

Cardiac-specific Coxsackievirus and Adenovirus Receptor (CAR) Deletion Inhibit Enterovirus Infection in Murine Heart

Jin-Hee Kim², Heon Seok¹ and Byung-Kwan Lim^{1*}

¹Department of Biomedical Science, Jungwon University, Goesan-gun, Chungbuk; ²Department of Herber Skin Care, College of Herbal Bio-industry, Gyeongsangbuk-do, Korea

The structure of coxsackievirus and adenovirus receptor's CAR is similar to adhesion molecules. In the adult heart, the majority of CAR localizes at the intercalated disc. Germ line CAR deletion induces embryonic lethality at E11.5 with evidence of a cardiac abnormality. The CAR role as a viral receptor is well known; however, its precise function in the heart for enterovirus infection is not clear. To understand the role of CAR in the cardiac myocyte, we generated cardiac-specific CAR knockout mice using a CAR floxed allele and alpha-MHC-Mer CRE Mer mice. Western blot analysis and immunofluorescent stain of ventricles at 6 weeks after 2 weeks tamoxifen administration, CAR expression was significantly decreased in CAR^{ff} MCM mice but not in CAR^{ff} mice heart. Enterovirus was intraperitoneally infected into CAR^{ff} MCM and CAR^{ff} mice (n=10 each). CAR disruption was dramatically reduced virus infection and replication in the heart but not different in liver, spleen, and pancreas. Cardiac myocyte damage was significantly reduced in the CAR^{ff} MCM mutant mice by Evans blue dye stain. In addition, the CAR^{ff} MCM mutant mice heart inflammation and fibrosis were decreased in H&E and trichrome stain compare to CAR^{ff} control mice. CAR expression was required for normal ventricular function, but it is the cause of enterovirus infection. In the adult mice heart, CAR deletion was significantly reduced viral infection, proliferation, and myocarditis. These results suggested that CAR deletion could be useful therapeutic strategy to prevent viral myocarditis.

Key Words: Coxsackievirus and adenovirus receptor, Cardiomyocyte, Enterovirus, Inflammation, Myocarditis

서 론

Coxsackievirus and Adenovirus receptor (CAR)는 바이러스의 세포 내 감염을 위한 receptor로서 급성 심근염과 소아들의 수족구를 유발하는 엔테로바이러스와 눈병을 일으키는 아데노바이러스의 주요 수용체로 여러 세포와 기관에 걸쳐 폭 넓게 발현되고 있다 (1, 2). 특히 심근염을 일으키는 Coxsackievirus type B3 (CVB3)의 주 수용체로서

심장으로의 바이러스 감염과 매우 밀접한 관계가 있을 것으로 생각되었고 심장에서 높은 수준으로 발현을 하고 있어 심장에서의 고유한 생리학적 기능에 대한 의문을 갖게 한다 (3~6). 이전의 CAR에 대한 연구에서 CAR가 뇌의 신경세포 발달 단계에서 세포와 세포 간의 결합에 중요한 역할을 함을 발견하였으며 발달 시기에 CAR는 생쥐의 태아 분화 시 신경관의 형성 및 심근세포의 발생에 중요한 역할을 하고 있으며 CAR를 몸 전체에서 제거한 돌연변이 생쥐는 혈관이 파괴되어 혈액의 유출이 관

Received: August 13, 2013/ Revised: August 20, 2013/ Accepted: August 28, 2013

*Corresponding author: Byung-Kwan Lim, Ph.D. Department of Biomedical Science, Jungwon University 85 Munmu-ro, Goesan-eup, Goesan-gun, Chungbuk, 367-700, Korea.

Phone: +82-43-830-8605, Fax: +82-43-830-8579, e-mail: bklim@jwu.ac.kr

**This work was supported by a National Research Foundation (NRF) of Korea grant provided by the Korean Government (Ministry of Education & Science Technology) (No. NRF-2012R1A1A2041465).

©This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>).

찰되었고 흉부가 확대되어 태아 발생 9일에서 12일 사이에 모두 사망하였다. 이를 통해 CAR가 배아 발생 단계에서 필수적임을 확인하였다 (7, 8).

