309. Egger D, Teterina NL, Ehrenfeld E, Bienz K. Formation of the poliovirus replication complex requires coupled viral translation, vesicle production, and viral RNA synthesis. *J Virol.* 2000. <https://doi.org/doi:10.1128/JVI.74.14.6570-6580.2000>.
310. Schubert S, Rothe D, Werk D, et al. Strand-specific silencing of a picornavirus by RNA interference: Evidence for the superiority of plus-strand specific siRNAs. *Antiviral Res.* 2007. <https://doi.org/doi:10.1016/j.antiviral.2006.10.005>.

311. Heiss BL, Maximova OA, Thach DC, Speicher JM, Pletnev AG. MicroRNA Targeting of Neurotropic Flavivirus: Effective Control of Virus Escape and Reversion to Neurovirulent Phenotype. *J Virol*. 2012. <https://doi.org/doi:10.1128/JVI.07125-11>.
312. Zhang H, Blake NW, Ouyang X, Pandolfino YA, Morgan-Capner P, Archard LC. A single amino acid substitution in the capsid protein VP1 of coxsackievirus B3 (CVB3) alters plaque phenotype in Vero cells but not cardiovirulence in a mouse model. *Arch Virol*. 1995;140(5):959-966. [PMID7605207](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7605207/).
313. Massilamany C, Gangaplara A, Basavalingappa RH, et al. Mutations in the 5' NTR and the non-structural protein 3A of the coxsackievirus B3 selectively attenuate myocarditogenicity. *PLoS One*. 2015. <https://doi.org/doi:10.1371/journal.pone.0131052>.
314. <https://miRBase.org>.
315. Freiberg F, Sauter M, Pinkert S, et al. Interspecies Differences in Virus Uptake versus Cardiac Function of the Coxsackievirus and Adenovirus Receptor. *J Virol*. 2014. <https://doi.org/doi:10.1128/JVI.00104-14>.
316. Horwitz MS, La Cava A, Fine C, Rodriguez E, Ilic A, Sarvetnick N. Pancreatic expression of interferon- γ protects mice from lethal coxsackievirus B3 infection and subsequent myocarditis. *Nat Med*. 2000. <https://doi.org/doi:10.1038/76277>.
317. Drake JW, Charlesworth B, Charlesworth D, Crow JF. Rates of spontaneous mutation. *Genetics*. 1998. <https://doi.org/doi:citeulike-article-id:610966>.
318. Caggana M, Chan P, Ramsingh A. Identification of a single amino acid residue in the capsid protein VP1 of coxsackievirus B4 that determines the virulent phenotype. *J Virol*. 1993.
319. Wang Y, Pfeiffer JK. Emergence of a large-plaque variant in mice infected with coxsackievirus B3. *MBio*. 2016. <https://doi.org/doi:10.1128/mBio.00119-16>.
320. Gauntt CJ, Trousdale MD, Labadie DRL, Paque RE, Nealon T. Properties of coxsackievirus B3 variants which are amyocarditic or myocarditic for mice. *J Med Virol*. 1979. <https://doi.org/doi:10.1002/jmv.1890030307>.
321. Tu Z, Chapman NM, Hufnagel G, et al. The cardiovirulent phenotype of coxsackievirus B3 is determined at a single site in the genomic 5' nontranslated region. *J Virol*. 1995.
322. L  v  que N, Garcia M, Bouin A, et al. Functional Consequences of RNA 5'-Terminal Deletions on Coxsackievirus B3 RNA Replication and Ribonucleoprotein Complex Formation. *J Virol*. 2017. <https://doi.org/doi:10.1128/JVI.00423-17>.
323. Vignuzzi M, Stone JK, Arnold JJ, Cameron CE, Andino R. Quasispecies diversity determines pathogenesis through cooperative interactions in a viral population. *Nature*. 2006. <https://doi.org/doi:10.1038/nature04388>.
324. Lauring AS, Frydman J, Andino R. The role of mutational robustness in RNA virus evolution. *Nat Rev Microbiol*. 2013. <https://doi.org/doi:10.1038/nrmicro3003>.

