

Aus dem Robert Koch-Institut Berlin

**Prävalenz kardiotroper Viren im humanen Herzgewebe –
Untersuchung von Explantaten aus Herztransplantat-Empfängern
und Organspendern**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Oliver Donoso Mantke

Diplom-Biologe aus Berlin

März 2005

1. Gutachter: PD Dr. rer. nat. Matthias Niedrig, Robert Koch-Institut Berlin
2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Rudolf K. Achazi, Freie Universität Berlin

Disputation am: 20. Juni 2005

Für meine Eltern...

wegen Eurer Liebe, freundschaftlichen Erziehung und Eurem moralischen Beistand

... on ne voit bien qu'avec le cœur. L'essentiel est invisible pour les yeux. (Man sieht nur mit dem Herzen gut. Das Wesentliche ist für die Augen unsichtbar.)

Le petit prince (Der kleine Prinz)

Antoine de Saint-Exupéry (eigentlich: Antoine-Marie-Roger Graf von S.),

29. Juni 1900 bis 31. Juli 1944, französischer Schriftsteller

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	3
1.1 Anatomie des Herzens	4
1.2 Erkrankungen des Herzens	7
1.2.1 Die Myokarditis.....	8
1.2.2 Die dilatative Kardiomyopathie.....	9
1.2.3 Die koronare Herzkrankheit.....	11
1.3 Virale Ursachen und Pathogenese entzündlicher Herzerkrankungen	13
1.3.1 Ätiologie und Pathogenese der Virus-induzierten Myokarditis und DKMP.....	13
1.3.2 Die Virus-induzierte Arteriosklerose und KHK.....	21
1.4 Diagnostik und Therapie der entzündlichen Herzerkrankungen	26
1.5 Ein neuartiger Vertreter der Picornaviren – das Ljunganvirus	32
1.6 Fragestellung der Dissertation	35
1.6.1 Prävalenz kardiotoxischer viraler Erreger bei entzündlichen Herzerkrankungen.....	35
1.6.2 Risiken für Empfänger von Herztransplantaten und Homografts.....	36
1.6.3 Prävalenz von Ljunganvirus- und Hantavirus-RNA in Herzgewebe von Herztransplantatempfängern und Herzspendern.....	36
2. Material und Methoden	37
2.1 Material	37
2.1.1 Bezugsquellennachweis	37
2.1.1.1 Geräte.....	37
2.1.1.2 Chemikalien.....	39
2.1.1.3 Enzyme.....	40
2.1.1.4 Nukleinsäuren (Längenstandards).....	41
2.1.1.5 Plasmide.....	41
2.1.1.6 Oligonukleotide.....	41
2.1.1.7 Antikörper.....	42
2.1.1.8 Reagenziensätze (Kits).....	42
2.1.1.9 Kunststoffartikel.....	43
2.1.1.10 Verbrauchsmaterialien.....	44
2.1.1.11 Spezielle Softwares.....	44
2.1.2 Puffer- und Gebrauchslösungen	45
2.1.3 Nährmedien und Lösungen	47
2.1.4 Zelllinien, Bakterien- und Virenstämme	48

2.2 Methoden	49
2.2.1 Probenentnahme, Patientenauswahl und Patientendaten	50
2.2.2 Präparation und Reinigung von Nukleinsäuren aus Myokardgewebe	51
2.2.2.1 Evaluation kommerzieller DNA-Extraktionsmethoden.....	52
2.2.2.2 Evaluation kommerzieller RNA-Extraktionsmethoden.....	52
2.2.2.3 Parameter zur Evaluation der eingesetzten Extraktionsmethoden.....	53
2.2.2.4 Aufarbeitung der Myokardproben.....	53
2.2.2.5 Vermeidung von Kreuz-Kontaminationen beim Probenaufschluss.....	55
2.2.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	56
2.2.3.1 Absorptionsspektrometrie.....	56
2.2.3.2 Fluorometrische Bestimmung.....	57
2.2.4 Nachweis viraler Nukleinsäuren mittels DNA-Amplifikation über PCR	58
2.2.4.1 Reverse-Transkriptase-Reaktion.....	65
2.2.4.2 Nachweis von Enteroviren mittels nested Reverse-Transkriptase-PCR.....	68
2.2.4.3 Quantitative real-time RT-PCR für den Nachweis von Influenzaviren.....	69
2.2.4.4 Quantitative real-time RT-PCR für den Nachweis von Hantaviren.....	70
2.2.4.5 PCR-Nachweis von Adenoviren.....	71
2.2.4.6 PCR-Nachweis von HCMV.....	71
2.2.4.7 Quantitativer PCR-Nachweis von Parvovirus B19.....	72
2.2.4.8 Quantitativer Nachweis von zellulären Referenzgennukleinsäuren.....	73
2.2.5 Agarosegelelektrophorese zur Nukleinsäurencharakterisierung	74
2.2.6 Präparation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	75
2.2.7 DNA-Sequenzierung	75
2.2.8 <i>In situ</i>-Hybridisierung von Myokardgewebeschnitten	76
2.2.9 Histopathologische Bewertung der Explantate	78
2.2.10 Serologische Untersuchungen mittels ELISA	81
2.2.11 Zellkultur, Stammhaltung und Zellzahlbestimmung	82
2.2.12 Anzucht von Ljunganviren	83
2.2.13 Bestimmung des Virustiters verschiedener LV-Stämme und Infektionsstudien in Zellkultur	84
2.2.14 Indirekter Immunofluoreszenz-Test zum Nachweis des Ljunganvirus	87
2.2.15 Elektronenmikroskopische Untersuchungen des Ljunganvirus	88
2.2.15.1 Sedimentierung von Kulturüberständen und Zellen zur Probenpräparation.....	89
2.2.15.2 Negativkontrastierung.....	89
2.2.15.3 Eponeinbettung und Ultradünnschnitttechnik zur Probenpräparation.....	90
2.2.15.4 Elektronenmikroskopische Auswertung und fotografische Dokumentation.....	93
2.2.16 Etablierung von RT-PCR-Methoden für den Nachweis von Ljunganviren	93

2.2.16.1 Primer- und Sondendesign.....	95
2.2.16.2 RT-PCR für den Nachweis von Ljunganviren.....	96
2.2.16.3 Klonierung von PCR-Produkten, Amplifikation und Plasmidisolierung.....	96
2.2.16.4 Quantitative real-time RT-PCR für den Nachweis von Ljunganviren.....	98
2.2.17 Statistische Analysen.....	99
3. Ergebnisse.....	100
3.1 Daten zu den Patienten und Proben.....	100
3.2 Extraktion von Nukleinsäuren aus Myokardgewebe.....	103
3.2.1 Evaluation verschiedener DNA-Extraktionsmethoden.....	103
3.2.2 Evaluation verschiedener RNA-Extraktionsmethoden.....	104
3.2.3 Daten zur Nukleinsäurepräparation aller untersuchten Gewebeproben.....	106
3.3 Nachweis viraler Nukleinsäuresequenzen in Myokard- und Herzklappengewebe.....	108
3.3.1 Nachweis viraler Nukleinsäuren in Myokardproben aus Standardpositionen.....	108
3.3.2 Nachweis viraler Nukleinsäuren im Herzklappengewebe.....	110
3.3.3 Sequenzanalysen der EV-positiven Amplifikate.....	112
3.3.4 Etablierung der quantitativen real-time PCR für den Nachweis von PVB19.....	113
3.3.5 Ergebnisse der <i>In situ</i> -Hybridisierung.....	116
3.4 Vergleich der Ergebnisse aus der Serologie und Histopathologie mit denen aus der PCR-Diagnostik.....	117
3.4.1 Serologische Befunde versus PCR.....	117
3.4.2 Histopathologische Befunde versus PCR.....	117
3.4.3 Anwendung der diagnostischen Methoden in Einzelfällen.....	121
3.5 Charakterisierung und Nachweis von Ljunganviren.....	122
3.5.1 Charakterisierung von Ljunganviren.....	122
3.5.2 Etablierung von RT-PCR-Methoden für den Nachweis von Ljunganviren.....	127
4. Diskussion.....	133
5. Zusammenfassung in Deutsch und Englisch.....	147
6. Anhang.....	151
6.1 Abkürzungsverzeichnis.....	151
6.2 Abbildungsverzeichnis.....	155
6.3 Tabellenverzeichnis.....	158
7. Literaturverzeichnis.....	160

Vorveröffentlichungen und weitere eigene Publikationen.....	182
Danksagung.....	186
Lebenslauf.....	189

1. Einleitung

Virusinfektionen sind eine häufige Ursache für entzündliche Erkrankungen am menschlichen Herzen, wie z.B. der akuten und chronischen Myokarditis, dilatativen Kardiomyopathie oder der koronaren Herzkrankheit. Daher gelten sie als eine der Hauptursachen bezüglich Morbidität und Mortalität bei kardiovaskulären Erkrankungen, die, laut Aussage des Statistischen Bundesamtes, mit zu den 50 häufigsten Todesursachen in Deutschland zählen: chronische ischämische Herzkrankheit (Platz 1); Herzinsuffizienz (Platz 3); Arteriosklerose (Platz 12); Herzmuskelschwäche (Platz 26). Meist finden derartige Virus-bedingte Herzerkrankungen ihre öffentliche Aufmerksamkeit, wenn vor allem bei prominenten Sportlern von Herzmuskelentzündungen und plötzlichem Herzstillstand berichtet wird: so z.B. der Radprofi Gerd Ausdehm, der aufgrund einer nicht auskurierten viralen Herzmuskelerkrankung zum Pflegefall wurde. Die Behandlung derartiger schwerer Erkrankungen steht häufig in Verbindung mit hohen Krankenhauskosten einschließlich der Kosten für Herztransplantationen als letzte Therapiemaßnahme. Obwohl es in den letzten zehn Jahren dank der Einführung molekularbiologischer Methoden Verbesserungen hinsichtlich der Diagnostik von viralen Herzerkrankungen gegeben hat, finden derartige Nachweismethoden zur Zeit keine breite Anwendung.

Für viele als Ätiologie in Frage kommende virale Erreger gibt es daher nicht genügend Daten hinsichtlich ihrer Prävalenz oder Inzidenz, um ihnen eine direkte Mitwirkung in der Pathogenese einzelner kardiovaskulärer Erkrankungen zuschreiben zu können. Eine ähnliche Problematik stellt sich auch hinsichtlich der Rolle von Virusinfektionen als Ursache von Komplikationen, die nach einer erfolgreichen Herztransplantation oder Verpflanzung humaner Herzklappen (sog. Homografts) auftreten können, wie z.B. Arteriosklerose, koronare Vaskulopathie oder lymphoproliferative Erkrankung, die je nach Schweregrad auch zum Transplantatverlust führen können.

Im Rahmen einer Kooperation zwischen dem Robert Koch-Institut (RKI) und dem Deutschen Herzzentrum Berlin (DHZB) sind daher in der vorliegenden Studie Untersuchungen an Herzgewebe von Herztransplantatempfängern und Herzspendern hinsichtlich des Vorkommens von viralen Genomsequenzen durchgeführt worden, um die Prävalenz einzelner relevanter Erreger zu klären. Die Ergebnisse sollen als Grundlage dienen, um einen Zusammenhang zwischen Virusinfektion und Herz-

krankheit zu verdeutlichen und um vorab die Frage zu klären, ob eine Relevanz hinsichtlich möglicher Konsequenzen für Transplantationen besteht, die in Zukunft weitere Studien zur Bestätigung notwendig macht.

1.1 Anatomie des Herzens

Der Blutkreislauf bildet ein in sich geschlossenes System, bei dem das Blut über ein aus Arterien und Venen bestehendes Gefäßsystem ständig zu allen Punkten des Körpers hin- und rücktransportiert wird. Im Mittelpunkt dieses Transportsystems steht das Herz (*Cor*) als kombinierte „Druck-Saug-Pumpe“, die für die kontinuierliche Strömung und den Rücktransport des Blutes sorgt.

Um den Aufbau des Herzens verstehen zu können, muss man sich zunächst mit dem Kreislaufsystem im menschlichen Körper auseinandersetzen (Abb. 1). Im Wesentlichen sorgen zwei parallel zueinander funktionierende Kreisläufe dafür, dass der gesamte Körper mit Blut versorgt wird (Sommer, 1986).

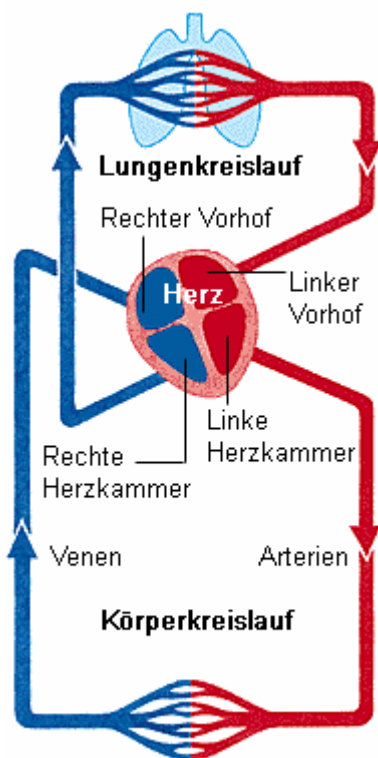


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Herz-Lungen-Kreislaufes. (Quelle: www.medicine-world-wide.de)

Zum einen ist dies ein kleiner Kreislauf, der sog. Lungenkreislauf, und zum anderen der viel größere Körperkreislauf. Die Druckverhältnisse sind ungleich aufgrund der unterschiedlichen Blutmenge, die transportiert wird. Das heißt, dass im Körperkreislauf ein größerer Druck in den Blutgefäßen herrscht als im Lungenkreislauf.

Um in beiden Kreisläufen gleichzeitig Blut fließen zu lassen, ist das Herz (Abb. 2) durch eine schrägverlaufende Herzscheidewand (Septum) in zwei Hälften geteilt, die linke und rechte Herzhälfte. Jede Hälfte besteht aus einem Vorhof (Atrium), dem Blut aus Venen zugeführt wird, und einer Kammer (Ventriculus), die das Blut aus dem Vorhof aufnimmt und in

eine Arterie pumpt. Die Bezeichnungen „Venen“ und „Arterien“ richten sich nicht nach der Beschaffenheit des Blutes, sondern nach der Blutstromrichtung in den Gefäßen. Gefäße, die das Blut herzwärts führen, heißen Venen, ganz gleich, ob sie „arterielles“ (sauerstoffreiches) oder „venöses“ (sauerstoffarmes) Blut enthalten. Das Umgekehrte gilt für Arterien (Sommer, 1986).

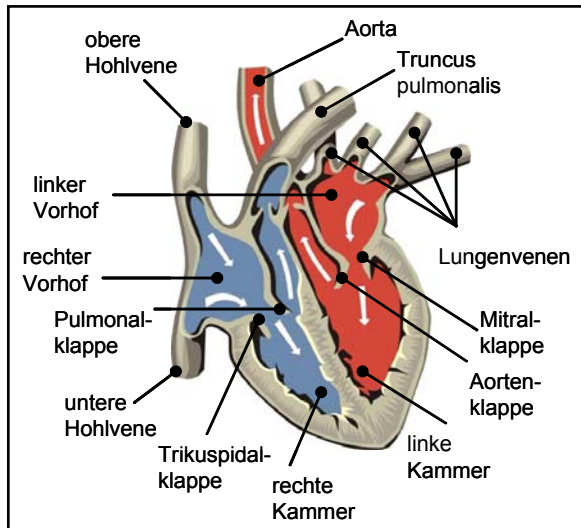


Abbildung 2: Schema der Unterteilung des Herzens. Die Pfeile zeigen die Blutstromrichtung an. (aus: www.medizinus.de)

Der rechte Vorhof erhält venöses Blut aus dem Körper über die beiden großen Hohlvenen und aus dem Herzen selbst über die Herzkranzvene. Das venöse Blut gelangt dann in die rechte Kammer, die es in die Lungenschlagader (*Truncus pulmonalis*) befördert. Aus den Lungen kehrt das mit

Sauerstoff angereicherte Blut über die Lungenvenen (*Venae pulmonales*) zum Herzen – in den linken Vorhof – zurück und wird durch die linke Kammer in die große Körperschlagader (Aorta) weitergeleitet. Klappen mit Ventilfunktion sorgen dafür, dass das Blut nur in einer Richtung fließt: zum einen Segelklappen an der jeweiligen Vorhof-Kammer-Grenze (Trikuspidal- und Mitralklappe) und zum anderen Taschenklappen an der jeweiligen Kammer-Gefäß-Grenze (Pulmonal- und Aortenklappe).

Die Herzwände bestehen hauptsächlich aus Herzmuskelgewebe (Myokard), dem sich innen eine dünne Bindegewebsschicht mit endothelialer Oberfläche auflegt, die Herzinnenhaut (Endokard). Die Außenschicht wird vom Epikard, dem inneren Blatt des Herzbeutels (Perikard), gebildet. Zwischen Epi- und Myokard verlaufen, in Fettgewebe eingebettet, die Herzkranzgefäße. Die Klappen sind muskelfreie Duplikaturen der Herzinnenhaut. Entzündungen des Endokards befallen vorzugsweise die Klappen und können zu Herzklappenfehlern führen (Sommer, 1986).

Von allen oben erwähnten Herzschichten nimmt das Myokard eine besondere Stellung ein, da es nicht nur für die Kontraktion und Pumpleistung des Herzens verantwortlich ist, sondern auch das herzeigene Erregungsbildungs- und -leitungssystem enthält. Darüber hinaus ist es maßgeblich für die Größe und Gestalt des Herzens.

Entsprechend den unterschiedlichen Drücken, die von den vier Abteilungen (zwei Vorhöfen/zwei Kammern) des Herzens zur Beförderung des Blutes aufgebracht werden müssen, ist das Myokard unterschiedlich entwickelt (Abb. 3).

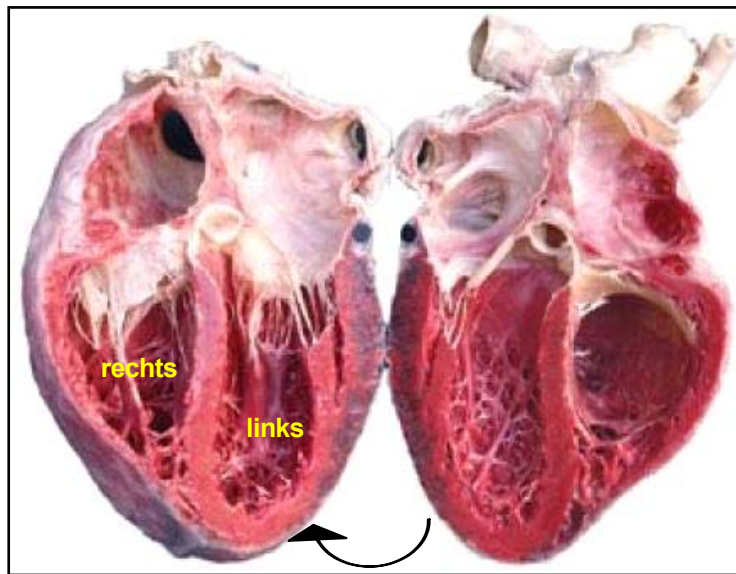


Abbildung 3:

Plastinat der Herzkammern als Schnittmodell.

Die unterschiedlichen Wandstärken sind gut erkennbar.

(Bild: Institut für Plastination, Heidelberg)

Die dünnste Muskelschicht haben die Vorhöfe (1-3 mm), aus denen die Kammern das Blut mehr ansaugen, als dass es von der Vorhofmuskulatur kam-

merwärts gepumpt werden müsste. Die rechte Kammer hat nur den Widerstand der Lungenstrombahn zu überwinden, die linke hingegen den wesentlich größeren des Körperkreislaufs. Diese Unterschiede spiegeln sich in der Wandstärke der Kammern wider (Abb. 3): Die Myokardschicht des linken Ventrikels (10-30 mm) ist wesentlich kräftiger ausgebildet als die des rechten (5-10 mm).

Die Kammermuskulatur bildet in ihrer Gesamtheit je ein Schraubensystem mit unterschiedlichen Steigungswinkeln, so dass bei Kontraktion jede Kammer sowohl im Längs- als auch im Querdurchmesser abnimmt. Eine stärkere Blutfüllung des Herzens kann zu bleibender Erweiterung (Dilatation) der Hohlräume und Zunahme der Wandmuskulatur führen, wie sie bei Schwerarbeitern und Sportlern (sog. Arbeits- oder Aktivitätshypertrophie – als Anpassung an eine physiologisch funktionelle Mehrbelastung), aber auch bei Menschen mit Herzfehlern (Herzhypertrophie bei pathologischer Druck- oder Volumenbelastung des Herzens) vorkommen. Auf chronische

Mehrbelastung reagiert das Herz mit morphologischen Veränderungen. Die Muskelmasse vermehrt sich durch Dickenzunahme der einzelnen Herzmuskelzellen und adaptiert sich so an die andauernde Mehrbeanspruchung. Wenn die Blutversorgung mit der Vermehrung der Muskulatur nicht mehr Schritt halten kann, kommt es in Folge von Ernährungsstörungen zu Myokardschäden. Der geschädigte Herzmuskel kann seine Funktionen nicht mehr voll erfüllen, so dass Zeichen der Herzinsuffizienz (Herzschwäche) auftreten: geringe körperliche Belastbarkeit, Stauungserscheinungen im Kreislauf, die mit Blaufärbung der Lippen und der Gesichtshaut (Zyanose), Schwellungen (Ödemen) der Beine und Atemnot (Dyspnoe) einhergehen (Sommer, 1986).