성체 심장에서 CAR는 심근세포 간의 물리적인 연결을 매개하며 이러한 세포간 결합은 지속적인 심장 기능의 항상성에 중요함을 발견하였다. CAR 단백질은 심근세포 간의 결합 부위인 intercalated disc와 심장의 박동을 일정하게 만들어 주는 Atrioventricular (AV)-node의 세포와 세포 junction에서 발현되며 AV-node의 주요 단백질 connexin45와 간접적인 상호결합을 통해 connexin45의 안정적 발현을 유지한다 (2, 9~11). 이러한 단백질의 유지는 정상적인 심장 기능을 위해 매우 중요하며 intercalated discs에서의 CAR 단백질 제거는 지속적으로 심근세포에 물리적 스트레스를 가해 심근병증을 유발하고 급속한 심장기능저하를 유도하였다. 돌연변이 생쥐 심장은 심근세포의 파괴로 염증세포의 침투와 근섬유화의 병리학적 변화가 관찰되었다. 또한 CAR 단백질이 제거된 심장의 면역형광염색을 통해 CAR 단백질의 발현이 β -catenin과 같은 구조단백질의 유지에 매우 중요한 역할을 함을 확인하였다. 특히 심근세포 특이적 CAR 단백질 제거 돌연변이 생쥐는 비정상적인 심장 전기박동을 보이며 시간이 흐름에 따라 심장 기능의 이상을 유발하여 심장의 불안정한 박동의 원인임을 보여주었다 (2, 12, 13).

엔테로바이러스에 속하는 CVB3는 사람의 심근염을 일으키는 바이러스로 심각한 염증과 면역작용을 유도하고 종종 급성 사망에 이르게 한다. 또한 만성 심근염을 유발하여 최종에는 심근병증을 일으킨다 (3, 14~17). 비교적 작은 7.4 kb의 양성 RNA 바이러스로 하나의 RNA에서 하나의 거대 단백질을 만들고 자신의 단백질 절단효소를 사용하여 각각의 기능 단백질을 만들어 증식하게 된다. CVB3가 심근세포에 감염되기 위해 사용하는 주 수용체가 CAR이며 이전의 세포 실험에서 CAR의 결핍은 CVB3 감염을 억제함을 보여주었다. 특히 CAR의 항체 이중구조를 사용한 엔테로바이러스 감염 억제 실험은 CAR가 특이적으로 엔테로바이러스와 결합하여 세포로의 감염 유도함을 증명하였다 (4, 18).

본 연구에서는 심근특이적으로 CAR 단백질을 제거한 Balb/C inbred 마우스를 제작하여 실제 사람에서 심근염을 일으키는 병원성 바이러스인 coxsackievirus B3의 심근세포로의 감염과 CAR 단백질과의 관계를 연구하고 이를 통한 엔테로바이러스 감염 억제 및 치료 방법 개발을 위

한 기반 지식을 제공하고자 한다.

재료 및 방법

심근특이적 CAR 제거 마우스 제작

성체의 원하는 성장 시기에 심근특이적으로 CAR 단백질을 제거한 마우스의 제작을 위해 CAR 유전자의 Exon 2번의 앞뒤에 Cre recombinase의 작용 부위인 loxP site를 삽입한 CAR conditional knock out 마우스를 미국 University of California, San Diego 대학 Dr. Knowlton 교수에게 분양 받았다 (2). 6주령의 마우스 심근세포에서 CAR 유전자의 발현을 제거하기 위해 Cre recombinase의 발현을 tamoxifen의 주사로 조절할 수 있는 돌연변이 oestrogen 수용체를 가진 alpha-MHC Mer-Cre-Mer 마우스와 교미하여 CAR^{fl} MCM 돌연변이 마우스와 MCM이 없는 CAR^{fl} 마우스를 얻어 대조군으로 사용한다. 각각 10마리 이상의 유사한 연령의 돌연변이와 대조군 마우스를 확보하여 4주부터 CAR 단백질의 제거를 위해 40 mg/kg의 tamoxifen을 연속하여 5일 동안 2주간 복강 주사하여 전달한다. 2주 후 마우스의 심장을 적출하여 CAR 단백질의 발현을 확인한다 (19).