325. Frizelle S, Schwarz J, Huber SA, Leslie K. Evaluation of the effects of low molecular weight heparin on inflammation and collagen deposition in chronic coxsackievirus B3-induced myocarditis in A/J mice. *Am J Pathol.* 1992;141(1):203-209. [PMC1886579](#).
326. Kim K-S, Tracy S, Tappich W, et al. 5'-Terminal Deletions Occur in Coxsackievirus B3 during Replication in Murine Hearts and Cardiac Myocyte Cultures and Correlate with Encapsidation of Negative-Strand Viral RNA. *J Virol.* 2005. <https://doi.org/doi:10.1128/JVI.79.11.7024-7041.2005>.
327. Bouin A, Nguyen Y, Wehbe M, et al. Major persistent 5' terminally deleted coxsackievirus B3 populations in human endomyocardial tissues. *Emerg Infect Dis.* 2016. <https://doi.org/doi:10.3201/eid2208.160186>.
328. Smithee S, Tracy S, Chapman NM. Mutational Disruption of *cis* -Acting Replication Element 2C in Coxsackievirus B3 Leads to 5'-Terminal Genomic Deletions. *J Virol.* 2015. <https://doi.org/doi:10.1128/JVI.01308-15>.
329. Pinkert S, Westermann D, Wang X, et al. Prevention of cardiac dysfunction in acute coxsackievirus B3 cardiomyopathy by inducible expression of a soluble coxsackievirus-adenovirus receptor. *Circulation.* 2009. <https://doi.org/doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.845339>.
330. Schmidtke M, Glück B, Merkle I, Hofmann P, Stelzner A, Gemsa D. Cytokine profiles in heart, spleen, and thymus during the acute stage of experimental coxsackievirus B3-induced chronic myocarditis. *J Med Virol.* 2000. [PMID10897072](#).
331. Zautner AE, Korner U, Henke A, Badorff C, Schmidtke M. Heparan Sulfates and Coxsackievirus-Adenovirus Receptor: Each One Mediates Coxsackievirus B3 PD Infection. *J Virol.* 2003;77(18):10071-10077. <https://doi.org/doi:10.1128/JVI.77.18.10071-10077.2003>.
332. Schiffelers MJWA, Blaauboer BJ, Bakker WE, et al. Regulatory acceptance and use of 3R models for pharmaceuticals and chemicals: Expert opinions on the state of affairs and the way forward. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2014. <https://doi.org/doi:10.1016/j.yrtph.2014.02.007>.
333. McNamara DM, Starling RC, Cooper LT, et al. Clinical and demographic predictors of outcomes in recent onset dilated cardiomyopathy: Results of the IMAC (intervention in myocarditis and acute cardiomyopathy)-2 study. *J Am Coll Cardiol.* 2011. <https://doi.org/doi:10.1016/j.jacc.2011.05.033>.
334. Howlett SE. Coxsackievirus B3-Induced Myocarditis: New Insights Into a Female Advantage. *Can J Cardiol.* 2018. <https://doi.org/doi:10.1016/j.cjca.2018.01.086>.
335. Dixit AK, Sarver AE, Yuan Z, et al. Comprehensive analysis of microRNA signature of mouse pancreatic acini: overexpression of miR-21-3p in acute pancreatitis. *Am J Physiol Liver Physiol.* 2016. <https://doi.org/doi:10.1152/ajpgi.00191.2016>.