1.2 Erkrankungen des Herzens

Die Herzinsuffizienz ist das weltweit häufigste kardiale Erkrankungsbild mit mehreren Millionen Patienten. Die Gesamtprävalenz klinischer Fälle wird auf 3 bis 20 Fälle pro 1000 Einwohner geschätzt. Die Zahl der Neuerkrankungen ist bei Männern höher als bei Frauen und steigt mit zunehmendem Alter an. Die Letalität hierbei beträgt 20 bis 60 % pro Jahr (McMurray und Stewart, 2000).

Der Begriff Herzinsuffizienz bezeichnet eine Situation, in der das Herz aufgrund einer Störung der eigenen Funktion oder einer Störung seiner „Arbeitsbedingungen“ innerhalb des Herz-Kreislauf-Systems nicht in der Lage ist, Blut in der Menge oder Geschwindigkeit durch den Körper zirkulieren zu lassen, die die Stoffwechsel- und Energiebedürfnisse der Organe und Körpergewebe befriedigt (Schettler und Greten, 1998). Die Herzinsuffizienz stellt somit keine eigenständige Erkrankung dar, sondern umfasst einen durch pathologische hämodynamische Veränderungen hervorgerufenen Symptomenkomplex, der seine Ursache in allen Anteilen des Herz-Kreislauf-Systems (Herz, periphere Blutgefäße, zirkulierendes Blutvolumen) oder anderen körpereigenen Regelsystemen (z.B. vegetatives Nervensystem) haben kann. Die Diagnose „Herzinsuffizienz“ ist daher erst der Ausgangspunkt zur differentialdiagnostischen Klärung zugrunde liegender Ursachen. Zu den Ursachen mit primär myokardialer Schädigung gehören unter anderem die Myokarditis (mit akuter Symptomatik), die dilatative Kardiomyopathie sowie die koronare Herzkrankheit (jeweils mit

chronischer Symptomatik), für die unter anderem auch Viren als infektiöse Agentien beschrieben worden sind [siehe Kap. 1.3], und deren Charakteristika im Folgenden kurz dargestellt werden.

1.2.1 Die Myokarditis

Als Myokarditis wird eine Entzündung des Herzmuskelgewebes mit Myozytennekrose, Ödembildung und Gefügedilatation bezeichnet, die häufig das Endokard und/oder Epi- bzw. Perikard mit einbezieht (AWMF-Leitlinie Nr. 023/025). Ursache können viele Faktoren sein, die entweder nach einer infektiösen oder nicht-infektiösen Ätiologie eingeteilt werden (Tab. 1).

Tabelle 1: Ursachen einer Myokarditis.

Infektiöse Ätiologie	Beispiele
Viren	Enteroviren, insbesondere Coxsackie-B-, seltener Coxsackie-A- und Echoviren
Bakterien	bei Sepsis oder Bakteriämie, Mykobakterien, Spirochäten (Leptospirose, Lyme-Erkrankung)
Rickettsien	Q-Fieber
Pilze	bei Abwehrschwäche (Aspergillose, Aktinomykose, Candidiasis)
Protozoen	z.B. <i>Trypanosoma cruzi</i> als Erreger der in Südamerika häufigen Chagas-Krankheit
Nicht-infektiöse Ätiologie	Beispiele
Kollagenosen und Immunkomplex-Vaskulopathien	Mitbeteiligung von Myokard und/oder Gefäßen
toxisch	z.B. Diphtherie, Kokain, hochdosierte Katecholamine
Hypersensitivitätsreaktion	auf Medikamente
Riesenzell-Myokarditis	tritt in 30 % der Transplantate neu auf
Sarkoidose	entzündliche Erkrankung des mesenchymalen Gewebes
Abstoßungsreaktion	nach Herztransplantation

aus: Schettler und Greten, 1998.

Die häufigste Form stellt die Virusmyokarditis dar. Maisch et al. (2003) berichten, dass bei bis zu 50 % der Patienten mit einer aktiven Myokarditis unter anderem enterovirale Genomstrukturen – Coxsackie-B-Viren, seltener Coxsackie-A- und Echoviren – in Myokardbiopsien nachgewiesen werden konnten.

Eine akute Virusmyokarditis tritt meist im Rahmen einer allgemeinen (systemischen) Virusinfektion (grippaler Infekt oder Magen-Darm-Erkrankung) auf und verläuft meist asymptomatisch. Das Spektrum der Beschwerden ist hierbei breit und die Ausprägung sehr unterschiedlich: Leistungsminderung, Ermüdbarkeit, Schwäche, grippeähnliche Beschwerden mit oder ohne Fieber, gelegentlich dem akuten Myokardinfarkt ähnelndes Krankheitsbild usw. Aufgrund der oft unsicheren Diagnose – die meisten Befunde (z.B. Entzündungsparameter, EKG-Veränderungen) sind nur bei sehr ausgeprägten Formen vorhanden – ist die Virusmyokarditis epidemiologisch schwer fassbar; hier besteht eine hohe Dunkelziffer! Man vermutet jedoch, dass bei Virusinfektionen in 1 % bis 5 % der Fälle eine kardiale Mitbeteiligung vorkommt (Schettler und Greten, 1998). Ein immunhistochemischer bzw. molekularbiologischer Nachweis viraler Erreger in Endomyokardbiopsien wäre für eine bessere Diagnostik notwendig. Die akute Virusmyokarditis verläuft meist gutartig, da in 70 % der Fälle eine rasche Ausheilung auftritt (Spontanremission). In 20 % der Fälle kommt es zu einer sog. Defektheilung mit eingeschränkter Pumpfunktion des Herzens. Ein Übergang in eine chronische Verlaufsform ist möglich, bei der als potenzielles Endstadium eine dilatative Kardiomyopathie mit progressiver Herzinsuffizienz angenommen wird (die Häufigkeit ist umstritten). Ein fulminanter Verlauf der Myokarditis mit therapieresistenter Herzinsuffizienz, die innerhalb weniger Tage letal ist, tritt eher selten auf. Als Risikogruppen für eine akute Virusmyokarditis werden vorwiegend jüngere Männer, schwangere Frauen, Kinder (vor allem Neugeborene) und immungeschwächte Personen genannt (Symposium: Virale Herzerkrankungen, Jena, 19.09. bis 21.09.2002).

1.2.2 Die dilatative Kardiomyopathie

Die dilatative Kardiomyopathie (DKMP) ist von der Weltgesundheitsorganisation als eine Herzmuskelerkrankung definiert, die zur Dilatation und eingeschränkten systolischen Funktion (verminderte Auswurfleistung) des linken Ventrikels oder beider

Ventrikel führt (Richardson et al., 1996). Die Ätiologie der DKMP kann unterschiedlicher Natur sein – idiopathisch, familiär/genetisch, viral und/oder immunologisch usw. (Tab. 2). Sie kann aber auch in Verbindung mit einer anderen kardiovaskulären Erkrankung entstehen, bei der der Grad der myokardialen Dysfunktion durch eine gestörte Ventrikelbefüllung (Abgrenzung gegenüber der restriktiven Kardiomyopathie) oder der Ausbreitung einer ischämischen Schädigung (Abgrenzung gegenüber der ischämischen Kardiomyopathie) nicht erklärbar ist.

Tabelle 2: Ursachen einer DKMP.

Ätiologie	Häufigkeit
1. Idiopathisch (ohne erkennbare Ursache)	40%
2. Familiär/genetisch (überwiegend autosomal-dominant vererbt)	25%
3. Infektiös Myokarditis	10-30 %*
HIV	4%
4. Toxisch Alkohol	3%
Anthrazykline	1%
Kokain	1%
5. Infiltrativ z.B. Amylo-/Sarkoidose, Hämochromatose	6%
6. peripatale DKMP	5%
7. Kollagenosen	4%
8. Endokrine Ursachen z.B. Hyper-/Hypothyreose, Phäochromozytom	1%

Die Angaben stammen von Osterziel et al. (2001) nach Ausschluss von Patienten mit arterieller Hypertonie, koronarer Herzerkrankung, Herzklappenerkrankungen und restriktiver Kardiomyopathie.

* Angaben aus Symposium: Virale Herzerkrankungen, Jena, 2002.

Weltweit leiden ca. 22 Millionen Patienten (meist über 55 Jahre alt und männlich) an einer DKMP. Die jährliche Inzidenz der DKMP in westlichen Industriestaaten liegt bei ca. sechs bis acht/100 000 Einwohnern, die Prävalenz beträgt ca. 36/100 000 Einwohnern (Dec und Fuster, 1994; Cowie et al., 1999). Obwohl keine genauen epidemiologischen Daten vorliegen, ist anzunehmen, dass die Häufigkeit in der Bundesrepublik Deutschland ähnlich ist. Mit 750 Millionen Euro Krankenhauskosten ist die DKMP die die meisten Kosten verursachende Erkrankung in Deutschland überhaupt

und 8- bis 30-mal teurer im Spätstadium als im Frühstadium (Symposium: Virale Herzerkrankungen, Jena, 19.09. bis 21.09.2002). In über 70 % aller Fälle manifestiert sich die DKMP durch Symptome und Zeichen einer Herzinsuffizienz. Sie stellt mit einem Anteil von 18 % bis 28 % eine der Hauptursachen der Herzinsuffizienz dar. Das häufigste initiale Symptom (bei ca. 88 % der Patienten) ist Atemnot bei Belastung. Bei etwa 25 % der Patienten tritt Angina pectoris auf und in 14 % geht der Diagnose eine ungeklärte kurze Bewusstlosigkeit voraus. Die mittlere Überlebenserwartung bei symptomatischen Patienten liegt bei ca. 5 Jahren (Dec und Fuster, 1994). Der Verlauf der DKMP ist jedoch sehr variabel. Die Lebenserwartung scheint auch von der Ätiologie der DKMP abzuhängen, denn Patienten mit DKMP infolge z.B. einer infiltrativen Herzmuskelerkrankung oder einer Myokarditis weisen trotz therapeutischer Intervention eine signifikant schlechtere Prognose (mit nur 50-60 % Überlebensrate) auf als Patienten mit einer idiopathischen DKMP (Symposium: Virale Herzerkrankungen, Jena, 19.09. bis 21.09. 2002).

1.2.3 Die koronare Herzkrankheit

Unter einer koronaren Herzkrankheit (KHK) versteht man stenosierende Veränderungen des Herzkranzgefäßsystems auf dem Boden einer Arteriosklerose, die zu einem Missverhältnis zwischen Sauerstoffbedarf und Sauerstoffangebot im abhängigen Herzmuskelareal führen können. Die KHK ist ein multifaktoriell bedingtes Krankheitsbild, das die Koronararterien isoliert oder diffus befällt und unterschiedlich schnell verläuft. Schweregrad und Dauer der Ischämie (mangelnde Durchblutung) bestimmen den folgenden Verlauf in Form von Angina pectoris, ischämisch bedingter Herzinsuffizienz, Herzrhythmusstörungen und akutem Myokardinfarkt (AWMF-Leitlinie Nr. 019/001).

Die KHK stellt die häufigste Todesursache in den industrialisierten Ländern dar. Sie tritt am häufigsten ab dem 5. Lebensjahrzehnt auf und nimmt bei Frauen nach der Menopause zu (Schettler und Greten, 1998). Das Risiko einer KHK steigt bei mehreren gleichzeitigen Risikofaktoren und mit dem Ausmaß ihrer Ausprägungen an. Durch Veränderung des Lebensstils, Ernährungsumstellung und medikamentöse Therapie beeinflussbare Risikofaktoren (Plasmalipide und Lipoproteine, Bluthochdruck, Zigarettenkonsum, Diabetes mellitus, Übergewicht, erhöhtes Fibrinogen usw.)

können von unbeeinflussbaren (Alter, Geschlecht, Familienanamnese usw.) unterschieden werden (Kannel et al., 1961). Aufgrund dieser zahlreichen gut dokumentierten, nicht-infektiösen Risikofaktoren der KHK wurde die Hypothese der Infektionsgenese der KHK (Osler, 1985) in den letzten Jahrzehnten nicht mehr weiter verfolgt. Neuere Erkenntnisse [siehe Kap. 1.3.2] der letzten Jahre rufen jedoch die alten Konzepte einer infektiösen Komponente wieder in Erinnerung (Danesh et al., 1997; Ellis, 1997; Gupta und Camm, 1998a; Gupta und Camm, 1998b; Lamb und Ferns, 1999; Meier, 1999; Smith et al., 1999; Epstein et al., 2000; Leinonen und Saikku, 2000; Morré et al., 2000; Pellicano et al., 2000; Wierzbicki und Hagemeyer, 2000; Shoenfeld et al., 2001; Chen et al., 2003; Madjid et al., 2004).

Die Dynamik des Verlaufs einer KHK hängt davon ab, in welchem Ausmaß bestehende Koronarverengungen (Stenosen) zu einer Reduktion des arteriellen Blutflusses und damit der Sauerstoffzufuhr im abhängigen Myokardareal führen. Über Jahre hinweg asymptomatische Verlaufsformen oder lange Phasen einer gleich bleibenden Symptomatik sind ebenso möglich wie eine lange Progression der Symptomatik. Auch können durch Aufbrechen instabiler sog. atheromatöser Plaques oder Thrombusablagerungen bedingte Phasen schneller Beschwerdeprogression mit „Stillständen“ abwechseln. Auch ohne vorausgehende Warnsymptome (Angina pectoris, Atemnot, Leistungsknick usw.) kann ein akutes koronares Ischämiesyndrom (z.B. Myokardinfarkt) auftreten: Bis zu 50 % der Patienten, die ihren ersten Myokardinfarkt erleiden, haben nie zuvor Angina pectoris gehabt (Schettler und Greten, 1998).

Nach dem akuten Infarkt ereignis läuft ein Prozess des sog. Remodelling ab: Als Anpassung an die vermehrte Belastung reagieren die gesunden Myokardanteile mit Hypertrophie, während noch eine Ausdehnung des Infarktgebietes eintritt. In der Frühphase sind subakute Komplikationen (z.B. Ventrikelperforation) möglich. Ohne Behandlung kann es danach im Verlauf von Monaten bis Jahren durch Dilatation des Ventrikels zu einer manifesten Herzinsuffizienz kommen (5 Jahre: ca. 15 %; 10 Jahre: ca. 20 % der Patienten). Die Prognose wird durch Reinfarkte, letale Herzrhythmusstörungen oder Progression der Herzinsuffizienz bestimmt (Schettler und Greten, 1998).

1.3 Virale Ursachen und Pathogenese entzündlicher Herzerkrankungen

Die Erkenntnisse bezüglich der pathogenetischen Mechanismen der akuten Myokarditis und damit assoziierter chronischer Herzmuskelerkrankungen (chronische Myokarditis/DKMP) sowie der Arteriosklerose/KHK wurden in den vergangenen Jahrzehnten ständig erweitert. Dennoch bestehen teilweise zu einzelnen Hauptaspekten noch Unstimmigkeiten, insbesondere hinsichtlich der direkten Virus-induzierten Zytolyse, der Viruspersistenz und der viralen Immunpathogenese bzw. Autoimmunität. In der Aufklärung der pathogenetischen Mechanismen spielen Infektionsstudien im Tiermodell (in der Maus) eine tragende Rolle, obwohl noch nicht endgültig bewiesen ist, dass die Ergebnisse hieraus auch Relevanz für Herzerkrankungen beim Menschen haben. Trotzdem bildet die Aufklärung der pathogenetischen Mechanismen bei viralen Herzerkrankungen eine der Voraussetzungen für die Entwicklung spezifischer Therapiemaßnahmen [siehe Kap. 1.4]. Im Folgenden wird kurz der bisherige Kenntnisstand der viralen Ursachen, Faktoren und möglichen Modelle – insbesondere für Enteroviren und Parvovirus B19 bei der viralen Myokarditis/DKMP sowie für das humane Zytomegalievirus bei der Arteriosklerose/KHK – der pathogenetischen Mechanismen für entzündliche Herzerkrankungen wiedergegeben.

1.3.1 Ätiologie und Pathogenese der Virus-induzierten Myokarditis und DKMP

Ätiologisch und pathogenetisch wichtige Hinweise für die Viruspathogenese der Myokarditis/DKMP lassen sich vor allem aus kontrollierten *in situ* Hybridisierungsstudien unter Einbeziehung histologischer und immunhistologischer Parameter, aber auch aus Untersuchungen mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) ableiten (Baboonian und Treasure, 1997; Klingel, 2002; Maisch et al., 2003). Dabei wurden die Enteroviren (EV) – insbesondere Coxsackieviren der Gruppe B (Typ 1 bis 5), aber auch verschiedene Coxsackieviren der Gruppe A und Echoviren (Typ 1, 6, 9, 19, 21) – sowie Adenoviren (ADV) aus der Subgruppe C (Typ 2 und 5) als häufig vorkommende kardiotope Erreger im menschlichen Herzen identifiziert (Martin et al., 1994; Griffin et al., 1995; Martino et al., 1995; Baboonian und Treasure, 1997; Lozinski et al., 1994; Pauschinger et al., 1999a).

Neben diesen sind weitere Erreger als Faktoren einer möglichen viralen Ätiologie für entzündliche Myokarditis/DKMP beschrieben worden: Hepatitis-C-Virus – vornehmlich in Japan (Matsumori et al., 2000), Herpesviren wie das Epstein-Barr-Virus (Herbert et al., 1995), HHV-6 (Fukae et al., 2000), Herpes simplex Virus (Martin et al., 1994; Griffin et al., 1995), Zytomegalievirus (HCMV) (Martin et al., 1994; Griffin et al., 1995; Schönian et al., 1995), HIV (Hershkowitz et al., 1994; Barbaro et al., 1998; Bowles et al., 1999), Influenza A und B Virus (Giles und Shuttleworth, 1957; Karjalainen et al., 1980; Ray et al., 1989), Mumpsvirus (Ni et al., 1997), Rubellavirus (Thanopoulos et al., 1989) und zunehmend Parvovirus B19 (PVB19) (Schowengerdt et al., 1997; Enders et al., 1998; Nigro et al., 2000; Pankuweit et al., 2003; Donoso Mantke et al., 2004a).

Meta-Analysen deuten zwar immer mehr auf einen Zusammenhang zwischen den Erregern und Herzmuskelentzündungen hin, sie zeigen aber auch, dass häufig noch einzelne Prävalenzen mit einem großen Unsicherheitsfaktor behaftet sind, da viele Nachweisstudien mit kleinen Probenzahlen durchgeführt wurden (Klingel, 2002; Maisch et al., 2003). Dabei kann die Häufigkeit des Nachweises einer Virus-induzierten Herzmuskelerkrankung beträchtlich schwanken und beispielsweise zwischen 1 % und 83 % liegen (Tabelle 3). Die Studie zur vorliegenden Dissertation sollte zu einer Klärung der bisher unsicheren Prävalenzangaben insbesondere für EV, ADV, HCMV, PVB19 und Influenzaviren beitragen, um den ätiologischen Zusammenhang zwischen Virusinfektion und Herzkrankheit zu verdeutlichen. Tabelle 3 zeigt zum Vergleich für einige der oben erwähnten Erreger eine Auswertung aus verschiedenen Studien.

Tabelle 3: Nachweis viraler Nukleinsäuren mittels PCR in verschiedenen Studien.