Western blot analysis

CAR 제거 돌연변이 마우스의 심근세포에서의 CAR 단백질 발현 변화를 관찰하기 위해 lysis buffer (50 mM Tris, pH 8.0, 5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0.5% NP40, 0.5 mM PMSF, 0.5 mM DTT)로 심장을 파쇄하여 단백질을 분리한다. 분리된 단백질은 2x loading buffer (0.125 M Tris, pH 6.8, 4% SDS, 20% glycerol, 0.2 bromophenol blue, 200 mM DTT) 섞은 후 10% acrylamide gel에 loading 하여 100 Volt로 약 3시간 전기영동 후 nitrocellulose membrane에 220 mA로 상온에서 1시간 동안 transfer 한다. Transfer 후 5% non-fat milk blocking buffer에 1시간 동안 반응하여 비특이적인 항체반응을 제거하였다. 1차 항체 anti-CAR와 GAPDH를 사용하여 4도에서 over night 배양하고 2차 항체로 horse radish peroxidase (HRP)가 tagging된 항체를 사용하여 ECL (Intron Biotech, Seoul, Korea) 방법으로 각각의 단백질 발현 변화를 관찰한다.

면역형광염색

Tamoxifen 주입 2주 후 대조군과 돌연변이 마우스의

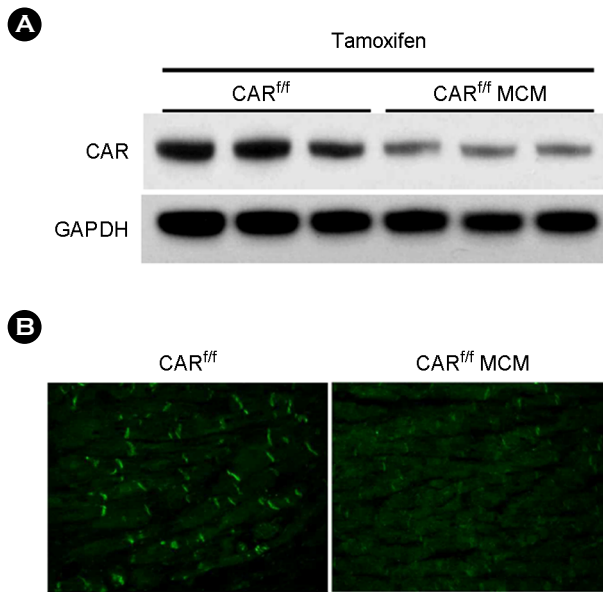


Figure 1. Generation of Mice with Cardiac-Specific Deletion of CAR. After 2 weeks tamoxifen administration CAR expression was observed. CAR expression in CAR^{fl/fl} (control) and CAR^{fl/fl} MCM (Mutant) mice were measured by western blot analysis (A), and immunofluorescent staining (B) using an antibody specific for CAR (Green). The typical intercalated disc staining for CAR was observed in the CAR^{fl/fl} mice, but not in the CAR^{fl/fl} MCM mice.

심장을 적출하여 25% Sucrose 용액에 넣어 4도에서 18 시간 동안 반응시킨다. 고정된 심장은 OCT compound (Sapura, Japan)에 넣어 빠르게 동결한다. 동결한 조직은 Cryo-sector를 사용하여 7 μ m로 절편을 만들고 1% Triton x-100과 10% goat serum으로 상온에서 1시간 처리하여 조직의 항체 투과를 높인다. 이 후 3% bovine serum albumin으로 30분간 blocking한 후 1차 항체(anti-CAR)를 4도에서 overnight 하여 반응하고 2차 항체(anti-rabbit Alexa 488)로 반응하여 CAR 단백질 제거 후 심근세포에서 CAR 단백질의 발현여부와 위치 변화를 형광현미경(Olympus, USA)을 사용하여 관찰한다.