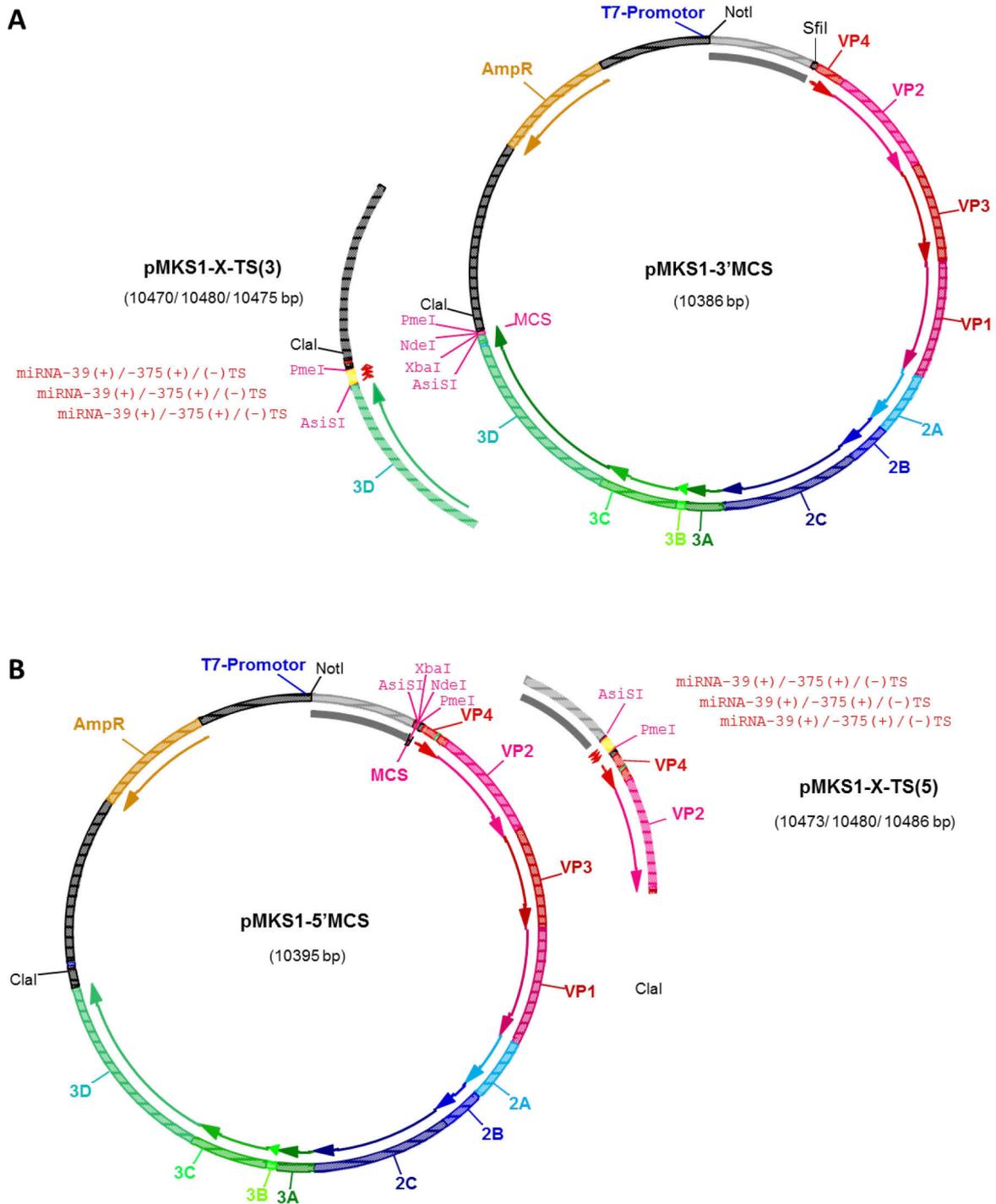
336. Endo K, Weng H, Kito N, Fukushima Y, Iwai N. MiR-216a and miR-216b as markers for acute phased pancreatic injury. *Biomed Res.* 2013;34(4):179-188. <https://doi.org/doi:10.2220/biomedres.34.179>.