Virus	Diagnose	PCR positiv	Autoren
EV	DKMP	21/55 (38 %)	Rey et al., 2001
	DKMP	9/26 (35 %)	Fujioka et al., 2000
	DKMP	9/21 (43 %)	Archard et al., 1998
	DKMP	11/19 (58 %)	Andreoletti et al., 1996
	DKMP	7/42 (17 %)	Ueno et al., 1995
	DKMP	4/53 (8 %)	Giacca et al., 1994
	DKMP	6/19 (32 %)	Schwaiger et al., 1993
	DKMP	6/50 (12 %)	Keeling et al., 1992
	DKMP	30/45 (67 %)	Petitjean et al., 1992
	Myokarditis	18/45 (40 %)	Pauschinger et al., 1999b
	Myokarditis	4/5 (80 %)	Ueno et al., 1995
	Myokarditis	5/6 (83 %)	Nicholson et al., 1995
	Myokarditis	2/10 (20 %)	Hilton et al., 1993
ADV	Herzinsuffizienz	12/94 (13 %)	Pauschinger et al., 1999a
	AIDS	6/32 (19 %)	Bowles et al., 1999
	Myokarditis	15/38 (40 %)	Martin et al., 1994
HCMV	AIDS	3/32 (9 %)	Bowles et al., 1999
	DKMP	13/64 (20 %)	Schönian et al., 1995
	Myokarditis	1/38 (3 %)	Martin et al., 1994
PVB19	DKMP	3/13 (23 %)	Pankuweit et al., 2003
	Myokarditis	3/360 (0,8 %)	Schowengerdt et al., 1997

Hinsichtlich der Pathogenese wird vermutet, dass unabhängig von der Virusart stets ein ähnlicher mehrstufiger Prozess abläuft, der zur Schädigung der Herzmuskulatur führt (P. Muir, Symposium „Viruses and cardiovascular disease“, XIIth International Congress of Virology, Paris, 27.07. bis 01.08.2002). Demnach befallen über die Blutbahn in das Herz verschleppte Viren die Herzmuskelzellen und replizieren darin. Manche Erreger wie das am häufigsten nachgewiesene Coxsackievirus B3 induzieren bei einer akuten Infektion die Zelllyse; sie schädigen das Gewebe also direkt. Andere stören die physiologischen Vorgänge in den Myozyten so stark, dass diese ihre Funktion nicht mehr zu erfüllen vermögen. Des Weiteren setzen die Viren Abwehrreaktionen in Gang, in deren Verlauf Zytokine freigesetzt werden. Diese Bo-

tenstoffe können das Herzmuskelgewebe schädigen. Gelegentlich schreitet die Zerstörung am Herzmuskel auch dann fort, wenn die Erreger eliminiert sind oder zumindest nicht mehr replizieren; dann kommen Autoimmunreaktionen in Gang. Die Abwehrzellen greifen anstelle des Erregers nun Strukturen der Herzmuskulatur an (Abb. 4).

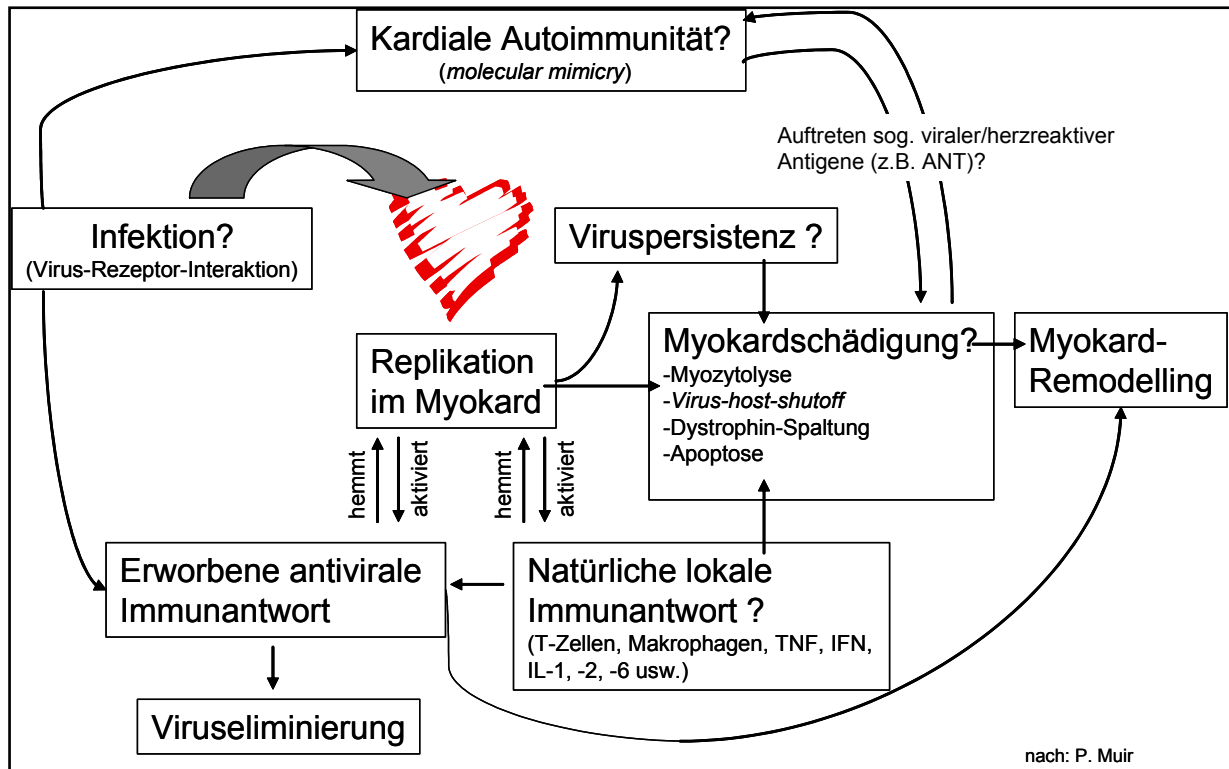


Abbildung 4: Mögliche Mechanismen der viralen Herzmuskelerkrankung.

Das „?“ deutet an, dass hier unter anderem noch Unstimmigkeiten bezüglich der Wirkungsweise besonders hinsichtlich der Entstehung chronischer Verlaufsformen bestehen. TNF: Tumornekrosefaktor; IFN: Interferon; IL: Interleukin; ANT: Adenin-Nukleotid-Translokator.

Spezifische Rezeptoren stellen wichtige Pathogenitätsdeterminanten im Rahmen viraler Infektionen dar. Sie bestimmen nicht nur den Ort der primären Infektion und den Mechanismus der Virusinternalisierung, sondern beeinflussen in der postvirämischen Phase auch die Ausbreitung der Infektion auf weitere Zielorgane und Gewebe. Die Bedeutung der Virus-Rezeptor-Interaktionen als spezifische Virulenzfaktoren und Schlüsselfaktoren im Verständnis der Pathogenese viraler Infektionen wird außerdem dadurch bekräftigt, dass viele Viren mit mehr als einem Rezeptorprotein interagieren können (Modrow et al., 2003).

Es ist auf den ersten Blick erstaunlich, dass zwei so grundlegend verschiedene Virusfamilien wie die humanen Adenoviren und die humanen Enteroviren (vor allem Coxsackie-B-Viren) Myokarditis und DKMP verursachen können. Die Beschreibung des sog. Coxsackie- und Adenovirusrezeptor (CAR), ein 46 kD Transmembranprotein aus der Immunglobulin-Superfamilie, an welchen beide Viren binden können, bot hier letztendlich eine Teilerklärung (Bergelson et al., 1997a; Carson et al., 1997; Tomko et al., 1997; Roelvink et al., 1998).

Interessanterweise scheint die Expression des CAR in Verbindung mit Myokarditis/DKMP erhöht zu sein. Noutsias et al. (2001) berichteten, dass im Gegensatz zu normalen Kardiomyozyten, die eine geringe Expression von CAR aufweisen, in den Herzen von Patienten mit DKMP eine erhöhte CAR-Expression nachweisbar ist. Dabei wird CAR präferenziell in den Glanzstreifen und im Sarkolemma der Herzmuskelzellen exprimiert. Die Hochregulierung der Virusrezeptoren und die Aufnahme der Viren in die Herzmuskelzellen findet daher in einer kritischen Membranregion (sog. *tight junctions*) statt, die für die funktionelle Integrität des Herzmuskels von entscheidender Bedeutung ist (Selinka et al., 2004). Des Weiteren lassen Experimente im Modell der Autoimmun-Myokarditis eine Induktion der CAR-Expression durch inflammatorische Mediatoren vermuten (Ito et al., 2000). Es ist noch nicht geklärt, ob die Induktion von CAR primär durch die Virusinfektion oder vielmehr durch nicht-virale Faktoren, die im weiteren Verlauf einer Infektion entstehen, getriggert wird. Zusätzlich zur Interaktion mit CAR dient einigen Coxsackievirus-B-Serotypen der *decay-accelerating factor* (DAF/CD55), ein 70 bis 80 kD großes Glykosylphosphatidyl-inositol-verankertes Membranprotein der Komplement-Regulatorproteinfamilie, als Korezeptor (Bergelson et al., 1995; Shafren et al., 1995; Martino et al., 1998). Im Gegensatz zu CAR ist der DAF-Rezeptor allein für eine Infektion nicht ausreichend (Shafren et al., 1995; Shafren et al., 1997). Es wird vermutet, dass die Funktion von DAF während der Coxsackievirus-B-Infektion darin besteht, Viruspartikel effizient zu binden, um dadurch die Interaktion mit dem CAR-Protein zu erleichtern (Selinka et al., 2004). DAF wird von vielen Zellen des hämatopoetischen und nicht-hämatopoetischen Systems exprimiert und ist auch in humanen Herzmuskelzellen und im vaskulären Endothel präsent (McNearney et al., 1989; Klingel et al., 1998; Schmidtke et al., 2000). Untersuchungen mit klinischen Isolaten zeigten, dass selbst innerhalb eines Serotyps große Unterschiede bezüglich der Interaktion

mit CAR und DAF bestehen. Dies spiegelt sich möglicherweise in der unterschiedlichen Virulenz einzelner Virusvarianten wider – insbesondere finden sich unter klinische Isolaten von Coxsackievirus B überwiegend an DAF-bindenden, hämagglutinierenden Coxsackievirus-B-Stämme (Bergelson et al., 1997b). Selinka et al. (2004) berichteten, dass der DAF-bindende Phänotyp einiger Coxsackievirus-B3-Varianten im Rahmen der Infektion eine funktionelle Relevanz besitzt und eine schnellere Ausbreitung von Zelle zu Zelle vermitteln kann. Eine Wechselwirkung mit DAF könnte von besonderer Bedeutung für die Infektion von Zellen sein, die wenig CAR-Proteine exprimieren. Da bei gleichzeitiger Gabe von CAR- und DAF-spezifischen Antikörpern synergistische inhibitorische Effekte beobachtet werden, wurde die Hypothese eines funktionellen CAR-DAF-Rezeptor-Komplexes untersucht (Pasch et al., 1999; Selinka et al., 2002; Selinka et al., 2004). Martino et al. (1998) berichteten ebenfalls von einer räumlichen Assoziation von CAR und DAF auf der Zelloberfläche, jedoch höchstwahrscheinlich ohne kovalente Bindung der beiden Moleküle.

Zusätzlich zur Replikations-determinierenden regulatorischen Sequenz der 5'-nicht-codierenden Region (5'-NCR) der EV (Tracy et al., 1996; Lee et al., 1997; Dunn et al., 2000; Feuer et al., 2004) scheint in erster Linie die Affinität der Viren zum CAR den Kardiotropismus zu beeinflussen. Bereits kleinste Unterschiede in der Virus-Rezeptor-Wechselwirkung, die die Virusbindung, Virusinternalisierung und Virusausbreitung beeinträchtigen, können die Pathogenese Coxsackievirus-induzierter Erkrankungen entscheidend beeinflussen.

Der unterschiedliche Zelltropismus der kardiotropen Erreger bedingt unterschiedliche pathogenetische Prinzipien, die derzeit für die EV-Myokarditis – hier das „Coxsackievirus-Modell“ der Herzmuskelerkrankung – am besten verstanden sind. Das Virus initiiert den Krankheitsprozess mit Virus-induzierten zytolytischen Veränderungen von Myozyten während der akuten Phase der Virusreplikation (Chow et al., 1992; McCarthy et al., 2000) – unter anderem durch die virusbedingte Abschaltung des Zellstoffwechsels (Modrow et al., 2003), durch Spaltung des muskulären Dystrophins und Änderungen im Zytoskelett bzw. Sarkolemma (Bowles und Vallejo, 2003) sowie durch Induktion apoptotischer Prozesse (Henke et al., 2000; Henke et al., 2001). Die Immunantwort (zytotoxische T-Lymphozyten CD4+/CD8+, Zytokine usw.) kann auch während dieser frühen Phase der Erkrankung zu zusätzlichen Schädigungen von

Myozyten führen (Lane et al., 1992; Matsumori et al., 1994; Yamada et al., 1994; Huber et al., 1999; Binah, 2002). Das Virus kann sodann als persistierendes molekulares Pathogen eine chronische Entzündungsreaktion aufrechterhalten oder aber auch in eine latente Infektion ohne entzündliche Begleitreaktion übergehen (Strauer et al., 2001; Maisch et al., 2003; Mason, 2003; Maier et al., 2004; Wessely, 2004). Bei einer signifikanten Anzahl von Patienten resultiert dieser Vorgang in einem Verlust von Myozyten, in Hypertrophie und Degeneration des kontraktile Apparates mit reaktiver Myokardfibrose bis hin zur Dilatation des Herzmuskels und myokardialer Dysfunktion (Savoia und Oxman, 1990; Dec und Fuster, 1994; Martino et al., 1995; Strauer et al., 2001). Veränderte virale Replikationsstrategien und die Unfähigkeit von Effektoren der lokalen Immunität, persistent infizierte myokardiale Zellen zu eliminieren sowie die Infektion von Immunzellen (B-Lymphozyten und Makrophagen) sind essentielle Mechanismen der Induktion und Aufrechterhaltung einer chronischen Virusmyokarditis (Wessely et al., 1998; Lenzo et al., 2002; Maier et al., 2004; Wessely, 2004). Ebenso wird berichtet, dass während der chronischen Phase die Induktion autoimmunologischer Vorgänge „getriggert“ wird (Latif et al., 1993; Schwimmbeck et al., 1994; Gauntt et al., 1995; Caforio et al., 1996; Davies, 1997; Huber, 1997; Rose, 2000; Caforio et al., 2002; Maisch et al., 2003; Mason, 2003; Maier et al., 2004). Unter anderem kommen hier folgende Autoantigene und Autoantikörper für die fortführende Schädigung von Kardiomyozyten in Frage: ANT/Anti-ANT, welches den mitochondrialen Energiemetabolismus beeinträchtigt (Schulze und Schultheiss, 1995); Myosin/Anti-Myosin, welches die Kontraktionskraft des Herzmuskels vermindert (Caforio et al., 1996); Sarkolemma/ASA sowie Myolemma/AMLA, welche zytolytisch wirken (Maisch et al., 1993). Für eine Vielzahl anderer Autoantigene/Autoantikörper sind die Wirkungsweisen noch unbekannt (Maisch et al., 2003).

Neuere Studien zeigen, dass die Vermehrung, Verbreitung und die Reaktivierung von Coxsackieviren offensichtlich stark vom Zellzyklus der infizierten Zellen abhängt (Liu et al., 2000; Feuer et al., 2002; Luo et al., 2002; Opavsky et al., 2002). Schnell teilende bzw. aktive Zellen fördern eine produktive Infektion, wohingegen die Infektion ruhender Zellen (im G₀-Stadium) – welche am häufigsten im Gewebe von Erwachsenen vorkommen – latent verläuft. Die ruhenden Zellen tragen zwar in sich die potenziell infektiöse RNA, es kommt aber zu keiner oder verminderter Virusproduktion und somit zu keinem Virus-vermittelten zytopathischen Effekt (Feuer et al.,

2004). Anhand von RT-PCR-Studien konnte gezeigt werden, dass die RNA von Coxsackieviren noch für viele Jahre im menschlichen Herzmuskelgewebe persistieren kann (Archard et al., 1998; Fujioka et al., 2000; Li et al., 2000). Eine lang andauernde Persistenz konnte ebenfalls bei Mäusen nach einer Infektion nachgewiesen werden (Tam und Messner, 1999; Reetoo et al., 2000), ohne dass infektiöse Viruspartikel vorhanden waren („nicht-produktive Persistenz“). Die persistierende EV-RNA ist somit für die Erklärung der Entwicklung chronischer Krankheitsverläufe wie z.B. die DKMP als potenzielles Endstadium einer viralen Myokarditis von Bedeutung, wobei die Mechanismen hier insbesondere hinsichtlich der Stabilität des Moleküls noch nicht hinreichend geklärt sind – man vermutet, dass hier eine Konfigurationsänderung der RNA oder eine Stabilisierung mittels viraler bzw. zellulärer Proteine zum Tragen kommt.

Es bleibt festzuhalten, dass es sich bei der chronischen Virusmyokarditis nicht notwendigerweise um eine persistierende virale Infektion handeln muss; eine postvirale Immunpathogenese der Myokardschädigung ohne Virusreplikation konnte auch belegt werden. Zudem kann eine persistierende enterovirale Infektion auch im Stadium der aktiv chronischen Myokarditis zumindest bei einem Teil der Patienten (20 %) noch spontan ausheilen [siehe Kap. 1.2.1].

Neben den EV und ADV, die sich am menschlichen Herzen denselben zellulären Rezeptor teilen, wurden in den letzten Jahren zunehmend Infektionen mit PVB19 als mögliche Ursache einer Myokarditis bei Kindern und Erwachsenen sowie als Ursache einer fokalen oder systemischen Vaskulitis (entzündliche Gefäßwunderkrankung) beschrieben (Orth et al., 1997; Enders et al., 1998; Naides, 1999; von Kaisenberg et al., 2001; Papadogiannakis et al., 2002). Zudem findet sich in der Literatur eine Assoziation mit der Entwicklung einer Kardiomyopathie und dem plötzlichen Herztod (Nigro et al., 2000; Dettmeyer et al., 2003). Dementsprechend ist eine Infektion mit PVB19 des menschlichen Herzens nicht nur bei Myokarditis, sondern auch bei DKMP sowie im transplantierten Herzen nachweisbar (Pankuweit et al., 2003; Klein et al., 2004; Wang et al., 2004, Donoso Mantke et al., 2004a; Schwengerdt et al., 1997; Heegaard et al., 1998). Für das PVB19 konnte gezeigt werden, dass der zelluläre Rezeptor, das Blutgruppenantigen P, neben sich teilenden erythroiden Zellen und Megakaryozyten auch auf der Oberfläche von Endo-

thelzellen und fetalen Myokardzellen vorkommt (Brown et al., 1993). Als überaus wichtig erscheint die Beobachtung, dass PVB19 aufgrund seiner Affinität zu Endothelien eine Mikrozirkulationsstörung des Herzens induzieren kann, die bei einem Teil der Patienten trotz unauffälliger Koronarien mit dem klinischen Zeichen eines Herzinfarktes einhergeht (Bültmann et al., 2003; Kühl et al., 2003). Dabei belegt die Untersuchung PVB19-positiver myokardialer autoptischer Gewebeproben eine ausgedehnte Infiltration des Herzmuskels mit T-Lymphozyten (CD3-positiv) und aktivierten Makrophagen mit fokaler Nekrose/Apoptose von Myozyten (Bültmann et al., 2003). Als histopathologischer Befund erscheint die intravasale Akkumulation, Adhäsion und Penetration von Entzündungszellen in dilatierten intramuralen kleinen Venolen ohne Thrombusbildung mit nachfolgender Entzündung des benachbarten Myokards. Studien mittels *in situ* Hybridisierung (ISH) belegen, dass die PVB19-Infektion hauptsächlich in kleinen intramyokardialen Arterien, Arteriolen und venösen Blutgefäßen stattfindet (Bültmann et al., 2003). Da sich in den ISH sowohl intakte als auch nekrobiotisch veränderte Myozyten sowie die epikardialen Blutgefäße als durchweg Virus-negativ erwiesen, liegt die Vermutung nahe, dass sich die myokardialen Nekrosen bei der akuten PVB19-Myokarditis aufgrund einer hochgradigen Dysfunktion der koronaren Mikrozirkulation erklären lassen. Man nimmt des Weiteren an, dass die PVB19-induzierte DKMP möglicherweise durch Persistenz niedriger Viruslasten zustande kommt, die wiederum immunpathogenetische Prozesse triggert.