마우스 엔테로바이러스 감염

Tamoxifen 주입으로 CAR 단백질을 제거한 생후 6주된 Balb/c strain의 CAR^{fl/fl} MCM 돌연변이와 CAR^{fl/fl} 대조군 마우스를 2×10^3 PFU의 엔테로바이러스로 각각 10마리씩 복강 주사하여 감염시키고 감염 후 각각 4, 7, 10일에 혈액을 채취하고 간, 심장, 비장, 췌장을 적출하여 일부는 바이러스 정량을 위해 보관하고, 일부는 4% paraformal-

dehyde로 고정하여 paraffin 절편을 만들어 병리소견을 관찰한다 (20).

바이러스 역가 측정

저장된 심장의 심방 부위 일부와 간, 비장, 췌장의 일부 부분 무게를 측정한 후 1 ml DMEM (GIBCO-BRL, USA) 배지에 넣고 polytron homogenizer로 15,000~20,000 rpm에서 3~5분간 homogenize 시킨 후 1,500 g로 10분간 원심 분리하고 상층액을 220 nm filter로 여과한다. 이 상층액을 6 well plate에 70%로 배양된 HeLa 세포에 30분간 감염시킨 후 3% Difco agar/DMEM을 3 mm로 덮고 37도 CO₂ 배양기에서 이틀간 배양하여 plaque forming unit (PFU) assay로 바이러스 역가를 측정한다.

조직병리학적 검사

4% paraformaldehyde에 고정하여 paraffin 절편을 만들어 놓은 조직을 5 μ m의 두께로 자른 후 hematoxylin and eosin (H&E)으로 염색을 하여 심근염의 정도를 광학현미경상에서 관찰하고 Mason Trichrome 염색으로 섬유화(fibrosis)의 정도를 CAR^{fl/fl} MCM 돌연변이와 CAR^{fl/fl} 대조군 마우스 심장에서 관찰한다.

결 과

성체 시기 심근특이적 CAR 단백질 제거

모든 마우스는 엔테로바이러스의 감염 실험이 가능한 Balb/c inbred strain으로 제작하여 사용하였다. 6주령 마우스 심근세포에서 CAR 단백질을 제거하기 위해 4주령 CAR^{fl/fl} MCM 돌연변이와 CAR^{fl/fl} 대조군 마우스에 각각 주 5회로 2주간 매일 40 mg/kg로 tamoxifen을 복강에 주사하였다. 약물 주사 2주 후 6주령 마우스에서 심장을 적출하여 CAR 단백질의 발현을 western blot analysis와 면역형광염색으로 확인하였다. CAR 단백질의 발현은 tamoxifen 주입에 의해 80% 이상의 유의한 제거가 확인되었다(Fig. 1A). 특히 면역형광염색을 통해 심근세포의 연결 부위인 intercalate discs에서 CAR 단백질 발현의 유의한 감소를 관찰할 수 있었다(Fig. 1B). 이렇게 제작된 CAR 단백질 제거 마우스를 엔테로바이러스 감염 실험에 사용하였다.