Anhang



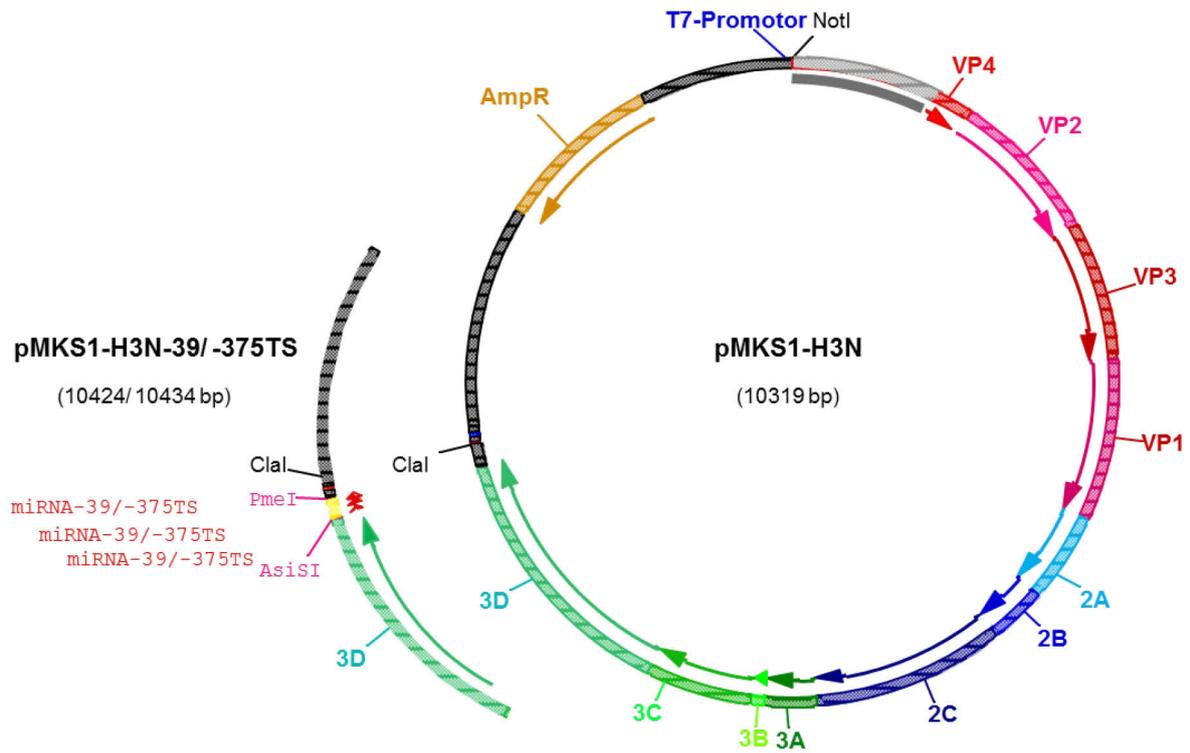
Anhang 1: Plasmidkarten von dem Plasmid pMKS1 mit -bzw. ohne GFP.

[AmpR: Ampicillin-Resistenzgen; T7: T7-Promotor; VP1, VP2, VP3, VP4: virale Strukturproteine 1-4; 2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C, 3D: Nichtstruktur-Proteine; GFP: grün fluoreszierendes Protein.]