1.3.2 Die Virus-induzierte Arteriosklerose und KHK

Entstehen und Verlauf einer KHK werden durch Ausmaß und Verhalten der Koronarverengungen bestimmt, die zu einer Reduktion des arteriellen Blutflusses und damit der Sauerstoffzufuhr im abhängigen Myokardareal führen (Schettler und Greten, 1998). Eine Koronarstenose entsteht initial durch eine Schädigung des Koronarendothels auf dem Boden bestimmter, durch die möglichen Risikofaktoren [siehe Kap. 1.2.3] bedingter, schädigender Ursachen. Es kommt unter Mitwirkung von Adhäsions-Glykoproteinen zum Anhaften von Monozyten bzw. Makrophagen und T-Lymphozyten, die in die Intima (Gefäßinnenwand) einwandern. Durch Akkumulation von Lipiden werden die Makrophagen zu sog. Schaumzellen und bilden zusammen mit T-Zellen und glatten Muskelzellen die arteriosklerotischen Frühläsionen, die sog.

fatty streaks innerhalb der Intima. Nachfolgend tritt eine weitere Zelleinwanderung und eine Proliferation und Veränderung der glatten Muskelzellen unter Bildung einer fibrösen Matrix mit Kollagen und bestimmten Proteoglykanen ein. Es bildet sich eine fibrös-fettige Plaque (Intermediärläsion). Die Schädigung des Endothels führt zu einer Regulationsstörung der koronaren Blutgefäßerweiterung bzw. –verengung: während normale Koronararterien sich bei körperlicher Belastung erweitern, zeigen erkrankte Koronararterien eine Konstriktion und somit eine Zunahme der Einengung. Die unregelmäßige Oberfläche der Gefäßinnenwand führt zu einer Thrombozytenanlagerung und –aktivierung mit Freisetzung von Mediatoren wie Thromboxan und Serotonin. Unter Mitwirkung einer Vielzahl weiterer aus Thrombozyten, Endothel, Makrophagen und glatten Muskelzellen freigesetzter Wachstumsfaktoren entsteht eine fibromuskuläre Plaque, die komplexe Spätläsion, die das Lumen stenosiert. Durch Intimariß und „Aufbrechen“ der komplexen Läsion und nachfolgender Unterblutung der Plaques mit Thrombosierung kann ein partieller (instabile Angina pectoris) oder kompletter Koronarverschluss (Myokardinfarkt) entstehen. Ein Überwiegen „entzündlicher“ Zellen (Makrophagen, T-Lymphozyten) an Entstehungsstellen koronarer Plaquerupturen wurde nachgewiesen (Schettler und Greten, 1998).

Es gibt eine Reihe von Literaturdaten, die darauf hinweisen, dass neben den klassischen Risikofaktoren auch Infektionen, Entzündungs- und Autoimmunreaktionen als Ursachen für die Arteriosklerose/KHK in Frage kommen. Dabei steht eine infektiöse Beteiligung bei der Arteriosklerose/KHK nicht im Widerspruch zur oben dargestellten und bislang akzeptierten Theorie der Atherogenese (Lamb und Ferns, 1999; Morré et al., 2000; Shoenfeld et al., 2001; Madjid et al., 2004). Stetig wächst die Liste der Erreger an, die aufgrund unterschiedlicher Studien in Verdacht stehen, an der Entstehung bzw. Fortsetzung der Plaquebildung beteiligt zu sein (Tab. 4).

Tabelle 4: An der Atherogenese beteiligte Erreger.

<i>Chlamydia pneumoniae</i>
HCMV
Herpes simplex Virus Typ 1 und 2
<i>Helicobacter pylori</i>
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
<i>Porphyromonas gingivalis</i>
Enteroviren
<i>Salmonella typhi</i>
<i>Streptococcus sanguis</i>
Coxsackievirus B
Adenoviren
<i>Mycoplasma gallisepticum</i>
gallines Herpesvirus 2 (Marek'sche Geflügellähme)
Masernvirus
Epstein-Barr-Virus
HIV
<i>Mycoplasma fermentas</i>
<i>Coxiella burnetti</i>
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>
<i>Bacteroides forsythus</i>
Hepatitis-A-Virus
<i>Prevotella intermedia</i>
Influenzavirus

aus: Madjid et al., 2004

Von allen aufgezählten Erregern sind insbesondere für das HCMV und die obligat intrazellulär wachsenden Bakterien der Gattung *Chlamydia* die Hinweise aus unterschiedlichen Studien bezüglich einer Beteiligung an der Atherogenese am stärksten (Morré et al., 2000).

Die Rolle von HCMV für die Entstehung der Arteriosklerose wurde anhand experimenteller Tiermodelle, immunhistochemischer Studien zum Nachweis von viralen Partikeln und Genprodukten im Gewebe, seroepidemiologischer Studien und *in vitro*-Studien bezüglich der Interaktion zwischen HCMV und für die Arteriosklerose relevanten Zellen gezeigt (Übersicht in Morré et al., 2000).

Der beschleunigende Effekt der Plaquebildung von Herpesviren wurde erstmalig anhand des gallinen Herpesvirus Typ 2 in Hühnern gezeigt, welches unter anderem die sog. Marek'sche Geflügellähme auslöst. Hierbei wurde insbesondere der Cholesterintransfer in die Arterienwand gestört und die Arteriosklerose induziert, die nach Impfung der Tiere gegen dieses Virus nicht mehr auftrat (Ellis, 1997; Lamb und

Ferns, 1999; Fabricant und Fabricant, 1999). In CMV-infizierten BALB/c-Mäusen konnten virale Antigene im Arterienendothel und in glatten Muskelzellen nachgewiesen werden, begleitet von der Anlagerung entzündlicher Zellen, wie es für eine arteriosklerotische Frühläsion typisch ist (Berensci et al., 1998). Hier wurden als Ursache eine Virus-induzierte Immunantwort und Konzentrationserhöhung von LDL-Cholesterin im Blutserum zu Grunde gelegt. Des Weiteren wurden in Ratten mittels CMV-Infektion Endothelschäden, eine erhöhte Adhäsion von Leukozyten und Akkumulation von Lipiden im vaskulären Endothelium verursacht (Bruggeman, 2000; Kloover et al., 2000).

Die Präsenz von HCMV in humanen atheromatösen Plaques wurde belegt durch histologische Studien, immunhistochemischen Nachweis von viralen Antigenen sowie den Nachweis von genomischer DNA und RNA (Genexpression) mittels Amplifikationstechnik (Hendrix et al., 1990). Allgemein stellte sich hierbei heraus, dass sensitivere Techniken wie die Nukleinsäure-Amplifikation in bis zu 90 % aller Proben Virus nachgewiesen haben, während weniger sensitive Methoden im Virusnachweis eher versagten (Gulizia et al., 1995). Wichtig ist dabei festzuhalten, dass die Abwesenheit von sichtbarem Virusantigen die Bedeutung von HCMV für die Entstehung und Entwicklung der Krankheit nicht widerlegt, da das Virus latent vorkommen kann und durch wenig sensitive Methoden wie z.B. die Immunhistochemie nicht nachweisbar ist. Das Virus ist dennoch in der Lage, eine lokale Immunantwort auszulösen oder die endotheliale Funktion benachbarter Endothelzellen zu verändern (Bruggeman et al., 1999).

Eine Reihe von Daten aus *in vitro* Studien weisen darauf hin, dass HCMV die Zellen infizieren kann, die für eine Arteriosklerose relevant sind: glatte Muskelzellen, Endothelzellen und „entzündliche“ Zellen wie Monozyten und Makrophagen. HCMV-infizierte vaskuläre glatte Muskelzellen zeigen veränderte Funktionen, die in der frühen Phase der Erkrankung von Bedeutung sein könnten. Zum Beispiel produzieren HCMV-infizierte glatte Muskelzellen reaktive Sauerstoffmoleküle, die einen Induktionsfaktor für pro-inflammatorische Zytokine und Chemokine aktivieren, das NF- κ B (Speir et al., 1998). HCMV-infizierte Endothelzellen zeigen wiederum eine erhöhte Expression zahlreicher Oberflächenmoleküle, die an der Adhäsion von Leukozyten beteiligt sind: ICAM-1, VCAM-1, VAP-1, E-Selectin und MHC-Klasse-1-Antigene (van

Dorp et al., 1989; Kloover et al., 2000; Martelius et al., 2000), und außerdem an der Präsenz von Chemokinen: RANTES und MCP-1. Die Infektion induziert die Einwanderung entzündlicher Zellen an die Orte der Chemokinbildung. Dieser Prozess ermöglicht die Akkumulation von entzündlichen Zellen, Lipid-beladenden Makrophagen und die Bildung einer interzellulären Matrix, was zur Bildung einer atheromatösen Läsion führt (Valantine, 2003). Ein virales Chemokin, das US28, ist besonders interessant bezüglich der Infiltration glatter Muskelzellen. Seine Expression könnte die Verbindung zwischen einer Infektion mit HCMV und der Entstehung einer Arteriosklerose erklären (Streblov et al., 2001). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Genprodukte der sehr frühen Infektionsphase von HCMV zu einer Erhöhung der Expression von Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren (z.B. PDGF- β) führen. Dabei kommt es zu einer erhöhten Proliferation und Einwanderung von glatten Muskelzellen sowie einer Inhibition der Apoptose (Zhou et al., 1999; Speir et al., 1994; Tanaka et al., 1999; Zhu et al., 1995). Letztendlich wurde ein weiterer Effekt von HCMV bezüglich der Entstehung einer Arteriosklerose aufgedeckt, nämlich seine Fähigkeit, eine pro-koagulante Umgebung mittels eines Phospholipids auf der Oberfläche von Endothelzellen sowie die Thrombosierung zu induzieren (van Dam-Mieras et al., 1992; Pryzdial und Wright, 1994).

Das kardiovaskuläre Risiko wurde assoziiert mit der seropositiven Antwort unter anderem für *Chlamydia pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, HCMV und weitere Herpesviren (Übersicht in Morré et al., 2000). Dennoch konnte in einigen größeren Patientenstudien keine ausreichende Verbindung festgestellt werden (Danesh, 1999; Danesh et al., 2000). Eine positive Immunantwort auf HCMV stellt keinen prognostischen Marker für ein primäres Risiko einer Koronarerkrankung dar, wie dies in großen Patientenstudien gezeigt werden konnte (Anderson et al., 1998; Nieto, 1999), wohl aber für sekundäre Risiken wie Exitus oder Myokardinfarkt in Patienten mit einer vorhandenen Koronarerkrankung – vor allem in Patienten mit einem erhöhten Entzündungsparameter, z.B. hoher CRP- oder IL-6-Spiegel (Muhlestein et al., 2000; Blankenberg et al., 2001; Smieja et al., 2003). Aufgrund der mäßigen und variablen Risikobewertung für die einzelnen pathogenen Erreger haben Zhu et al. (2000) die Summe (Multiplizität) der relevanten infektiösen Erreger als einen neuen wichtigen Risikofaktor definiert, den sog. *total pathogen burden*. Es konnte gezeigt werden, dass ein serologischer Nachweis von mehr als fünf relevanten Erregern mit einem

höheren Risiko für Exitus und Myokardinfarkt verbunden war als einer mit weniger als fünf Erregern (Rupprecht et al., 2001; Zhu et al., 2001).

Arteriosklerose beinhaltet zudem eine systemische inflammatorische Komponente, was daran gezeigt werden konnte, dass die Inzidenz, der Schweregrad und die Folgen der Arteriosklerose stark mit systemischen Entzündungsmarkern korrelieren (Liuzzo et al., 1994; Ross, 1999). Darüber hinaus kann diese chronische entzündliche Antwort an den infektiösen Vorgang gekoppelt sein, was eine pro-atheromatöse Umgebung induziert. Infiltration entzündlicher Zellen wurde in atheromatösen Plaques in allen Krankheitsstadien beobachtet, und viele Studien stellen einen Zusammenhang zwischen Entzündungsmarkern im Blutserum, wie dem CRP-Spiegel, und den zukünftigen Ereignissen im Herzen her, sowohl bei gesunden Individuen als auch bei Patienten mit einer stabilen oder instabilen Angina pectoris. Zhu et al. (1999) konnten zeigen, dass der Zusammenhang zwischen einer Infektion mit HCMV und der Ausbildung einer Arteriosklerose davon abhängt, ob eine entzündliche Antwort aktiviert wird oder nicht. Der serologische Nachweis von HCMV allein war kein unabhängiger Marker für KHK; erst im Zusammenhang mit einem erhöhten CRP-Spiegel konnten bessere Vorhersagen getroffen werden.

Die Entstehung einer Arteriosklerose wurde auch im Zusammenhang mit autoimmunologischen Prozessen diskutiert. Verschiedene Autoantigene und deren Autoantikörper sind mit der Arteriosklerose assoziiert worden (Shoenfeld et al., 2000), so z.B. HSP-60/Anti-HSP-60, welches die Proliferation von T-Zellen innerhalb der Plaques induziert (Wick et al., 1995), oder oxLDL/Anti-oxLDL, welches eine Rolle in der Schaumzellbildung spielt (Shoenfeld et al., 2001).

1.4 Diagnostik und Therapie der entzündlichen Herzerkrankungen

Die Diagnose ist im Falle der Myokarditis/DKMP ausgesprochen schwierig und vom subjektiven Urteil des Klinikers und insbesondere des Pathologen abhängig. Eine erste Vereinheitlichung brachte das „Dallas-Panel“ von 1984, in dem lichtmikroskopische Kriterien zur Beurteilung von Biopsien festgelegt wurden (Aretz et al., 1986). Dennoch werden meist bei DKMP-Patienten chronisch-entzündliche Prozesse

nicht erkannt, da es unter anderem schwierig ist, nicht-entzündliche Zellen (z.B. Fibroblasten) von infiltrierten Immuneffektorzellen im Hämatoxilin-Eosin-(HE-)Präparat zu unterscheiden (Kühl et al., 2002). Häufig ist auch die Ursache der chronischen Herzmuskelentzündung nicht erkennbar, da vor allem die krankheitsauslösenden Viren schwer nachzuweisen sind, unter anderem, da sie im Herzmuskelgewebe latent vorkommen können. Daher versagen auch meist die Serologie und herkömmliche zellbiologische Untersuchungen von Gewebeproben wie z.B. die Virusisolierung als Virus-Nachweismethode (Morgan-Capner et al., 1984; Griffin et al., 1995). Auch würde ein positiver serologischer Befund keine Information darüber geben können, ob eine Virusinfektion im Myokardgewebe vorliegt oder nicht. Eine fortbestehende Replikation von Virusnukleinsäuren, mit oder ohne Virusproteinsynthese, kann beispielsweise im Falle der EV über (Auto-)Immunreaktionen zu Störungen des Zellmetabolismus und schließlich zum Zelluntergang führen [siehe Kap. 1.3.1]. Fortschritte liegen in der methodischen Entwicklung der Immunhistologie zum Nachweis von Immunkomplexbindungen (Kühl et al., 2002) bezüglich der Expression von Adhäsions-Molekülen (z.B. HLA I/II, CD54, CD59, VCAM-1) und Charakterisierung des zellulären Infiltrates (Lymphozyten, z.B. positiv für CD2, CD3, CD4, CD8). Mittels PCR und ISH [siehe Kap. 2.2.4 und 2.2.8] können virale Nukleinsäuresequenzen in den Myozyten, im Interstitium und im Gefäßendothel nachgewiesen werden und bei fehlender Entzündungsreaktion eine potenzielle Viruspersistenz ausgemacht werden (Bowles und Vallejo, 2003).

Erst die Entwicklung der immunhistologischen und molekularbiologischen Methoden führte zu wesentlich klareren Vorstellungen über die Pathogenese und Einteilung der entzündlichen Kardiomyopathie, über die Expertenkomitees in Marburg 1999 Konsens erzielten (Maisch et al., 2000). Eine Klassifizierung der Myokarditis/DKMP in aktive Myokarditis, „Borderline“-Myokarditis, inflammatorische DKMP mit/ohne virale Persistenz, nicht-inflammatorische DKMP mit/ohne virale Persistenz kann nicht nur zu einem besseren Verständnis der zugrunde liegenden pathologischen Mechanismen, sondern auch zur Entwicklung spezifischer antiviraler bzw. immunsuppressiver oder –modulatorischer Therapien beitragen (Kühl et al., 2002).

Zahlreich, umfangreich, aber widersprüchlich sind die Studien, in denen der Einfluss einer immunsuppressiven Therapie mit anti-inflammatorischen Mitteln wie Methyl-

prednisolon, Cyclosporin A, intravenösem Immunglobulin (IVIG) auf die chronische Myokarditis/DKMP untersucht wurde (Parrillo et al., 1989; Kühl et al., 1994; Mason et al., 1995; McNamara et al., 1997; Dorfell et al., 2000; Gullestad et al., 2001; McNamara et al., 2001; Staudt et al., 2001; Wojnicz et al., 2001). Diese Studien waren meist weder randomisiert noch kontrolliert und konnten daher nicht mit dem sehr variablen Spontanverlauf verglichen werden. Die Auswahl der Patienten erfolgte meist eher nach histologischen als nach immunhistologischen und molekularbiologischen Diagnostikkriterien, was dazu führte, dass aufgrund einer zuvor nicht festgestellten akuten Myokarditis eine hohe Spontanheilungsrate – sowohl in konventionell als auch in immunsuppressiv behandelten Patienten – zu verzeichnen war (Cunnion und Parrillo, 1995; Hahn et al., 1995; Maisch et al., 1995). Umgekehrt wurde infolge einer falschen Diagnose anstelle einer akuten Myokarditis vielmehr eine DKMP behandelt, die offensichtlich aufgrund der konventionellen Therapie zu einer Besserung führte, weshalb die immunsuppressiv behandelte Patientengruppe sich nicht sonderlich von der Placebo-Gruppe unterschied (McNamara et al., 2001). Auch konnte gezeigt werden, dass Patienten, die nicht auf eine immunsuppressive Therapie reagiert haben und in einer retrospektiven PCR-Analyse positiv für EV-spezifische Nukleinsäuresequenzen waren, während der immunsuppressiven Behandlung Virus-induzierte Schädigungen in den Kardiomyozyten aufwiesen. Es ist daher möglich, dass bei einer chronischen Myokarditis oder DKMP mit Viruspersistenz durch die immunsuppressive Behandlung die Virusreplikation wieder initiiert wird. Um derartige „Therapiepannen“ in Zukunft auszuschließen, ist eine zuverlässige Diagnostik, basierend auf histologischen/immunhistologischen sowie molekularbiologischen Methoden, zur besseren Klassifizierung der Erkrankung unbedingt notwendig (Kühl et al., 2002).

Eine antivirale Therapie der viralen Herzerkrankung gibt es derzeit nicht. Erste klinische Studien erproben zur Zeit die Anwendung der Interferon (IFN)-Therapie. Man unterscheidet drei Typen von Interferonen: IFN- α und $-\beta$ sind antiviral wirkende Zytokine. Sie hemmen sowohl die Vermehrung von Viren als auch die Zellteilung und haben dadurch auch tumorhemmende Eigenschaften. IFN- γ wirkt überwiegend immunregulatorisch. Es induziert die Freisetzung weiterer Zytokine und steigert die Effektorfunktion der zytotoxischen T-Zellen, der natürlichen Killerzellen und der mononukleären Phagozyten. Es gilt als eines der zentralen Zytokine bei der Im-

munantwort auf Virusinfektionen (Modrow et al., 2003). Interferone werden in virusinfizierten Zellen synthetisiert (IFN- α in Leukozyten, - β in Fibroblasten und - γ in Lymphozyten) und von dort in die Umgebung abgegeben. Anhand experimenteller und klinischer Studien konnte bisher gezeigt werden, dass a) zwischen einer Virusinfektion und der Interferonsynthese ein deutlicher (natürlicher) Zusammenhang besteht, der i.d.R. zu einer Ausheilung führt; b) eine Synthese- bzw. Funktionshemmung von Interferonen zu einer wesentlich schwerer verlaufenden Infektion führt und c) die Behandlung mit IFN gegen Virusinfektionen schützt (Kühl et al., 2002).

Der antivirale Effekt ist unabhängig vom Virustyp und resultiert in einer intrazellulären Blockade der Virusreplikation. Interferone erhöhen die Resistenz gegenüber der Virusreplikation. Da effektiv wirksame IFN- β -Konzentrationen *in vivo* hergestellt werden können, könnte IFN- β unter anderem in der Behandlung von Patienten mit einer viralen Kardiomyopathie nützlich sein. Dies konnte bereits in einer Phase II-Studie belegt werden, wobei Patienten mit einer nachgewiesenen Viruspersistenz und einer linksventrikulären Dysfunktion nach einer antiviralen Therapie mit IFN- β klinische Besserungen zeigten. Nach sechs Monaten konnten in Biopsieproben der behandelten Patienten weder EV- noch ADV-spezifische Genomsequenzen mehr nachgewiesen werden, was auf eine völlige Viruseliminierung hinweist. Die Viruseliminierung wurde von einer Reduktion der klinischen Beschwerden wie Angina pectoris, Dyspnoe, Herzklopfen und Ermüdung und damit eine bessere NYHA-Klassifizierung zur Beurteilung des Schweregrades der Herzinsuffizienz begleitet (Kühl et al., 2002).