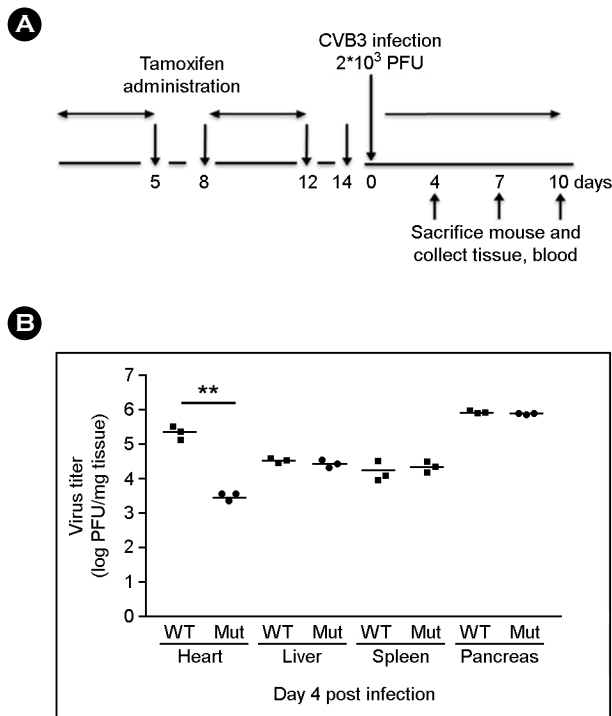


Figure 2. Enterovirus infection in cardiac-specific CAR deletion mice. (A) Scheme of animal study for CAR deletion and enterovirus infection. Enterovirus was infected after 2 weeks tamoxifen administration. (B) Tissue virus titer was measured by PFU assay. In the CAR^{fl} MCM mutant mice (Mut) heart virus titer was significantly reduced compare to CAR^{fl} control mice (WT) heart 4 days following enterovirus infection. (Mean \pm S.E.M, $**p < 0.01$, each data point is represented on graphs).

CAR 단백질 제거 마우스 엔테로바이러스 감염

2주 간의 tamoxifen 주입을 통해 CAR 단백질을 제거한 6주령 마우스에 CVB3 엔테로바이러스를 2×10^3 PFU로 CAR^{fl} 와 CAR^{fl} MCM 마우스 각각 10마리에 복강 주사를 통하여 감염하였다. 바이러스 감염 후 각각 4, 7, 10일에 마우스를 희생하여 heart, liver, spleen, pancreas와 혈액을 적출하여 CAR 제거 돌연변이 마우스의 바이러스 감염을 확인하였다(Fig. 2A). 엔테로바이러스 감염 후 tissue에서 생 바이러스의 역가를 PFU assay를 통해 측정하였으며 Liver, spleen, pancreas의 장기에서 엔테로바이러스 감염은 대조군(CAR^{fl} , WT)과 돌연변이(CAR^{fl} MCM, Mut) 마우스 간의 큰 차이가 없이 일정한 바이러스 역가가 검출되었다. 그러나 심장의 경우 CAR 단백질이 제거된 돌연변이(Mut)가 대조군(WT) 마우스의 약 100배 이하로 낮은 생 바이러스의 역가가 검출되어 심근특이적인

CAR 단백질의 제거가 엔테로바이러스 감염을 특이적으로 억제하고 바이러스의 심장에서의 증식을 효과적으로 저해함을 관찰하였다(Fig. 2B).

엔테로바이러스 감염에 따른 심근세포 파괴 억제

엔테로바이러스 감염에 의한 심근세포의 파괴 정도를 확인하기 위해 엔테로바이러스 감염 4일 후 마우스를 희생하기 18시간 전 evans blue dye (1 mg/ml)을 복강에 주사하였다. 마우스를 희생하여 심장을 적출하고 cryo-section을 만들어 조직을 슬라이드글라스에 고정 후 형광현미경으로 심근세포의 파괴를 확인하였다. Fig. 3A에서 보는 것과 같이 CAR^{fl} MCM 마우스의 심장에서는 파괴된 적색으로 염색된 심근세포가 관찰되지 않았으나 CAR^{fl} 마우스에서는 적색으로 염색된 심근세포가 다수 확인되어 많은 바이러스의 감염으로 인한 심근세포의 파괴가 관찰되었다. 실제 파괴된 심근세포는 CAR^{fl} 마우스 $1.4 \pm 0.5\%$ 와 CAR^{fl} MCM 마우스 $0.2 \pm 0.1\%$ 로 통계적으로 유의한 차이를 보여주었다(Fig. 3B).

심근특이적 CAR 단백질의 제거와 심장의 염증세포 감소

엔테로바이러스 감염에 따른 심근세포의 파괴와 염증세포 침윤을 확인하기 위하여 병리학적 염색을 수행하였다. 심장의 염증세포를 H&E 염색으로 근섬유세포를 trichrome 염색으로 확인하였으며 CAR^{fl} 마우스의 심장에서 더 많은 염증세포와 근섬유세포가 관찰되어 엔테로바이러스 심근세포 감염으로 인한 심근세포의 파괴를 확인할 수 있었다. 그러나 CAR^{fl} MCM 마우스는 CAR 단백질의 제거로 엔테로바이러스의 감염이 억제되어 일부분에서 몇몇 심근세포만의 파괴가 관찰되었다(Fig. 4). 본 병리학적 결과는 실제 엔테로바이러스의 수용체로 알려진 CAR 단백질의 제거가 바이러스의 심근세포로의 감염을 억제하여 심근세포의 파괴를 최소화하고 염증세포와 근섬유세포의 형성을 효과적으로 억제함을 확인하였다.