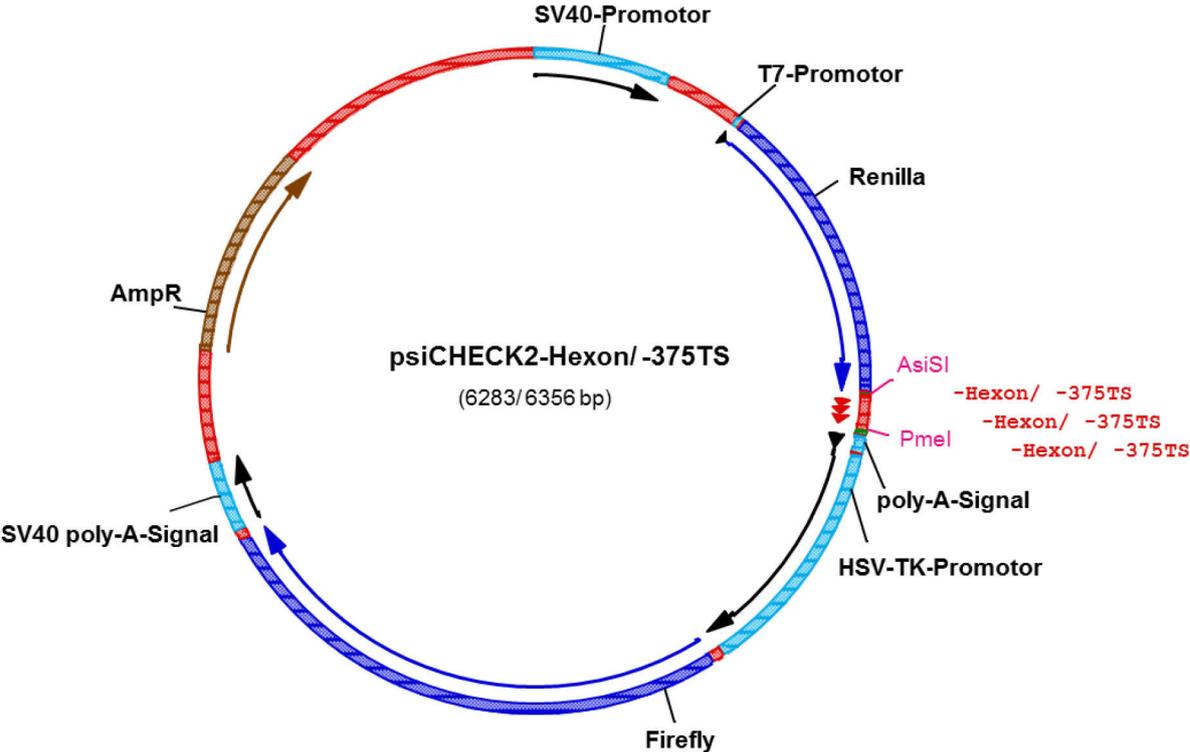
Anhang 2: Plasmidkarten von dem Plasmid pMKS1 mit der *multiple cloning site* in den 3' -bzw. 5'-Enden des CVB3-Genoms.

(A) Modifikationen am 3'-Ende des CVB3-Genoms. Es wurden drei Kopien miRNA-375TS in (+)-Orientierung bzw. in (-)-Orientierung inseriert. Dem Kontrollvirus wurden drei Kopien der miRNA-39TS in (+)-Orientierung inseriert. (B) Modifikationen am 5'-Ende des CVB3-Genoms. Die Insertion der TS entspricht denen innerhalb des 3'-Endes. [AmpR: Ampicillin-Resistenzgen; T7: T7-Promotor; VP1, VP2, VP3, VP4: virale Strukturproteine 1-4; 2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C, 3D: Nichtstruktur-Proteine; MCS: *multiple cloning site*.]



Anhang 3: Plasmidkarten von dem Plasmid pMKS1-H3N mit der *multiple cloning site* in den 3' -bzw. 5'-Enden des CVB3-Genoms.

Modifikationen am 3'-Ende des CVB3-Genoms mit drei Kopien der miRNA-375TS(+) bzw. miRNA-39TS(+). *TS*: *target site*; [AmpR: Ampicillin-Resistenzgen; T7: T7-Promotor; VP1, VP2, VP3, VP4: virale Strukturproteine 1-4; 2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C, 3D: Nichtstruktur-Proteine; MCS: *multiple cloning site*.]



Anhang 3: Das Plasmid psiCHECK2 mit Hexon-TS bzw. miRNA-375TS(+).