Es gibt noch weitere antivirale Therapieansätze, vor allem aus anderen Bereichen, die hier nur kurz erwähnt werden. So z.B. konnte aus Meningitis-Studien eine mögliche Anwendung von Pleconaril gegen Picornavirus-Infektionen abgeleitet werden (Bauer et al., 2002; Rotbart et al., 2001). Diese Substanz bindet an das Viruskapsid und verhindert zum einen die Rezeptorbindung und zum anderen den Austritt der viralen RNA. Es soll gut verträglich sein und zu einer schnellen Symptomlinderung führen. Ein Problem könnte allerdings das Auftreten von resistenten Virusstämmen darstellen. Für die Therapie von HCMV-Infektionen werden (z.B. in der Transplantationsmedizin) Ganciclovir und Foscarnet als die Mittel der Wahl zur Behandlung bzw. Prophylaxe angewendet (Pereyra und Rubin, 2004). Beide Sub-

stanzen verursachen aber diverse Nebenwirkungen. Cidofovir, ein Cytidin-Analogon, wurde bei Knochenmarktransplantatempfängern erfolgreich gegen ADV-Infektionen angewendet (Ljungman et al., 2003). Das Chemotherapeutikum wirkt aber nieren-schädigend. Influenzavirusinfektionen könnten mit Neuraminidase-Hemmern (Zanamivir, Oseltamivir) behandelt werden, welche in das „Budding“ der Viren eingreifen (Nichols et al., 2004). Für PVB19 wird zur Zeit die Anwendung von IVIG zur Behandlung diskutiert, wobei hier als Wirkungsmechanismus eine schnellere Immunadsorption von schädigenden Auto-Antikörpern zu einer guten Prognose führen könnte (Stouffer et al., 2003). Allerdings gibt es mittlerweile auch Bedenken bezüglich der Virussicherheit von IVIG, da es aus Blutprodukten gewonnen wird, die mit PVB19 kontaminiert sein könnten (Hayakawa et al., 2002).

Derzeit laufen außerdem zwei Studien, die die bisher gemachten Einwände bezüglich der Patientenauswahl und Diagnostikkriterien berücksichtigen: die „European Study of Epidemiology and Treatment of Cardiac Inflammatory Diseases (ESETCID)“ und die Studie „Treatment of Chronic Myocarditis in Children“ (Hufnagel et al., 2000; Schmaltz et al., 1998). Die erst genannte Studie unterscheidet erstmals genau die Ätiologie der Entzündungen daraufhin, ob es sich um HCMV, EV, ADV oder eine autoreaktive Myokarditis handelt. Dementsprechend ist auch die Therapie unterschiedlich. Da diese Studie noch nicht entblindet ist, wurden die Ergebnisse noch nicht vollständig publiziert. In der zweiten Studie werden die Patienten abhängig vom Biopsieergebnis ebenfalls unterschiedlich behandelt. Die geringe Zahl der bisher randomisierten Patienten erlaubt jedoch noch keine statistische Aussage über den Wert der Therapiemodi.

Es kann daher festgehalten werden, dass es zur Zeit in der klinischen Praxis für entzündliche Herzerkrankungen keine kausale Therapie hinsichtlich der viralen Erreger und kein Anhalt für den Nutzen immunsuppressiver Therapien gibt – bei akuten Verläufen wirken sie eher schädlich, bei chronischen Verläufen sind sie noch umstritten. Daher kommen i.d.R. die konventionellen Therapiemaßnahmen zur Behandlung der festgestellten Herzinsuffizienz zum Tragen, wie z.B. Vermeiden von körperlichen Spitzenbelastungen, Bettruhe, das sog. Herzbett (bei akuten Fällen), Thromboseprophylaxe, ACE-Hemmer, Diuretika, Digitalis, β -Blocker usw. (Schettler und Greten, 1998). Bei therapieresistenter Herzinsuffizienz und Herzfehlern mit hö-

heren Schweregraden (NYHA III und IV) stellen die Herztransplantation oder Herzklappenverpflanzung – bei durch Herzklappendysfunktion verursachter Herzinsuffizienz – die einzigen lebensrettenden Therapiemaßnahmen dar. Mit fast 60 % der Anmeldungen ist die DKMP in Deutschland die häufigste Indikation für Herztransplantationen, gefolgt von der KHK mit 27 % (DSO, 2002). Als wesentliche Komplikationen können bei der Transplantation die Abstoßungsreaktion (Rejektion) – vor allem als Frühkomplikation – und die Transplantat-Arteriosklerose in der Langzeitprognose auftreten. Beides kann unter anderem auch viral induziert sein (McNamara et al., 1996; Schowengerdt et al., 1996; Gallo et al., 1997; Schowengerdt et al., 1997; Heegaard et al., 1998; Bernabeu-Wittel et al., 1999; Koskinen et al., 1999; Lower et al., 2001; Weill, 2001; Gao et al., 2003). Die Prävalenz der einzelnen in Frage kommenden kardiotropen viralen Erreger in möglichen Komplikationen nach einer Herztransplantation bzw. nach einem Herzklappenersatz ist derzeit kaum erfasst. Insbesondere wurde bisher fälschlicherweise angenommen, dass Herzklappen bedingt durch ihre kollagene Gewebeschaffenheit als Ort für eine Virusinfektion bzw. -replikation nicht in Frage kommen.

Shirali et al. (2001) konnten an herztransplantierten Kindern zeigen, dass der Nachweis von viralen Genomstrukturen, insbesondere ADV-spezifischen, im transplantierten Herzen mit einem 6,5-fach erhöhten Risiko für koronare Vaskulopathie und Transplantatverlust einhergeht. Es wird angenommen, dass neben HCMV auch andere virale Erreger die Abstoßungsreaktion durch immunpathogenetische Prozesse triggern können. *In puncto* Virussicherheit und Spenderauswahl werden aber zur Zeit, wie auch bei anderen Organ- und Gewebetypen, lediglich Untersuchungen bezüglich HCMV, HIV, Hepatitis B- und -C-Virus durchgeführt (Balk et al., 1998; Bundesärztekammer, 2001; COE, 2002).



Abbildung 5:
Homograft nach der
Präparation.

Da bezüglich der Prävalenz von kardiotropen viralen Erregern (z.B. EV, ADV, HCMV, PVB19) im Zusammenhang mit möglichen Komplikationen, die nach einer Transplantation auftreten können, keine gesicherten Daten vor-

liegen und entsprechende Richtlinien zur Qualitätssicherung von Herztransplantaten und Herzklappen zu Transplantationszwecken (sog. Homografts, Abb. 5) diesen Aspekt nicht genügend berücksichtigen, sollte im Rahmen der vorliegenden Studie vorab die Frage geklärt werden, ob innerhalb des untersuchten Spenderpools virusbelastete Herzen vorkommen. Hierbei sind insbesondere die Homografts von Interesse, da neben abgelehnten Spenderherzen auch sog. Dominoherzen für die Entnahme und Präparation von Herzklappen herangezogen werden. Bei Dominoherzen handelt es sich um explantierte Herzen von Patienten, die aufgrund einer kardialen Erkrankung (i.d.R. DKMP) transplantiert wurden und die schriftlich eingewilligt haben, dass ihr Herz für die Gewinnung von Homografts benutzt werden darf. Mit Hilfe der ermittelten Daten sollte dann die Relevanz hinsichtlich möglicher Konsequenzen für Transplantationen erläutert werden, um den Bedarf für weiterführende Studien, zur Bestätigung des potenziellen Risikos für Empfänger von virusbelasteten Transplantaten und für die Verbesserung der bisherigen Qualitätssicherung für die Spenderauswahl in Zukunft zu verdeutlichen.

1.5 Ein neuartiger Vertreter der Picornaviren – das Ljunganvirus

Sechs plötzliche Todesfälle durch akute Myokarditis innerhalb einer Gruppe von 200 sog. Elite-Orientierungsläufern aus Schweden, die sich in einem Zeitraum von drei Jahren, 1989 bis 1992, ereigneten (Wesslén et al., 1992), führten zu der Annahme,

dass es sich hierbei um eine vektorabhängige Infektion in den Wäldern Schwedens handeln müsste (Niklasson et al., 1998). Die Suche nach einem infektiösen Erreger, der potenziell humanpathogen ist und Myokarditis verursacht, führte zur Entdeckung eines neuartigen Virus, welches Ljunganvirus (LV) genannt wurde. Das Virus wurde erstmalig aus schwedischen Rötelmäusen der Art *Clethrionomys glareolus* [Waldwühlmaus] (Abb. 6) isoliert, welche in der Nähe des Flusses Ljungan in Süd-Schweden (Västernorland) gefangen wurden (Niklasson et al., 1998; Niklasson et al., 1999).



Quelle: Apodemus AB

Abbildung 6:

Die Rötelmaus *C. glareolus*.

Vektor des kürzlich beschriebenen Ljunganvirus (*Picornaviridae*).

Vergleichende Sequenzanalysen des LV-Prototyps 87-012 mit zwei weiteren serologisch nah verwandten LV-Isolaten, 174F und 145SL, haben gezeigt, dass die Genome der

neu bestimmten schwedischen LV-Stämme eng verwandt sind und eine Picornavirus-ähnliche Struktur besitzen – 5'-nicht-translatierte Region-VP0-VP3-VP1-2A1-2A2-2B-2C-3A-3B-3C-3D-3'-nicht-translatierte Region – mit einigen verschiedenen molekularen Besonderheiten (Johansson et al., 2002): Unter anderem kommt es bei LV nicht zu der Strukturprotein-Prozessierung von VP0 zu VP4 und VP2 durch die enzymatische Aktivität im VP2-Anteil des VP0, wie dies von anderen Picornaviren bekannt ist (Modrow et al., 2003). Des Weiteren weist das Virus in der 2A-Region (Proteinase) ein Cluster von zwei unterschiedlichen 2A-Homologen auf sowie eine einzigartige C-terminale Erweiterung im VP1-Kapsidprotein. Phylogenetische Analysen haben gezeigt, dass die LV-Isolate eine monophyletisch eigenständige Gruppe darstellen, die sich zusammen mit dem Genus der Parechoviren von anderen Mitgliedern der *Picornaviridae* unterscheiden (Johansson et al., 2002; Lindberg und Johansson, 2002). Darüber hinaus konnte eine komplette Genomsequenz eines weiteren Virusisolats M-1146 als Mitglied der *Picornaviridae* verifiziert werden. Dieses Virus wurde bereits 1962 aus einer anderen Mäusespezies namens *Microtus mon-*

tanus [Bergwühlmaus], die in Oregon (USA) gefangen wurde, isoliert; es ist den schwedischen LV-Isolaten sehr nah verwandt, stellt aber innerhalb des LV-Clusters einen neuen Genotyp dar (Johansson et al., 2003). Der Nachweis von LV sowohl in schwedischen als auch in nordamerikanischen Mäusepopulationen lässt die Vermutung zu, dass LV geographisch innerhalb der zahlreich vorkommenden Mäusepopulationen weit verbreitet sind. Die Rötelmaus *C. glareolus* kommt neben anderen Nagetierspezies (z.B. *M. arvalis*, *Apodemus spp.*, *Rattus norvegicus* usw.), die bereits als potenzielle Wirte für Hantaviren (insbesondere Dobrava- und Puumalavirus) beschrieben worden sind (Ulrich et al., 2004), auch in Deutschland vor. Zur Zeit sind sieben LV-Stämme bekannt: aus Schweden LV 87-012, LV 174F, LV 145SL, LV 342SL und aus den USA M-1146, NY64-7855, NY64-7947, welche im Rahmen der vorliegenden Studie unter anderem zur Etablierung einer quantitativen PCR verwendet wurden.

Im Augenblick existieren nur wenige Daten, die eine mögliche Rolle von LV bei der Entstehung humaner Erkrankungen belegen, so z.B. schwach positive Befunde in Seren von vier schwedischen Myokarditis-Patienten (Niklasson et al., 1999) oder der Nachweis von Picornavirus-ähnlichen Partikeln im Pankreasgewebe Diabetes-erkrankter Rötelmäuse (Niklasson et al., 2003). Zum größten Teil basiert die Hypothese einer humanpathogenen Rolle von LV auf der Beobachtung, dass die Inzidenz von Erkrankungen wie Myokarditis, Diabetes mellitus, Guillain-Barré-Syndrom (Niklasson et al., 1998) oder Präeklampsie (persönliche Mitteilung Dr. Dr. B. Niklasson) mit dem drei- bis vierjährigen Populationszyklus der schwedischen Rötelmaus korreliert. Weitere Untersuchungen am Tiermodell und anhand klinischer Proben sind in Zukunft notwendig, um die Richtigkeit der Hypothese zu bestätigen. In diesem Zusammenhang sei zur Vollständigkeit erwähnt, dass auch für Hantaviren ein Verdacht hinsichtlich einer Beteiligung an entzündlichen Herzmuskelerkrankungen anhand von Einzelfallstudien (Tennstedt et al., 1994) und Resultaten aus Tiermodellen (Botten et al., 2000; Botten et al., 2003) besteht.

Im Rahmen der vorliegenden Studie sollte mit Hilfe einer neu entwickelten PCR anhand der entnommenen Proben aus Herztransplantatempfängern und Herzspendern untersucht werden, ob es Anzeichen für die Präsenz von LV in Deutschland gibt. Gleichzeitig sollte auch auf das Vorhandensein von Hantaviren untersucht werden,

da diese ebenfalls durch Nagetierspezies übertragen werden und im Verdacht stehen, an entzündlichen Herzerkrankungen beteiligt zu sein. Darüber hinaus sollten erste grundlegende Arbeiten zur näheren Charakterisierung des LV durchgeführt werden, die für weitere Studien zur Klärung der humanpathogenen Relevanz von LV notwendig sind. So sind bisher keine geeigneten Studien zu Infektionsverläufen dieses Virus, weder *in vitro* noch *in vivo*, bekannt. Bisherige Infektionsstudien in verschiedenen Zellkulturen scheiterten aufgrund einer schwachen Virusproduktion und schwacher Ausbildung eines erkennbaren zytopathischen Effektes (Johansson et al., 2004).

1.6 Fragestellung der Dissertation

Im Rahmen einer Kooperation zwischen dem RKI und dem DHZB sollten an Herzgewebe von Herztransplantatempfängern und Herzspendern Untersuchungen hinsichtlich des Vorkommens von Genomen verschiedener RNA- und DNA-Viren durchgeführt werden, um die Prävalenz einzelner potenziell kardiotoxischer Erreger genauer zu bestimmen. Eingeschlossen wurden a) Viren, für die ein ätiologischer Zusammenhang mit entzündlichen Herzerkrankungen belegt ist (EV, ADV, HCMV, PVB19, Influenzaviren), als auch b) Viren mit bisher unbekanntem Risiko (Ljunganviren, Hantaviren). Die retrospektiven Untersuchungen sollten Auskunft darüber geben, ob und welche viralen Nukleinsäuresequenzen sich in erkrankten bzw. gesunden Herzen nachweisen lassen. Die molekularbiologischen Befunde sollten (wenn möglich) mit serologischen und histopathologischen Befunden verglichen werden. Speziell galt es folgende Fragen zu beantworten:

1.6.1 Prävalenz kardiotoxischer viraler Erreger bei entzündlichen Herzerkrankungen

Die Auswertung von Literaturdaten belegt zwar einen Zusammenhang zwischen viralen Erregern im Herzen und entzündlichen Erkrankungen wie Myokarditis, DKMP und KHK, dennoch existieren bezüglich der Prävalenz einzelner in Frage kommender kardiotoxischer viraler Erreger nur wenige Daten, um eine potenzielle direkte Rolle dieser Erreger in der Pathogenese der jeweiligen Erkrankungen zu verifizieren. Mit Hilfe der PCR-Methodik sollte bestimmt werden, wie häufig sich kardiotoxische Erreger

(hier: EV, ADV, HCMV, PVB19, Influenzaviren) in Herztransplantatempfängern mit einer bestimmten Herzerkrankung bzw. in primär gesunden Herzspendern nachweisen lassen.

1.6.2 Risiken für Empfänger von Herztransplantaten und Homografts

Ein weiterer Aspekt dieser Studie stellt die Virussicherheit von Herztransplantaten und menschlichen Herzklappen zu Transplantationszwecken (sog. Homografts) dar, da bezüglich der Prävalenz von kardiotropen viralen Erregern im Zusammenhang mit Komplikationen, die nach einer Transplantation auftreten können, keine gesicherten Daten vorliegen und entsprechende Richtlinien zur Qualitätssicherung von Herztransplantaten und Herzklappengewebe diesen Aspekt nicht genügend berücksichtigen. Das potenzielle gesundheitliche Risiko für die Empfänger von Transplantaten sollte anhand der Ergebnisse dieser Studie geklärt werden.

1.6.3 Prävalenz von Ljunganvirus- und Hantavirus-RNA in Herzgewebe von Herztransplantatempfängern und Herzspendern

Auf der Grundlage neuer Erkenntnisse über eine bisher unbekannt Gattung der *Picornaviridae*, das Ljunganvirus, die zunächst nur in Schweden und den USA nachgewiesen worden ist und die im Verdacht steht, unter anderem Myokarditis beim Menschen zu verursachen, sollte mit Hilfe einer neu entwickelten PCR in Myokardproben von Herztransplantatempfängern und Herzspendern untersucht werden, ob es Anzeichen für die Präsenz von LV in Deutschland gibt. Die Frage stellt sich, da der mögliche Vektor, die Rötelmaus *C. glareolus*, auch in Deutschland verbreitet ist. Gleichzeitig sollte auch auf die Präsenz von Hantaviren untersucht werden, da diese ebenfalls durch Nagetierspezies übertragen werden und im Verdacht stehen, an entzündlichen Herzerkrankungen beteiligt zu sein. Außerdem sollten bestimmte Eigenschaften des LV wie der Infektionsverlauf in Zellkultur, die Lokalisation von Oberflächenproteinen und die Morphologie mittels geeigneter Methoden näher charakterisiert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Bezugsquellennachweis

2.1.1.1 Geräte

Analysewaage (BP 310 P)	Sartorius, Göttingen
Autoklav (Automat 21/2)	Webeco, Bad Schwartau
Brutschränke:	
<ul style="list-style-type: none"> • für Bakterienkultur (mit Schüttler) • für Zellkultur 	New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA Heraeus, Hanau
Dewar-Isoliergefaß	Roth, Karlsruhe
Folienschweißgerät für TaqMan [®] -Platten	ABgene, Epsom, Surrey, UK
Gefrierschränke:	
<ul style="list-style-type: none"> • für -20 °C • für -80 °C 	Bosch, Stuttgart/ Liebherr, Biberach a. d. Riß Heraeus, Hanau
Gelelektrophoresesysteme, horizontal	Biozym, Oldendorf
Glasröhrchen mit Deckel (für Eponeinbettung)	Roth, Karlsruhe
Glaswaren (Kolben, Flaschen usw.)	Schott Glas, Mainz
Kühlschränke	Bosch, Stuttgart/ Philipp Kirsch, Offenburg
Mikroskope:	
Fluoreszenzmikroskop (Axioskop 20)	Zeiss, Jena
Invertmikroskop (Axiovert 25)	
Konfokales Laser Scanning Mikroskop (cLSM510)	
Lichtmikroskop (Axiophot)	
Transmissionselektronenmikroskop (EM 10 A/B)	
Neubauer-Zählkammer	Roth, Karlsruhe
Photometer:	
Bio-Photometer	Eppendorf, Hamburg
Mikrotiterplattenphotometer (EAR 400 AT)	SLT Laborinstruments Austria, Salzburg, A

Pinzetten	Roth, Karlsruhe
Pipetten (bis 10, 100, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe (Accu-jet®)	Brand, Wertheim
Rotationsmischer (R1)	Pelco International, Redding, CA, USA
Rotoren:	
HB-6	Kendro, Langenselbold
SW28 (für UZF)	Beckman, Palo Alto, CA, USA
SW40 (für UZF)	Beckman, Palo Alto, CA, USA
Typ 12145	B. Braun, Melsungen
Rotor-Stator-Homogenisator-System:	
T8 basic Ultra-Turrax®; Dispergierstation	IKA Labortechnik, Staufen
T8.10; Netzgerät T8.01; Dispergierwerkzeuge: S25N-18G, S25N-8G	
Sequenziergerät (ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer)	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Sofortbildkamera	Polaroid, Offenbach
Spannungsgeräte	Biometra, Göttingen/ Bio-Rad, München
Speed-vac-Vakuumanlage:	
Speed-vac Univapo® 150 ECH, Pumpe und Kühlfalle Unijet II®	Uniequip, Leipzig
Spektrofluorometer (Tecan Spectrafluor® plus)	Tecan, Maennedorf, CH
Stickstoffprobenlagerungstank	Union Carbide, Houston, TX, USA
Temperierbad (TER2)	IKA Labortechnik, Staufen
Thermozykler:	
ABI Prism® Sequence Detector (für TaqMan®) (Typen: 5700, 7700, 7900 HT)	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Biometra T Gradientencycler	Biometra, Göttingen
Biometra TRIO Thermoblock mit Heizdeckel	Biometra, Göttingen
Tiefkühlbox für TaqMan®-Platten mit Alu-Block	Nunc, Wiesbaden
Trimmgerät (TM 60)	C. Reichert, Wien, A
Ultramikrotom (Ultracut S)	C. Reichert, Wien, A
UV-Tisch (Transilluminator TC-312A)	Spectroline, Westbury, NY, USA
Vortex®	Roth, Karlsruhe

Zentrifugen:

Heraeus Megafuge 1.0 R	Heraeus, Hanau
RC 50 Plus Kühlzentrifuge	Kendro, Langenselbold
Sigma 2K15 Kühlzentrifuge	B. Braun, Melsungen
Tischzentrifugen	Eppendorf, Hamburg/ Heraeus, Hanau
Ultrazentrifuge (XL-90)	Beckman, Palo Alto, CA, USA
Zentrifuge 5403	Eppendorf, Hamburg

2.1.1.2 Chemikalien

Chemikalien wurden mit dem Reinheitsgrad p.A. (*pro analysi*; für analytische Zwecke) oder der höchsten verfügbaren Reinheitsstufe (reinst) verwendet. Mit folgenden Ausnahmen wurden alle Chemikalien von den Firmen Merck Eurolab, Darmstadt und Sigma-Aldrich, München bezogen:

A

Agar	Invitrogen, Karlsruhe
Agarose (NuSieve® 3:1)	Biozym, Oldendorf
Albuminazid	Euroimmun, Lübeck

B

Bleicitrat	Serva, Heidelberg
------------	-------------------

C

CsCl	Roth, Karlsruhe
Chloroform	Roth, Karlsruhe
(Roti®-)Chloroform/Isoamylalkohol	Roth, Karlsruhe

D

DBSA (Dodecylbernsteinsäureanhydrid)	Serva, Heidelberg
DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium)	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
DMP-30 (2,4,6-Tris(dimethylamino)-phenol)	Serva, Heidelberg
dNTP-Mix [10 mM]	Eppendorf, Hamburg
dNTP-Set [100 mM]	Amersham Biosciences, Freiburg
DTT [0,1 M]	Invitrogen, Karlsruhe
dUTP (2'-Desoxyuridin-5'-Triphosphat) [100 mM]	Amersham Biosciences, Freiburg

E

Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe

F

FKS	PAA Laboratories, Linz, A
-----	---------------------------

G

L-Glutamin [200 mM]	PAA Laboratories, Linz, A
Glutaraldehyd [25 %]	Serva, Heidelberg

	Glyceridether 100	Serva, Heidelberg
	GTC (Guanidinthiocyanat)	Roth, Karlsruhe
H		
	HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure)	Biochrom, Berlin
L		
	LB-Medium (Luria Broth)	Invitrogen, Karlsruhe
M		
	MgCl ₂ (Magnesiumchlorid) [50 mM]	Eppendorf, Hamburg/ Invitrogen, Karlsruhe
	Molekularwasser (für PCR-Zwecke)	Eppendorf, Hamburg
N		
	Nicht-essentielle Aminosäuren	PAA Laboratories, Linz, A
P		
	Penicillin/Streptomycin [10000 U] (Roti [®] -) Phenol	PAA Laboratories, Linz, A Roth, Karlsruhe
	Polyvinylformal (Rotipuran [®] -) 2-Propanol	Wacker Chemie, München Roth, Karlsruhe
R		
	ROX Referenzfarbstoff (für TaqMan [®])	Tib Molbiol, Berlin
	RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium) – Zellkulturmedium	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
	RT-Puffer [5x]	Invitrogen, Karlsruhe
S		
	SDS (Natriumdodecylsulfat)	ICN Biomedicals, Aurora, OH, USA
T		
	Tanninsäure	Mallinckrodt, St. Louis, MO, USA
	Taq-Puffer [10x]	Eppendorf, Hamburg/ Invitrogen, Karlsruhe
	TBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA) [5x]	Eppendorf, Hamburg
	Tris-HCl	Serva, Heidelberg
	Trypsin	PAA Laboratories, Linz, A

2.1.1.3 Enzyme

M-MLV-RT	Invitrogen, Karlsruhe
Proteinase K	Qiagen, Hilden
RNase A	Qiagen, Hilden
RNase-Inhibitor	Invitrogen, Karlsruhe/ Promega, Mannheim

SuperScript® II Reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe
Taq-Polymerase	Eppendorf, Hamburg/ Invitrogen, Karlsruhe
UDG (Uracil-DNA-Glykosylase)	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.1.4 Nukleinsäuren (Längenstandards)

International PVB19 DNA Standard (99/800)	NIBSC, South Mimms, Potters Bar, UK
Lambda-DNA-Standard	Molecular Probes, Leiden, NL
100-bp Marker (Ladder/Leiter)	Sigma-Aldrich, München
RNA-Standardkontrolle LV 87-012	Dr. Dr. B. Niklasson (Apodemus AB, Stockholm, S)
18-S-/28-S-rRNA Marker	Sigma-Aldrich, München

2.1.1.5 Plasmide

hu β -Aktin Standard Plasmid	Genexpress, Berlin
hu GAPDH Standard Plasmid	Genexpress, Berlin
hu RPII Standard Plasmid	Genexpress, Berlin
pPVB19-CR2.1T	Genexpress, Berlin
TOPO® TA Cloning Vektor pcDNA3.1/ V5-His	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.1.6 Oligonukleotide

BGHrev (5'-TAGAAgCACAgtTCgAgg-3')	Invitrogen, Karlsruhe
MGB®-Sonden für LV-Nachweis	Applied Biosystems, Warrington, Cheshire, UK
Random Primers	Invitrogen, Karlsruhe
T7 (5'-TAATACgACTCACTATAggg-3')	Invitrogen, Karlsruhe

Weitere Oligonukleotide wurden über die Firma Tib Molbiol, Berlin bezogen. Falls sie hier im folgenden nicht aufgezählt sind, sind sie in den entsprechenden Protokollen aufgelistet:

Für den human β -Aktin-Nachweis:

ACT s	5'-AgCCTCgCCTTTgCCgA-3'	GenBank Accession No. M10277
ACT as	5'-CTggTgCCTggggCg-3'	
ACT TM	F-CCgCCgCCCgTCCACACCCgCCT-p	

Für den human GAPDH-Nachweis:

GAPDH s	5'-gAAGgTgAAGgTCggAgTC-3'	GenBank Accession No. J02642
GAPDH as	5'-gAAGATggTgATgggATTTC-3'	
GAPDH TM	F-CAAgCTTCCCgTTCTCAgCCT-p	

Für den human RPII-Nachweis:

RPII s	5'-gCACCACGTCCAATgACAT-3'	GenBank Accession No. X74870
RPII as	5'-gTgCggCTgCTTCCATAA-3'	
RPII TM	F-TACCACgTCATCTCCTTTgATggCTCCTAT-p	

2.1.1.7 Antikörper

Anti-LV-Primärantikörper:

Maus-Anti-87-012; Maus-Anti-174F; Maus-Anti-145SL;

Alle hier aufgeführten Primärantikörper stammen aus dem Swedish Institute for Infectious Disease Control (SMI), Stockholm, Schweden, und wurden freundlicherweise von Hr. Dr. Dr. B. Niklasson zur Verfügung gestellt.

Sekundärantikörper:

Ziege anti-Maus-IgG (FITC-konjugiert)	Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA (Bestellnummer: A90-216F)
---------------------------------------	---

2.1.1.8 Reagenziensätze (Kits)

ABI PRISM® Big Dye® Terminator 3.1 Kit	Applied Biosystems, Warrington, Cheshire, UK
BAG-Adeno-EIA IgG/IgM	BAG, Lich
Enterovirus ELISA IgG/IgM	Genzyme Virotech, Rüsselsheim
HighPure® RNA Tissue Kit	Boehringer-Mannheim, Mannheim
NucleoSpin® Tissue Kit	Macherey-Nagel, Düren
pcDNA3.1/ V5-His TOPO® TA Expression Kit	Invitrogen, Karlsruhe
peqGOLD RNAPure®	Peqlab, Erlangen
PicoGreen® dsDNA Quantitation Kit	Molecular Probes, Leiden, NL
QIAamp® DNA Blood Kit	Qiagen, Hilden
QIAamp® DNA Kit	Qiagen, Hilden

QIAamp® Viral RNA Kit	Qiagen, Hilden
QIAGEN® Plasmid Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick® Gel-Extraction Kit	Qiagen, Hilden
recomWell Parvovirus B19 IgG/IgM	Mikrogen, Martinsried
RNAzol® B	Cinna/Tel-Test, Friendswood, TX, USA
RNeasy® Protect	Qiagen, Hilden
Total Quick® RNA Cells and Tissues Kit	Talent, Trieste, I

2.1.1.9 Kunststoffartikel

Deckelchen für TaqMan®-Platten; 8er-Streifen	ABgene, Epsom, Surrey, UK
Einwegküvetten	Eppendorf, Hamburg
Kryoboxen mit Gittersystem	Merck Eurolab, Darmstadt
Kryogefäße; 1,8 ml mit Innengewinde	Nunc, Wiesbaden
Lochplatten (24er, 96er)	Nunc, Wiesbaden
Mikrotiterplatten; 96er (NU-96F, schwarz)	Nunc, Wiesbaden
Objektträger mit 8er-Lochkammern	Nunc, Wiesbaden
PCR-Pipettenspitzen mit Aerosolschutz (1, 10, 100, 1000 µl)	Biozym, Oldendorf/ Eppendorf, Hamburg/ Molecular Bioproducts, San Diego, CA, USA
PCR-Pipettenspitzen ohne Aerosolschutz (10, 100, 1000 µl)	Süd Laborbedarf, Gauting
PCR-Platten; 96er; 0,2 ml (für TaqMan®)	ABgene, Epsom, Surrey, UK
PCR-Reaktionsgefäße:	
• 0,2; 0,5 ml	Biozym, Oldendorf/ Eppendorf, Hamburg/ Nunc, Wiesbaden
• 0,2 ml; 8er-Streifen mit Deckel	Biozym, Oldendorf
Petrischalen	Greiner, Frickenhausen
Reaktionsgefäße:	
• 0,5; 1,5; 2,0 ml	Eppendorf, Hamburg
• 15, 50 ml	Nunc, Wiesbaden
Seropipetten (1, 5, 10, 25, 50 ml)	Nunc, Wiesbaden
Zellkulturflaschen mit Filterdeckel (25, 75, 175 cm ³)	Nunc, Wiesbaden

Zentrifugengefäße:

14x95 mm PA (Polyallomer)

Beckman Coulter, Krefeld

12x75 mm PP (Polypropylen)

Greiner, Frickenhausen

2.1.1.10 Verbrauchsmaterialien

Deckgläschen

Roth, Karlsruhe

Eindeckmedien:

Dako[®] Fluorescent Mounting Medium

Dako Diagnostics, Carpinteria, CA, USA

Vectashield[®] Hard+Set[®] Mounting Medium

Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA

Einwegskalpelle

B. Braun Aesculap, Tuttlingen

Einwegspritzen

B. Braun, Melsungen

Filterpapier

Whatman, Brentford, Middlesex, UK

Fotopapier Brovira BN; Gradation 1-5

Agfa-Gevaert, Leverkusen

Gelatinekapseln; 200 ml Volumen

Hert, München

Glasplättchen; 15 mm Durchmesser

Roth, Karlsruhe

Parafilm

American National Can, Greenwich, CT, USA

Plattenwachs

Heko Werk, Berlin

Polaroidfilm 667

Polaroid, Offenbach

Refinal

Agfa-Gevaert, Leverkusen

Scientia Planfilm 23DP3AH

Agfa-Gevaert, Leverkusen

Schweißfolien für TaqMan[®]-Platten

ABgene, Epsom, Surrey, UK

Spatel (diverse)

Roth, Karlsruhe

2.1.1.11 Spezielle Softwares

BioEdit

North Carolina State University, USA

(www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html - 11k)

BLAST 2.2.9

NCBI, Bethesda, MD, USA

(www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)

cLSM510 Software, Version 3.0, SP3

Zeiss, Jena

EpiInfo6 Version 6.04d

CDC, Atlanta, GA, USA

(www.cdc.gov/epiinfo/Epi6/ei6.htm)

PrimerSelect[®]

DNASStar Inc., Madison, WI, USA

GeneAmp® 5700 SDS Software Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
SDS 1.9.1 (für Typ 7700)
SDS 2.1 (für Typ 7900 HT)

SeqMan® II DNASTar Inc., Madison, WI, USA

2.1.2 Puffer- und Gebrauchslösungen

Wenn in dieser Liste nicht aufgeführt, sind die Zusammensetzungen der Lösungen bei den entsprechenden Protokollen zu finden.

Für die RNA-Extraktion nach Chirgwin et al. (1979):

3 M Natriumacetat-Stammlösung	- 49,22 g auf 200 ml DEPC-Wasser - pH 6,0 mit Essigsäure (p.A.) einstellen - autoklavieren
250 mM EDTA-Stammlösung (Ethylendiamintetraacetat)	- 18,61 g auf 200 ml DEPC-Wasser - 5 bis 6 NaOH-Plätzchen - pH 6,5 mit 1 M NaOH einstellen - autoklavieren
GTC-Lösung (400 ml)	- 4 M GTC - 1 % (w/v) Sarcosyl (N-Lauroylsarcosin) - 25 mM Natriumacetat; pH 6,0 - 1 mM EDTA; pH 6,5 - 1 M β -Mercaptoethanol (ME) - Lösung in sterilem aq. dest. ansetzen, auf 372 ml auffüllen - dazu 28 ml ME erst unmittelbar vor der RNA-Präparation (unterm Abzug!) geben
CsCl-Kissen	- 5,7 M CsCl - 100 mM EDTA; pH 6,5 - in DEPC-Wasser ansetzen und sterilfiltrieren - 6 mM ME hinzufügen (unterm Abzug!)
TSPE-Puffer	- 10 mM Tris-HCl; pH 7,0 - 1 % (w/v) Sarcosyl (N-Lauroylsarcosin) - 5 % (v/v) Phenol

- 1 mM EDTA; pH 6,5
- auf 10 ml mit DEPC-Wasser auffüllen und sterilfiltrieren

Für die quantitative PCR:

2,5 mM dNUTP-Stammlösung

- je 250 µl 100 mM Nukleotid-triphosphatlösung (A, C, G, U)
- ad 10 ml Molekularwasser

10x Taq-Puffer+ROX

- 150 µl ROX auf 1350 µl 10x Taq-Puffer

Für die Gelelektrophorese:

Gel-Beladungspuffer (10 ml)

- 40 mg Bromphenolblau
- 5 ml Glycin
- gelöst in 5 ml 1x TAE

Für die Zellkultur:

Diluent-Lösung (1 L)

- 8 g NaCl
- 0,4 g KCl
- 0,06 g NaH₂PO₄
- 0,06 g KH₂PO₄
- 1 g Glucose
- 0,375 g NaHCO₃
- auf pH 7,0 einstellen
- Zugabe von 0,2 % (v/v) Versen

Freeze-Mix (Einfriermedium)

- 90 % (v/v) FKS
- 10 % (v/v) DMSO (Dimethylsulfoxid)

Für den Immunfluoreszenztest:

PBS-Puffer

- 140 mM NaCl
- 2 mM KCl
- 10 mM Na₂HPO₄
- 2 mM KH₂PO₄

Blockpuffer

- 10 ml PBS
- 3 % (v/v) FKS
- 0,1 % (v/v) Tween 20

- RPMI 1640 oder DMEM-Nährlösungen für Zellkultur werden jeweils komplettiert mit
- 10 % (v/v) FKS
 - 1 % (v/v) L-Glutamin (200 mM)
 - 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin-Lösung (10000 U)
 - 2 % (v/v) nicht-essentielle Aminosäuren (nur bei DMEM)

2.1.4 Zelllinien, Bakterien- und Virenstämme

Zelllinien:

<u>Zelllinie</u>	<u>Spezies/Zellart</u>	<u>Herkunft</u>
Vero-B4	Affennierenzellen	Stammsammlung ZBS-1, RKI
BHK-21	Hamsternierenzellen	Stammsammlung ZBS-1, RKI
3T3	murine Fibroblasten	Hr. Dr. A. Zimmermann, FG12, RKI
Mv 1 Lu	murine Lungenepithelzellen	Hr. Dr. J. Denner, P13, RKI
CHO	Hamster, Ovariene epithelzellen	Fr. Prof. Dr. Schürmann-Bartsch, DIfE, Nuthetal
LTK	murine Fibroblasten	Fr. Prof. Dr. Schürmann-Bartsch, DIfE, Nuthetal

Bakterien:

Escherichia coli Top10

F⁻ *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ80*lacZ*ΔM15
 Δ*lacX74 recA1 deoR araD139 Δ(ara-leu)7697 galU*
galK rpsL (Str^R) *endA1 nupG* (Invitrogen)

Viren:

Alle hier aufgeführten LV-Isolate stammen aus dem Swedish Institute for Infectious Disease Control (SMI), Stockholm, Schweden, und wurden freundlicherweise von Hr. Dr. Dr. B. Niklasson zur Verfügung gestellt. Die Virusisolate wurden zuvor in Affennierenzell- oder Jungmäusehirn (SMB, *suckling mouse brain*)-Kulturen adaptiert:

LV 87-012; LV 174F; LV 145SL; LV 342SL; M-1146; NY64-7855; NY64-7947.

2.2 Methoden

Zwischen April 2001 und April 2004 wurden in der Klinik für Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie des Deutschen Herzzentrums Berlin (DHZB; AG Prof. Meyer, Herzpathologie/Homograftbank) Myokardproben aus explantierten Herzen von Herztransplantatempfängern (HTx-Patienten) und Herzspendern (Donor-Patienten) gesammelt. Alle Proben wurden unmittelbar nach der Entnahme bei -20 °C tief gefroren und später bis zu ihrer weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff im Robert Koch-Institut (RKI) gelagert. Nach der Isolierung von Nukleinsäuren (DNA bzw. RNA) aus dem jeweiligen Herzmuskelgewebe mittels geeigneter Präparationstechniken, wurden alle Proben mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) auf das Vorhandensein von Enteroviren (EV), Adenoviren (ADV), humanem Zytomegalievirus (HCMV), Parvovirus B19 (PVB19) und Influenzavirus (Typ A und B) untersucht. Darüber hinaus fanden PCR-Untersuchungen bezüglich der Präsenz der bisher in diesem Zusammenhang wenig untersuchten Hantaviren (*Bunyaviridae*) und Ljunganviren (*Picornaviridae*) statt. Die Nachweisuntersuchungen wurden retrospektiv und ohne Kenntnis der Krankengeschichte der jeweiligen Patienten in verschiedenen Laboratorien durchgeführt: Am RKI für EV, PVB19, Influenzavirus, Hanta- und Ljunganviren (LV) und in Kooperation mit Fr. Dr. S. Prösch (Institut für Virologie, Charité, Berlin) für ADV und HCMV. Zusätzlich wurden in der Homograftbank des DHZB Schnitte von Myokardproben in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet, um sie für ausgewählte Bestätigungsuntersuchungen mittels *in situ* Hybridisierung (ISH) aufzubewahren. Die ISH-Untersuchungen fanden in Zusammenarbeit mit der AG Prof. Kandolf (Molekulare Pathologie) im Institut für Pathologie der Universität Tübingen statt. Alle Herzexplantate wurden routinemäßig im DHZB einer histopathologischen Untersuchung und Bewertung unterzogen. Falls vorhanden, wurden Patientenserum auf spezifische Antikörper gegen EV, ADV und PVB19 im RKI getestet, da bezüglich dieser kardiotropen Viren keine Angaben zur Serologie in den Patientendaten gemacht worden sind.

Des Weiteren wurden in Kooperation mit Hr. Dr. Dr. B. Niklasson (Apodemus AB, Stockholm, Schweden) mittels LV-Isolaten erste Studien zur Morphologie und zum Infektionsverlauf (*in vitro*) von Ljunganviren durchgeführt. Als Techniken kamen hier

zum Einsatz: Virusanzucht in Zellkulturen, TCID₅₀-Titerbestimmung, indirekter Immunfluoreszenztest (IFT) und Elektronenmikroskopie. Zwei PCR-Methoden zum LV-Nachweis wurden im Rahmen dieser Arbeit am RKI etabliert, um damit Untersuchungen in verschiedenen Gewebe- und Liquorproben durchführen zu können.

Falls in den nachfolgenden Methodenbeschreibungen nicht näher erläutert, finden sich weitere Angaben zu den verwendeten Materialien, Geräten, Puffer- und Nährlösungen in der Materialliste [siehe Kap. 2.1].

2.2.1 Probenentnahme, Patientenauswahl und Patientendaten

Untersucht wurden chirurgische Schnitte von Myokardproben mit einer Kantenlänge von ca. 1 cm, die aus explantierten Herzen in Standardpositionen entnommen worden sind (Abb. 7): Linker Ventrikel Vorderwand (LVVW), Linker Ventrikel Hinterwand (LVHW), Septum, Vorderwand des rechten Ventrikels (RV). Die Proben wurden unmittelbar nach der Entnahme bei -20 °C tief gefroren und bis zu ihrer weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff gelagert. Die Probenentnahme fand nach einem zusammen mit dem Homograflabor des DHZB ausgearbeiteten Standardprotokoll statt. Außerdem wurden, wenn möglich, parallel Patientenserum für serologische Untersuchungen gesammelt und bei -20 °C gelagert.