고 찰

성체 심장에서 CAR는 심근세포 간의 물리적인 연결을 매개하며 이러한 세포간 결합은 지속적인 심장 기능의 유지에 매우 중요하다. CAR 단백질은 심근세포 간의 결합 부위인 intercalated disc와 심장의 박동을 일정하게

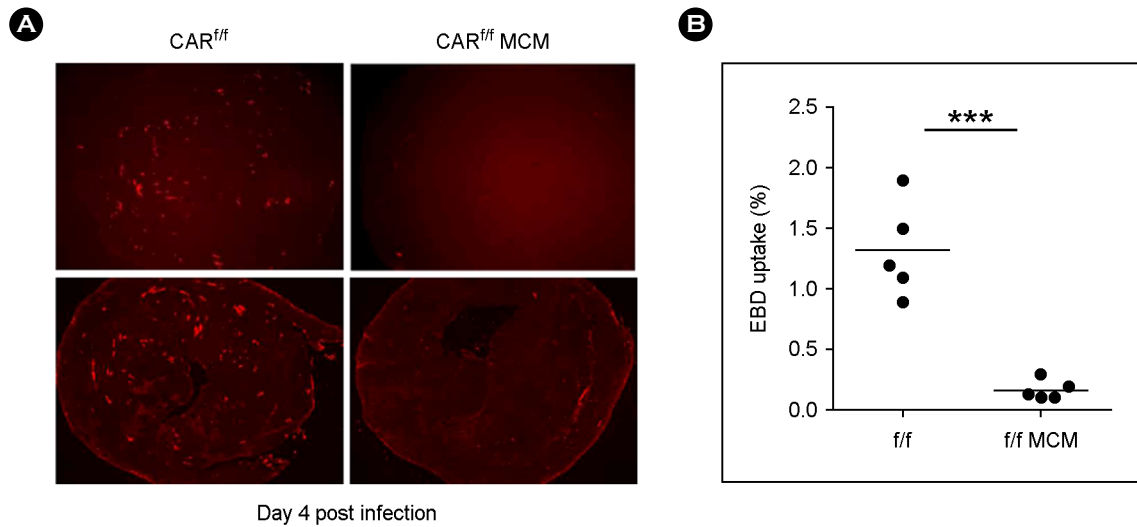


Figure 3. Decrease cardiac myocyte damage. (A) Evans blue dye (EBD) uptake was significantly decreased in the heart of $CAR^{f/f}$ MCM mutant mice 4 days following enterovirus infection compare to $CAR^{f/f}$ control mice. (B) EBD uptake was measured in $CAR^{f/f}$ mice ($1.4 \pm 0.5\%$) and $CAR^{f/f}$ MCM mice ($0.2 \pm 0.1\%$). (Mean \pm S.E.M, *** $p < 0.001$, each data point is represented on graphs).

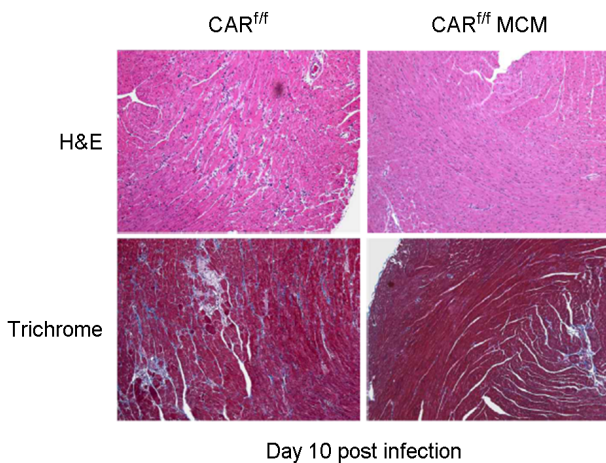


Figure 4. Decrease inflammation and fibrosis. CAR deletion was effectively blocked enterovirus infection and proliferation in the heart. Inflammation and fibrosis were significantly reduced in $CAR^{f/f}$ MCM mutant mice heart compare to $CAR^{f/f}$ mice heart 10 days following enterovirus infection. Without CAR expression enterovirus was not able to infect into cardiac myocyte.

만들어 주는 atrioventricular (AV)-node의 세포와 세포 junction에서 발현되며 심근세포에서의 CAR 단백질 제거는 지속적으로 심근세포에 물리적 스트레스를 가해 심근 병증을 유발하고 급속한 심장기능 저하를 유도한다. 또한 CAR 단백질이 제거된 심장의 면역형광염색을 통해 CAR 단백질의 발현이 β -catenin과 같은 구조 단백질의 유

지에 매우 중요한 역할을 함이 확인되어 실질적인 심장의 구조 유지에도 물리적으로 중요 기능을 하고 있다. 특히 심근세포 특이적 CAR 단백질 제거 돌연변이 생쥐는 비정상적인 심장 전기박동을 보이며 시간이 흐름에 따라 심장 기능의 이상을 유발하여 심장의 박동 조절의 중요한 역할을 한다 (2, 13).

이렇게 CAR 단백질은 심장에서 심장의 항상성과 심장 박동 유지의 매우 중요한 역할을 담당하고 있다. 하지만 다른 한편으로 CAR 단백질은 coxsackievirus와 adenovirus의 수용체로 알려졌으며 많은 연구가 진행되었다 (1, 6, 18). 특히 급성 심근염의 원인 바이러스인 엔테로바이러스 중 coxsackievirus B3 (CVB3)의 주요 수용체로 CVB3의 특이적 목표세포로의 감염에 사용된다. 그렇다면 이러한 CAR 단백질의 제거가 여러 질병의 원인 바이러스로 알려진 adenovirus와 coxsackievirus의 감염을 저해하고 감염으로 인한 질병의 발병을 억제할 수 있을 것인가에 대해 생각하게 되었다. 하지만 CAR 단백질은 발생과정 중 뇌의 신경세포와 심근세포의 발생에 매우 중요하며 CAR 단백질이 제거된 배아는 배아의 발생 시기 10~12일 사이에 모두 사망하였다. 이러한 문제를 해결하고 CAR 단백질 제거의 효과를 성체 마우스에서 확인하기 위해 심근세포에서 단백질 제거 시기의 조절이 가능한 conditional CAR knock out 마우스를 제작하여 엔테로바이러스 감염과 심근염 유발을 실험하였으며 심근세포에서의 CAR 단

백질 제거가 효과적으로 심근세포로의 바이러스 감염을 억제함을 검증하였다.