Abbildung 7:
Entnahme von
Myokardproben im
Homograflabor.

Die Herzexplantate stammen entweder von HTx-Patienten, die sich in dem oben genannten Zeitraum aufgrund der klinischen Diagnose Herzinsuffizienz einer Herztransplantation unterzogen haben, oder

von Herzspendern, deren Herzen aufgrund einer Kontraindikation (z.B. dokumen-

tierter Herzinfarkt), eines nativen Fehlers oder eines chirurgischen Fehlers während der Herzentnahme für eine Allograftspende abgelehnt wurden. Patienten mit einem dokumentierten serologisch positiven Befund für HIV, Hepatitis B- und/oder Hepatitis C-Virus wurden von vornherein durch das Homograftlabor für diese Studie ausgeschlossen, da Patienten mit solchen Infektionen als Donor im weitesten Sinne (z.B. für Herzklappengewebe) nicht in Frage kommen.

Zur Bewertung der erhobenen virologischen Daten wurden, neben den Befundberichten über den morphologischen Zustand des Myokards, der Koronararterien, der Aorta und der Arteria pulmonalis von den Herzen, die der Homograftbank in dem oben genannten Zeitraum für die Klappengewinnung zur Verfügung standen, wenn möglich, weitere Quellen herangezogen, um Angaben zur Krankengeschichte zu erhalten. Im Fall der HTx-Patienten wurden i.d.R. die im EDV-System des DHZB gespeicherten Arztbriefe nach der kardialen Diagnose, die von den klinisch tätigen Ärzten gestellt worden war, und nach anderen wesentlichen Erkrankungen gesichtet. Im Fall der hirntoten Spender erfolgte i.d.R. eine Durchsicht der Spenderinformationsprotokolle in der Kartei der Homograftbank nach der Todesursache, nach dem Grund für die Ablehnung des Organs für die Spende und nach wesentlichen Vorerkrankungen.

2.2.2 Präparation und Reinigung von Nukleinsäuren aus Myokardgewebe

Für den Nachweis von Nukleinsäuren (DNA oder RNA) mittels PCR [Kap. 2.2.4] müssen die zu amplifizierenden Nukleinsäure-Moleküle vorab aus dem Gewebe gewonnen und von anderen zellulären Komponenten befreit werden, die möglicherweise die Amplifikationsreaktion im Anschluss inhibieren könnten (Wiedbrauk et al., 1995). Dies stellt hohe Anforderungen an ein Extraktions- bzw. Präparationsverfahren von Nukleinsäuren aus Geweben hinsichtlich der Quantität und auch der Qualität der extrahierten Nukleinsäuren. Konventionell werden die Phenol-Chloroform-Extraktion für DNA (Sambrook et al., 1989) oder die Guanidinisothiocyanat-Methode für RNA (Chomczynski und Sacchi, 1987) mit einer anschließenden Ethanol-fällung angewendet, um Nukleinsäuren aus Zellen und Mikroorganismen zu gewinnen. In diagnostischen Laboren wird aus Zeitgründen immer weniger von diesen konven-

tionellen Methoden Gebrauch gemacht. Kommerzielle Reagenziensätze (Kits) sind im Vergleich hierzu gebrauchsfertig, einfach und schnell anzuwenden.

In dieser Arbeit wurden unterschiedliche kommerzielle Extraktions-Kits gegenüber den jeweiligen konventionellen Methoden getestet, um die jeweils optimalen Extraktionsmethoden für DNA oder RNA aus Myokardgewebe bestimmen zu können.

2.2.2.1 Evaluation kommerzieller DNA-Extraktionsmethoden

Folgende kommerzielle DNA-Extraktionsmethoden wurden für die Isolierung und Aufreinigung der genomischen DNA aus Myokardgewebe gegenüber der konventionellen Phenol-Chloroform-Extraktionsmethode, modifiziert nach Sambrook et al. (1989) [Kap.2.2.2.4], evaluiert: QIAamp[®] DNA Kit (Qiagen) und NucleoSpin[®] Tissue Kit (Macherey-Nagel).

DNA wurde aus je 50 mg tiefgefrorenem Myokardgewebe eines Testexplantats im Doppelansatz extrahiert (n= 6). Für die kommerziellen Kits wurden alle zuvor homogenisierten Gewebeproben mit Proteinase K bei 56 °C lysiert und die DNA anschließend selektiv an eine Minisäule gebunden und später eluiert. Verbliebene RNA-Reste wurden durch einen zusätzlichen Inkubationsschritt mit RNase A beseitigt. Die einzelnen Arbeitsschritte wurden nach Vorschrift des Herstellers durchgeführt. Die benötigten Puffer und Verbrauchsmaterialien waren in den jeweiligen Kits enthalten.

2.2.2.2 Evaluation kommerzieller RNA-Extraktionsmethoden

Folgende kommerzielle RNA-Extraktionsmethoden wurden für die Isolierung und Aufreinigung der Gesamt-RNA aus Myokardgewebe gegenüber der Guanidinisothiocyanat-Methode von Chirgwin et al. (1979) [Kap. 2.2.2.4] evaluiert: RNeasy[®] B (Cinna/Tel-Test), peqGOLD RNAPure[®] (Peqlab), RNeasy[®] Protect (Qiagen), HighPure[®] RNA Tissue Kit (Boehringer Mannheim) und Total Quick[®] RNA Cells and Tissues Kit (Talent).

RNA wurde aus je 50 mg bzw. 25 mg (gemäß HighPure[®]-Protokoll) tiefgefrorenem Myokardgewebe eines Testexplantats im Doppelansatz extrahiert (n= 12). Alle gefrorenen Gewebeproben wurden zuvor mit Hilfe eines Hammers pulverisiert und anschließend mit einem Rotor-Stator-Homogenisator in Guanidinisothiocyanat-haltiger Lösung homogenisiert. Das chaotrope Agens führt zur Denaturierung und Inaktivierung endogener RNasen (Chirgwin et al., 1979; Chomczynski und Sacchi, 1987). Die einzelnen Arbeitsschritte wurden nach Vorschrift des Herstellers durchgeführt. Die benötigten Puffer und Verbrauchsmaterialien waren in den jeweiligen Kits enthalten.

2.2.2.3 Parameter zur Evaluation der eingesetzten Extraktionsmethoden

Folgende Parameter wurden für die Evaluation der Methoden getestet:

1. Konzentration und Ausbeute der jeweils extrahierten Nukleinsäuren.
2. Reinheitsgrad der extrahierten Nukleinsäuren mittels der OD₂₆₀/OD₂₈₀-Ratio.
3. DNA-Gehalt der RNA-Präparate mittels fluorometrischer Quantifizierung.
4. Intensität der RNA-Banden im 1 %-igen Agarosegel.

Die Bestimmung der Konzentration, Ausbeute und des Reinheitsgrads der Nukleinsäuren erfolgte photometrisch [Kap. 2.2.3]. Die Bestimmung des DNA-Gehalts erfolgte fluorometrisch [Kap. 2.2.3]. Die Qualität der extrahierten RNA wurde mittels gelelektrophoretischer Auftrennung anhand der 28-S- und 18-S-rRNA-Banden überprüft [Kap. 2.2.5].

2.2.2.4 Aufarbeitung der Myokardproben

Für die Extraktion der Nukleinsäuren aus Myokardgewebe in dieser Arbeit wurden die konventionellen Methoden nach Chirgwin et al. (1979) für RNA und (modifiziert) nach Sambrook et al. (1989) für DNA angewendet.

Bei der RNA-Extraktion nach Chirgwin et al. (1979) wird Gesamt-RNA aus einem Guanidinisothiocyanat-Lysat mittels Ultrazentrifugation (UZF) durch ein Cäsiumchlorid (CsCl)-Kissen gewonnen. Der zusätzliche UZF-Schritt erlaubt es gleichzeitig RNA und DNA aus einer Probe sauber voneinander getrennt zu isolieren, indem für die DNA-Isolierung der Überstand abgezogen und anschließend mit der modifizierten Methode nach Sambrook et al. (1989) weiterverarbeitet wird.

Probenaufarbeitung:

Tag 1 – Die in flüssigem Stickstoff eingefrorene Gewebeprobe wurde zügig gewogen. Das Gewicht der Probe durfte 1/10 des Volumens der Guanidinisothiocyanat (GTC)-Lösung pro Zentrifugenröhrchen nicht überschreiten. Der Probenaufschluss erfolgte mittels mechanischer Disruption durch einen Hammer (*freeze-fracturing*) und anschließender Homogenisierung („Rotor-Stator-Homogenisation“) in proteindenaturierender, β -Mercaptoethanolhaltiger GTC-Lösung. β -Mercaptoethanol bricht zusätzlich die stabilen Disulfidbrücken in Proteinen auf. Zur Vermeidung von Kreuz-Kontaminationen zwischen den einzelnen Probenaufschlüssen wurde ein Protokoll nach Schowengerdt et al. (1996) angewendet [Kap. 2.2.2.5]. Nach Zentrifugation (3000 UpM, 10 min, RT) in einer Heraeus Megafuge 1.0 R wurde das Probenlysat in ein Polyallomer (PA)-Zentrifugenröhrchen (Beckman) auf ein vorgelegtes CsCl-Kissen vorsichtig geschichtet, mit GTC-Stammlösung aufgefüllt und austariert. Danach erfolgte die UZF (33000 UpM, 21 h, 22 °C), wobei der verwendete SW40-Rotor ohne Bremsung später auslief. Bei CsCl muss unbedingt bei RT zentrifugiert werden, da es sonst bei niedrigen Temperaturen leicht ausfällt, was angesichts der hohen Zentrifugationsgeschwindigkeit zu Unfällen mit der Ultrazentrifuge führen kann.

Tag 2 – Der Überstand wurde bis ca. 1 cm vom Boden des Zentrifugenröhrchens abgenommen und für die DNA-Extraktion aufbewahrt. Der untere Teil des PA-Zentrifugenröhrchens wurde mit einem Skalpell abgeschnitten und auf Eis gehalten. Das Pellet wurde zweimal mit phenolhaltigem TSPE-Puffer gelöst und anschließend in ein Polypropylen (PP)-Zentrifugenröhrchen (Greiner) überführt. Dazu wurden 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat und 10 ml Ethanol (reinst) gegeben. Danach erfolgte die Ethanol-fällung zur Aufkonzentrierung und Entsalzung der RNA über Nacht bei -20 °C.

Der aufbewahrte Überstand wurde zur Entfernung von Proteinen mit dem gleichen Volumen Phenol versetzt und vorsichtig gemischt. Danach erfolgte die Zentrifugation (5000 UpM, 5 min, RT) mit einer Heraeus Megafuge 1.0 R zur Trennung der organischen und wässrigen Phase. Die wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß

überführt. Danach wurde das gleiche Volumen Phenol-Chloroform (1:1-Gemisch) dazugegeben und erneut vorsichtig gemischt und zentrifugiert. Die verbliebenen Interphase und organische Phase wurden ebenfalls re-extrahiert. Um Phenol-Reste zu entfernen, wurde die wässrige Lösung mit Chloroform-Isoamylalkohol (24:1-Gemisch) versetzt und erneut zentrifugiert. Zur Aufkonzentrierung und Entsalzung der DNA wurde der wässrigen Lösung 2,5 Volumen Ethanol-Natriumacetat (1:1-Gemisch) dazugegeben und über Nacht bei 4 °C gefällt.

Tag 3 – Das RNA-Präzipitat wurde in einer Kühlzentrifuge (Sorvall-Kendro) mit einem HB-6-Rotor abzentrifugiert (10000 UpM, 60 min, -10 °C). Der Überstand wurde abdekantiert und das Pellet anschließend kurz an der Luft getrocknet und danach wieder auf Eis gehalten. Das Pellet wurde zweimal mit DEPC-haltigem Wasser gelöst und anschließend in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Dazu wurden 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat und 2,5 Volumen Ethanol (reinst) gegeben. Danach erfolgte die Ethanolfällung zur Aufkonzentrierung der RNA über Nacht bei -20 °C.

Das DNA-Präzipitat wurde ebenfalls vorab in einer Kühlzentrifuge (Sorvall-Kendro) mit einem HB-6-Rotor abzentrifugiert (10000 UpM, 60 min, -10 °C). Der Überstand wurde abdekantiert und das Pellet mit 70 %-igem Ethanol gewaschen und anschließend in einer Speed-vac vakuumgetrocknet. Das getrocknete DNA-Pellet wurde in 100 µl Molekularwasser aufgenommen, resuspendiert und bis zu seiner weiteren Verwendung bei -80 °C bzw. in flüssigem Stickstoff gelagert.

Tag 4 – Das RNA-Präzipitat wurde in einer Kühlzentrifuge (B. Braun) mit einem 12145 Rotor abzentrifugiert (14000 UpM, 60 min, -10°C). Der Überstand wurde zügig abdekantiert und das Pellet zweimal mit 70 %-igem Ethanol gewaschen (jeweils 15 min abzentrifugiert). Das Pellet wurde mit einer Speed-vac vakuumgetrocknet und anschließend in 100 µl Molekularwasser aufgenommen, resuspendiert und bis zu seiner weiteren Verwendung bei -80 °C bzw. in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.2.2.5 Vermeidung von Kreuz-Kontaminationen beim Probenaufschluss

Um Kreuz-Kontaminationen durch Übertragung von Nukleinsäuren zwischen den einzelnen Probenaufschlüssen zu vermeiden, wurde folgendes Protokoll nach Schowengerdt et al. (1996) angewendet:

Das Dispergierwerkzeug wurde eine Minute lang mit DEPC-Wasser gewaschen, danach mit 1 %-igem SDS für 10 min und anschließend mit Ethanol (reinst) erneut für 10 min. DEPC und SDS besitzen zudem eine RNase-inhibierende bzw. -denaturierende Wirkung. Alle Waschschriffe wurden bei mittlerer Geschwindigkeit des Homogenisators durchgeführt. Das Dispergierwerkzeug wurde nach jedem Arbeitstag 20 min autoklaviert und vor seiner Wiederverwendung auf RT abgekühlt.

2.2.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Eine grundlegende molekularbiologische Technik ist die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren. Sie bildet mitunter die Voraussetzung dafür, dass in der PCR stets ausreichende Mengen an Nukleinsäuren eingesetzt werden können. Neben der Konzentrationsbestimmung mittels Agarosegel [Kap. 2.2.5] gibt es die Absorptionsspektrometrie und die fluorometrische Bestimmung, die im Folgenden kurz erläutert werden.

2.2.3.1 Absorptionsspektrometrie

Die Konzentration einer wässrigen Nukleinsäurelösung kann über die Absorption bei 260 nm (OD_{260}) photometrisch bestimmt werden. Allerdings sind hierzu recht große Mengen an DNA bzw. RNA notwendig, da ein Photometer nur in einem Bereich von 0,05 und 1 OD_{260} zuverlässig misst. Das entspricht einer Nukleinsäuremenge von 2,5 bis 50 μg je ml. Durch kleinere Arbeitsvolumina und Verdünnungen kann man die Menge allerdings reduzieren. Die Messung erfolgte mittels eines Bio-Photometers (Eppendorf) in einer Einwegküvette mit einem Arbeitsvolumen von 100 μl (jeweils 1:20 verdünnt). Parallel wurde die Absorption bei 280 nm (OD_{280}) bestimmt, um über den Quotienten OD_{260}/OD_{280} eine Aussage über den Reinheitsgrad der Nukleinsäurepräparation zu erhalten. Der Quotient sollte einen Wert zwischen 1,8 und 2,0 ergeben. Für die Konzentration von wässrigen Nukleinsäurelösungen gilt folgender Zusammenhang (Sambrook et al., 1989):

RNA-Lösung:	1 OD ₂₆₀ /ml entspricht 40 µg/ml
doppelsträngige DNA-Lösung:	1 OD ₂₆₀ /ml entspricht 50 µg/ml
einzelsträngige DNA-Lösung:	1 OD ₂₆₀ /ml entspricht 33 µg/ml

2.2.3.2 Fluorometrische Bestimmung

Für eine spezifische und quantitative Bestimmung von DNA-Mengen erfolgte die Messung der Nukleinsäurekonzentration mittels eines Fluoreszenzfarbstoffes, PicoGreen® (Molecular Probes), in einem Mikrotiterplatten-Spektrofluorometer (Tecan). Durch selektive Bindung an doppelsträngige DNA ändert der Fluoreszenzfarbstoff seine sterische Konformation und emittiert nach Anregung Licht einer definierten Wellenlänge. Im Fluorometer können so DNA-Konzentrationen zwischen 25 pg/ml und 1000 ng/ml bestimmt werden. PicoGreen® hat gegenüber einem anderen, bekannteren Fluoreszenzfarbstoff (Hoechst 33258) eine Reihe wesentlicher Vorteile. So ist z.B. die Sensitivität des Reagens gegenüber Salzen, Detergenzien und anderen möglichen Verunreinigungen in Nukleinsäureproben beständig. Auch ist der Farbstoff mit nur einer einzigen angesetzten Konzentration wesentlich sensitiver und zeigt keine Signalverstärkung durch einzelsträngige DNA oder RNA.

Vor Beginn der Konzentrationsbestimmung von DNA-Proben wurde eine DNA-Standardkurve gemäß Herstellerangaben erstellt. Hierzu wurde Lambda-DNA-Standard in verschiedenen Konzentrationen verwendet. Die Messung erfolgte gemäß Herstellerangaben in einer schwarzen 96er-Mikrotiterplatte (Nunc) mit einem Arbeitsvolumen von 200 µl. Die Konzentration der jeweiligen DNA in den Proben konnte mit Hilfe der Standardkurve ermittelt werden. Abbildung 8 zeigt zwei Standardkurven für die Messung mit PicoGreen® in zwei verschiedenen Messbereichen: einen Messbereich für hohe DNA-Konzentrationen zwischen 1 ng/ml und 1 µg/ml und einen Messbereich für niedrige DNA-Konzentrationen zwischen 25 pg/ml und 25 ng/ml.

Die einzelnen Arbeitsschritte wurden nach Vorschrift des Herstellers durchgeführt. Die benötigten Puffer sowie der DNA-Standard waren in dem Kit enthalten.

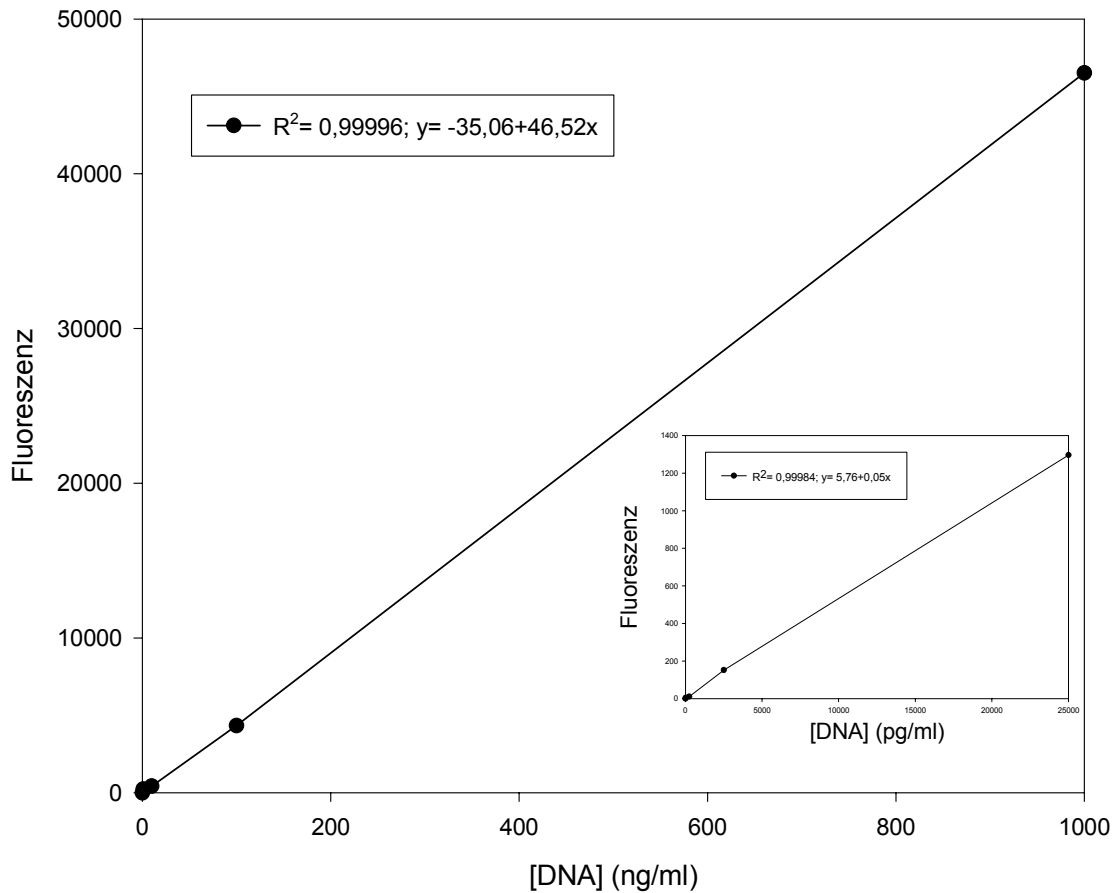


Abbildung 8: Fünf-Punkte-Standardkurven für das PicoGreen® dsDNA Quantitation Reagens (Molecular Probes). Gezeigt werden ein Messbereich für hohe DNA-Konzentrationen zwischen 1 ng/ml und 1 µg/ml (großes Diagramm) und ein Messbereich für niedrige DNA-Konzentrationen zwischen 25 pg/ml und 25 ng/ml (kleines Diagramm). Lambda-DNA-Standard in verschiedenen Konzentrationen wurde mit dem PicoGreen®-Reagens gemäß Herstellerangaben inkubiert. Alle Proben wurden bei 200 µl-Arbeitsvolumen in einer 96er-Mikrotiterplatte mittels eines Spektrofluorometers (Tecan) gemessen. Die Proben wurden mit Licht bei 485 nm angeregt und die Emission der Fluoreszenz bei 535 nm gemessen. Die Leerwert-korrigierten Daten wurden für die Erstellung der Standardkurven, Fluoreszenz versus DNA-Konzentration, verwendet.