본 연구에서 성체 마우스의 심근세포에서 특이적으로 CAR 단백질을 80% 이상 성공적으로 제거하였으며 CAR 단백질의 제거로 엔테로바이러스의 심근세포로의 감염을 유의하게 억제하였다. 바이러스 감염 억제를 통해 심근세포의 파괴와 이에 따른 심근염의 발병을 효과적으로 막을 수 있었다. 이러한 결과를 통해 CAR 단백질의 부분적인 발현 억제는 CAR 단백질을 수용체로 사용하는 바이러스의 감염 억제를 위한 치료 방법으로 사용될 수 있을 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- 1) Bergelson JM, Cunningham JA, Droguett G, Kurt-Jones EA, Krithivas A, Hong JS, *et al.* Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* 1997;275:1320-3.
- 2) Lim BK, Xiong D, Dorner A, Youn TJ, Yung A, Liu TI, *et al.* Coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR) mediates atrioventricular-node function and connexin 45 localization in the murine heart. *J Clin Invest* 2008;118:2758-70.
- 3) Baboonian C, Davies MJ, Booth JC, McKenna WJ. Coxsackie B viruses and human heart disease. *Curr Top Microbiol Immunol* 1997;223:31-52.
- 4) Lim BK, Choi JH, Nam JH, Gil CO, Shin JO, Yun SH, *et al.* Virus receptor trap neutralizes coxsackievirus in experimental murine viral myocarditis. *Cardiovasc Res* 2006;71:517-26.
- 5) Coyne CB, Bergelson JM. CAR: a virus receptor within the tight junction. *Adv Drug Deliv Rev* 2005;57:869-82.
- 6) Noutsias M, Fechner H, de Jonge H, Wang X, Dekkers D, Houtsmuller AB, *et al.* Human coxsackie-adenovirus receptor is colocalized with integrins $\alpha(v)\beta(3)$ and $\alpha(v)\beta(5)$ on the cardiomyocyte sarcolemma and upregulated in dilated cardiomyopathy: implications for cardiotropic viral infections. *Circulation* 2001;104:275-80.
- 7) Dorner AA, Wegmann F, Butz S, Wolburg-Buchholz K, Wolburg H, Mack A, *et al.* Coxsackievirus-adenovirus receptor (CAR) is essential for early embryonic cardiac development. *J Cell Sci* 2005;118:3509-21.
- 8) Asher DR, Cerny AM, Weiler SR, Horner JW, Keeler ML, Neptune MA, *et al.* Coxsackievirus and adenovirus receptor is essential for cardiomyocyte development. *Genesis* 2005;42:77-85.
- 9) Kumai M, Nishii K, Nakamura K, Takeda N, Suzuki M, Shibata Y. Loss of connexin45 causes a cushion defect in early cardiogenesis. *Development* 2000;127:3501-12.
- 10) Egashira K, Nishii K, Nakamura K, Kumai M, Morimoto S, Shibata Y. Conduction abnormality in gap junction protein connexin45-deficient embryonic stem cell-derived cardiac myocytes. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 2004;280:973-9.
- 11) Coppin SR, Kodama I, Boyett MR, Dobrzynski H, Takagishi Y, Honjo H, *et al.* Connexin45, a major connexin of the rabbit sinoatrial node, is co-expressed with connexin43 in a restricted zone at the nodal-crista terminalis border. *J Histochem Cytochem* 1999;47:907-18.
- 12) Excoffon KJ, Hruska-Hageman A, Klotz M, Traver GL, Zabner J. A role for the PDZ-binding domain of the coxsackie B virus and adenovirus receptor (CAR) in cell adhesion and growth. *J Cell Sci* 2004;117:4401-9.
- 13) Lisewski U, Shi Y, Wrackmeyer U, Fischer R, Chen C, Schirdewan A, *et al.* The tight junction protein CAR regulates cardiac conduction and cell-cell communication. *J Exp Med* 2008;205:2369-79.
- 14) Feldman AM, McNamara D. Myocarditis. *N Engl J Med* 2000;343:1388-98.
- 15) Knowlton KU, Jeon ES, Berkley N, Wessely R, Huber S. A mutation in the puff region of VP2 attenuates the myocarditic phenotype of an infectious cDNA of the Woodruff variant of coxsackievirus B3. *J Virol* 1996;70:7811-8.
- 16) Liu P, Martino T, Opavsky MA, Penninger J. Viral myocarditis: balance between viral infection and immune response. *Can J Cardiol* 1996;12:935-43.
- 17) Lim BK, Choe SC, Shin JO, Ho SH, Kim JM, Yu SS, *et al.* Local expression of interleukin-1 receptor antagonist by plasmid DNA improves mortality and decreases myocardial inflammation in experimental coxsackieviral myocarditis. *Circulation* 2002;105:1278-81.
- 18) He Y, Chipman PR, Howitt J, Bator CM, Whitt MA, Baker TS, *et al.* Interaction of coxsackievirus B3 with the full length coxsackievirus-adenovirus receptor. *Nat Struct Biol* 2001;8:874-8.
- 19) Xiong D, Yajima T, Lim BK, Stenbit A, Dublin A, Dalton ND, *et al.* Inducible cardiac-restricted expression of enteroviral

- protease 2A is sufficient to induce dilated cardiomyopathy. *Circulation* 2007;115:94-102.
- 20) Yun SH, Lee WG, Kim YC, Ju ES, Lim BK, Choi JO, *et al.* Antiviral activity of coxsackievirus B3 3C protease inhibitor in experimental murine myocarditis. *J Infect Dis* 2012;205: 491-7.
-