2.2.4 Nachweis viraler Nukleinsäuren mittels DNA-Amplifikation über PCR

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine sehr schnelle und sensitive Methode zur *in vitro*-Amplifizierung spezifischer DNA-Abschnitte und ermöglicht somit die De-

tektion kleinster DNA-Mengen. Durch die exponentielle Amplifikation der Zielsequenz ist es theoretisch möglich, noch Ausgangskonzentrationen von einem Genom-äquivalent (ge) im Untersuchungsgut nachzuweisen.

Technisch ist die PCR aufgrund ihrer hohen Detektionsempfindlichkeit anfällig für Kontaminationen. Bereits kleinste Mengen an Ziel-DNA können zu falsch-positiven Ergebnissen führen. Da zudem die DNA ein relativ stabiles Biomolekül ist, können durch Fehler bei der Handhabung von PCR-Produkten ganze Arbeitsbereiche für die PCR-Diagnostik unbrauchbar gemacht werden. Derartige Fehler können durch einige konsequent einzuhaltende, präventive Maßnahmen (z.B. physikalische Trennung von PCR-Vorarbeiten und PCR-Produkten, UV-Dekontamination usw.) im Laborbereich vermieden werden (Kwok und Higuchi, 1989).

Das Prinzip der PCR-Reaktion basiert auf der enzymatisch katalysierten Vermehrung eines bestimmten DNA-Abschnittes, der zwischen zwei Startersequenzen, den sog. Primer-Oligonukleotiden, liegt (Mullis und Faloona, 1987). Die Basenabfolge der beiden Primer muss komplementär zu dem 3'- bzw. 5'-Ende der zu amplifizierenden DNA-Sequenz sein. Des Weiteren sollten die Primer eine Länge von 18 bis 30 Basen haben, einen G/C-Gehalt zwischen 40 bis 60 % sowie eine Schmelztemperatur (T_m) zwischen 55 bis 80 °C. Daneben sollten bei der Primerauswahl Poly(T)-Bereiche, Haarnadelstrukturen und 3'-Komplementarität vermieden werden, da es sonst zu unspezifischen Bindungen oder Primerdimerbildung kommen könnte.

Der Einsatz einer hitzestabilen DNA-Polymerase, z.B. von *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase), erlaubt die zyklische Wiederholung der einzelnen Amplifikationsschritte innerhalb eines Ansatzes, wodurch die nachzuweisende Zielnukleinsäure exponentiell vermehrt wird (Newton und Graham, 1997). Die Entwicklung verschiedener einfacher Geräte für die Steuerung der PCR-Zyklen (sog. Thermozykler) ermöglichte die vollständige Automatisierung der PCR-Reaktion.

Binden die Primer an die komplementären DNA-Abschnitte, katalysiert die DNA-Polymerase die *in vitro*-DNA-Synthese, die im Wesentlichen in drei Schritten erfolgt: Jeder Zyklus besteht aus 1) einem Denaturierungsschritt bei 94 °C, um die beiden DNA-Stränge voneinander zu trennen, 2) einem Hybridisierungsschritt (*annealing*), in

dem die beiden Primer an den jeweils komplementären Strang binden, und 3) einem Syntheseschritt (*elongation*), währenddessen der zwischen den Primern liegende DNA-Abschnitt mithilfe der DNA-Polymerase und der im Reaktionsmix vorhandenen Desoxyribonukleotide selektiv synthetisiert wird. Während jedes PCR-Zyklus sollte sich demnach die Menge der spezifischen DNA-Abschnitte verdoppeln, die im nächsten Zyklus wiederum als Ausgangs-DNA (*template*) für die Amplifikationsreaktion dient. Theoretisch würde somit die Menge der Zielsequenz während der PCR-Reaktion exponentiell zunehmen. In der Praxis wird jedoch nur eine ca. 70 bis 80 %-ige Effizienz der PCR erreicht, da die Bedingungen für eine exponentielle Amplifizierung des Zielproduktes sowohl am Anfang wie auch am Ende der Reaktion nicht optimal sind. Eine typische PCR-Reaktion verläuft in den ersten Zyklen, bei denen die Templatemenge noch sehr gering ist, linear, steigt anschließend exponentiell an und erreicht in der letzten Phase der Reaktion ein Plateau, da die Enzymaktivität nach einer bestimmten Zeit nachlässt und auch die amplifizierten DNA-Abschnitte teilweise nicht mehr mit den Primern, sondern untereinander hybridisieren.

Aufgrund dieser PCR-Reaktionskinetik ist es schwierig, Aussagen über die Ausgangs-DNA-Mengen zu treffen. In vielen Fällen ist jedoch eine Quantifizierung der Ausgangstemplatemenge nötig, z.B. bei der Virusquantifizierung zur klinischen Beurteilung von persistierenden Infektionen oder Überprüfung von antiviralen Therapieversuchen. Dies führte zur Entwicklung von zahlreichen quantitativen Nukleinsäure-Amplifikationstechniken für den Erregernachweis, wie z.B. Endpunktverdünnung, Post-PCR-Hybridisierung oder kompetitive PCR mit internen Standards.

Die modernste Methode der Quantifizierung von Nukleinsäuren ist die quantitative Echtzeit-PCR (*real-time PCR*). Die Grundlage hierfür wurde durch Higuchi et al. (1992) geschaffen, die die PCR-Maschine mit einer UV-Lampe und CCD-Kamera ausstatteten und der PCR-Reaktion Ethidiumbromid zufügten. Das Ethidiumbromid interkaliert in doppelsträngiger DNA, wodurch die Fluoreszenz messbar erhöht wird. Die Methode wird heute, jedoch unter Verwendung anderer Farbstoffe, insbesondere des SYBR[®] Green I, angewandt. Der Vorteil der Methode liegt in der universalen Verwendbarkeit, weil damit jede beliebige PCR-Reaktion verfolgt werden kann, außerdem ist die Signalstärke hoch, weil jedes DNA-Molekül mehrere Farbstoff-

moleküle bindet. Der Nachteil liegt in der mangelnden Spezifität, weil nicht zwischen korrektem PCR-Produkt und Artefakten unterschieden werden kann.

Das Problem der mangelnden Spezifität wurde bereits mit dem von Holland et al. (1991) beschriebenen 5'-Nuklease-PCR-Assay unter Ausnutzung der 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase gelöst. Allerdings erforderte diese Technik noch eine aufwendige Post-PCR-Prozessierung. So wurden radioaktiv markierte Sonden verwendet und Sondenfragmente von intakten Sonden mittels Dünnschichtchromatographie im Anschluss an die Reaktion unterschieden.

Die heute gängige Lösung baut dagegen auf der Ausnutzung des Fluoreszenz-(oder Förster) Resonanz-Energie-Transfers (FRET) auf, wie sie von Cardullo et al. (1988) eingeführt wurde. Aus der Kombination von PCR-Gerät mit Fluoreszenz-Detektion, spezifischem Oligonukleotid und FRET wurden drei verwandte Nachweismethoden entwickelt, genannt TaqMan[®], *molecular beacons* und *hybridization probes* (Light-Cycler[®]-Verfahren).

Das TaqMan[®]-Prinzip (Abb. 9) ist das älteste und bekannteste von den Dreien. Bei dieser real-time PCR wird die Amplifikationsreaktion durch den Einsatz einer zusätzlichen fluoreszenzmarkierten Oligonukleotid-Sonde (*probe*) verfolgt und quantifiziert (Lee et al., 1993). Die TaqMan[®]-Sonde ist ein Oligonukleotid mit einem Detektionsfarbstoff (Reporter) am 5'-Ende (z.B. 6-Carboxy-Fluoreszein, FAM) und einem Quencherfarbstoff am 3'-Ende (z.B. 6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin, TAM-RA). Ihre Sequenz wird so gewählt, dass sie zeitlich vor den PCR-Primern zwischen deren Bindungsstellen auf der Zielsequenz bindet. Solange die Sonde intakt ist, wird bei Anregung des Detektionsfarbstoffes dessen Signal wegen der Nähe des Quenchers unterdrückt. Bei der Elongation der Primer zerlegt die Taq-Polymerase aufgrund ihrer 5'-3'-Exonukleaseaktivität die Sonde in ihre Einzelnukleotide und setzt den Reporter und Quencher frei. Nach der Freisetzung des Reporters kann dessen Signal detektiert werden (Livak et al., 1995). Aus dem Anstieg der freien Reporter-konzentration ergibt sich ein wachsendes Fluoreszenzsignal, das proportional zur gebildeten Menge an PCR-Produkt ist.

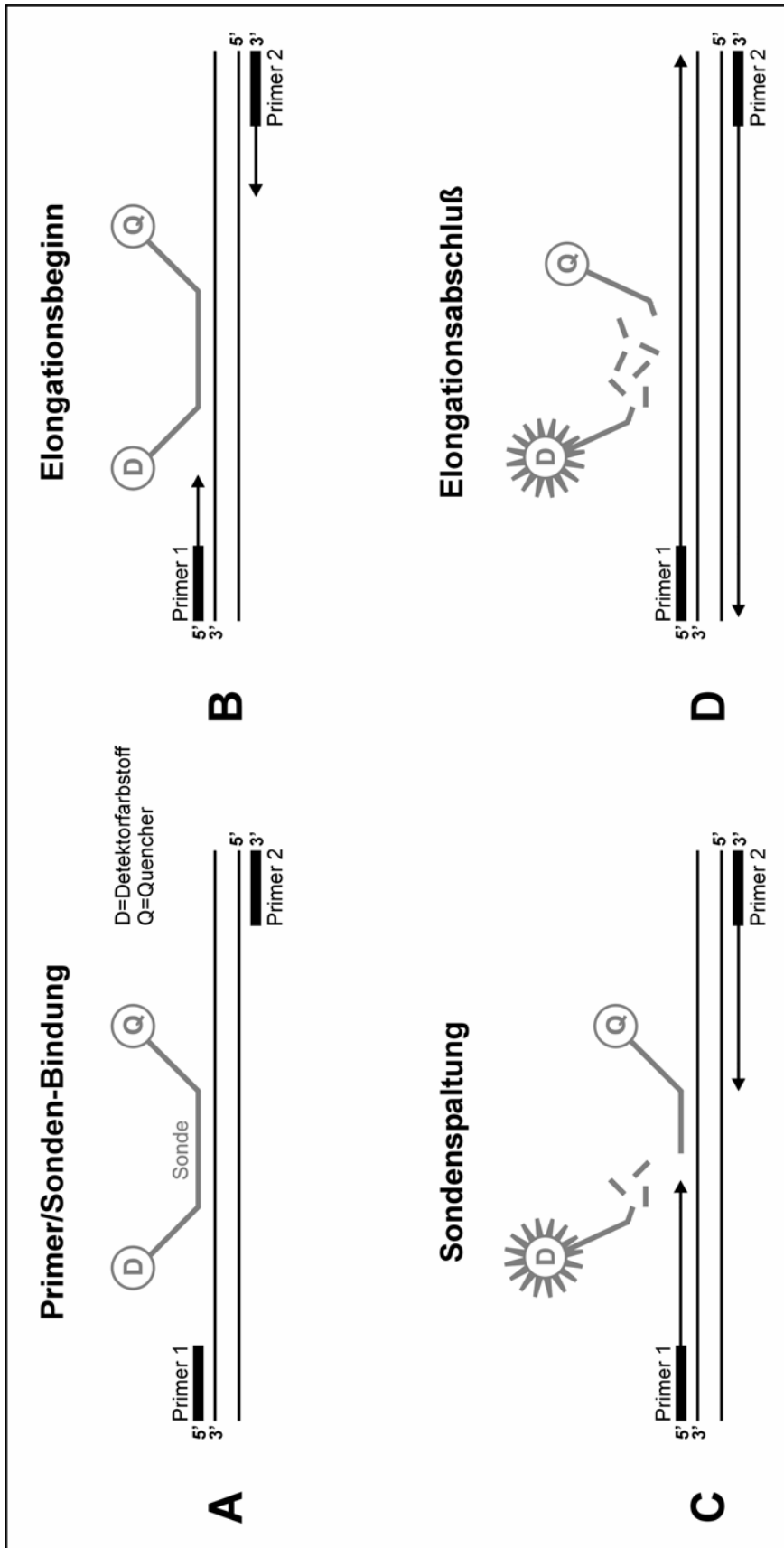


Abbildung 9: Reaktionsprinzip der TaqMan®-PCR (modifiziert nach Lottspeich und Zorbas, 1998).

- A Primer und Sonde haben an die Zielsequenz gebunden, das Signal des Detektorfarbstoffs wird durch den Quencher inaktiviert
- B die Elongation der Primer hat begonnen
- C durch die 5'-Nucleaseaktivität der *Taq* DNA-Polymerase wird die Sonde während der Elongation abgebaut
- D Detektorfarbstoff und Quencher sind räumlich getrennt, das Fluoreszenzsignal kann detektiert werden

Die Quantifizierung der PCR basiert bei allen real-time-Systemen auf der Berechnung des Fluoreszenz-Schwellenwerts, dem sog. *threshold cycle* (C_T -Wert). Der C_T -Wert ist jener PCR-Zyklus, bei dem die Reporterfluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigt. Am Anfang der PCR-Reaktion wird nur die Basis- oder Hintergrundfluoreszenz gemessen, da die Reporterfluoreszenz aufgrund der geringen Templatekonzentration im Reaktionsgefäß während der ersten PCR-Zyklen nicht detektierbar ist.

Die Quantifizierung der DNA-Menge beruht nicht auf absoluten Mengen an PCR-Produkt, sondern auf der Kinetik der PCR-Reaktion. Dafür nimmt man den C_T -Wert, da zu diesem Zeitpunkt die Amplifikation exponentiell ist und es in dieser Phase der PCR-Reaktion keine limitierenden Faktoren wie Primer- oder Nukleotidmangel, nachlassende Enzymaktivität oder Inhibition der PCR-Reaktion durch Bildung bestimmter Produkte gibt. Parallel dazu oder vorher werden bekannte Templatemengen amplifiziert, so dass man vergleichen kann, welche Templatemenge man bei welchem C_T -Wert erhält. Daraus lässt sich eine Standardkurve erstellen, anhand derer man aus einem bestimmten C_T -Wert auf eine Templatekonzentration schließen kann.

Neben der Quantifizierung viraler DNA bieten real-time PCR-Verfahren gegenüber der konventionellen PCR weitere wichtige Vorteile für die Diagnostik: Als Echtzeitverfahren ermöglicht das TaqMan[®]-System die Analyse des Verlaufs der PCR-Reaktion bei der Auswertung, um mögliche Unregelmäßigkeiten zu untersuchen. Weitere Proben-Nachbearbeitungen wie z.B. Hybridisierung oder gelelektrophoretische Auftrennung sind i.d.R. entbehrlich, da am Ende der TaqMan[®]-PCR eine Aussage zur Konzentration der Zielnukleinsäuren steht. Damit wird auch das Kontaminationsrisiko durch potenziell freigesetzte PCR-Produkte eliminiert.

In dieser Arbeit wurden unterschiedliche PCR-Verfahren (*assays*) zum Nachweis viraler Nukleinsäuren unterschiedlicher Erreger angewendet und damit die Gesamt-RNA bzw. -DNA aus Myokardgewebe untersucht. Für den Nachweis von Enteroviren wurde eine nested Reverse-Transkriptase-PCR (nRT-PCR) angewendet, deren Primer innerhalb der konservierten 5'-nicht-codierenden-Region (5' NCR) des Genoms hybridisieren, was einen gruppenspezifischen Nachweis verschiedener EV erlaubt (Pusch et al., 2005). Das Protokoll wurde freundlicherweise von Hr. Dr. E. Schreier

(NRZ für Polio- und Enteroviren, RKI) zur Verfügung gestellt. Die Präsenz von Influenzavirus Typ A und Typ B RNA wurde quantitativ mittels eines real-time RT-PCR-Verfahrens nach Schweiger et al. (2000) ermittelt. Die hierfür verwendeten Primer- und SONDENSEQUENZEN hybridisieren zum typenspezifischen Nachweis entweder in der M-Protein-Region oder in der HA-Protein-Region des Virusgenoms. Ebenso wurde auch auf die Präsenz von Hantaviren-RNA mittels eines real-time RT-PCR-Assays mit serotypspezifischen Primern und Sonden getestet, deren Sequenzen von Hr. Dr. M. Weidmann (Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Universitätsklinikum Freiburg) freundlicherweise mitgeteilt wurden. Ein real-time RT-PCR-Verfahren zum gruppenspezifischen Nachweis von Ljunganviren wurde speziell für diese Arbeit entwickelt. Die Methode sowie ihre Etablierung werden gesondert im Kapitel 2.2.16 dargestellt.

Für die PCR von DNA-Viren wie Adenoviren oder HCMV wurden Primersequenzen verwendet, die bereits zuvor beschrieben wurden (Poddar, 1999; Olive et al., 1989). Der Nachweis dieser Viren fand in Kooperation mit Fr. Dr. S. Prösch (Institut für Virologie, Charité, Berlin) statt. Für den Nachweis von PVB19-DNA wurde in dieser Arbeit ebenfalls eine quantitative real-time PCR etabliert, was in Kapitel 2.2.4.7 erläutert wird. Die Präsenz von amplifizierbaren, zellulären Nukleinsäuren (β -Aktin, GAPDH, RNA-Polymerase II) aus dem Myokardgewebe wurde zur Kontrolle der Probenaufarbeitung mit Referenzgen-spezifischen Primern und Sonden nach Radonić et al. (2004) in einem quantitativen real-time PCR-Assay nachgewiesen. Für den Nachweis viraler Erreger in der PCR müssen das virale Genom oder zumindest wichtige Abschnitte seiner Sequenz bekannt sein. Nur dann können geeignete DNA-Bereiche für die PCR-Amplifikation ausgesucht und die entsprechenden spezifischen Primer für die Elongation synthetisiert werden. Die Temperaturbedingungen und Zykluszeiten müssen für jeden zu entwickelnden PCR-Assay neu ermittelt werden, das gilt auch hinsichtlich der Konzentration der einzelnen Primer und der Salzbedingungen für das Primerannealing und der Fehlerrate der DNA-Polymerase. Die Sequenzen der jeweiligen Primer und Sonden für den Virusnachweis sind in Tabelle 5 mit Bezeichnung, Sequenzlokalisierung im jeweiligen Genom und Schmelztemperatur angegeben.

Tabelle 5:
Charakteristika der Primer und Sonden in den unterschiedlichen PCR-Ansätzen zum Virusnachweis.

Virus/Oligo	Sequenz (5'>3')	Genomlokalisierung	Acc. No.	T _m (°C)
RNA-Viren				
Enteroviren				
EntV1s	CAA gCA CTT CTg TTT CCC Cgg	5'NCR 168-191 nt	AJ131523	42
EntV2as	ATT gTC ACC ATA AgC AgC CA	5'NCR 581-609 nt		
EntV5s	TAC TTC gAg AAA CCY AgT A	5'NCR 248-267 nt		
EntV80as	AAC ACg gAC ACC CAA AgT A	5'NCR 547-566 nt		
Influenzavirus				
<i>Typ A</i>				
AM-151s	CAT ggA ATg gCT AAA gAC AAg gAC C	M-Gen 151-174 nt	Z26862	60
AM-397as	AAG TgC ACC AgC AgA ATA ACT gAg	M-Gen 374-397 nt		
AM-245TM	F-CTg CAg CgT AgA CgC XTT TgT CCA AAA Tg-p	M-Gen 245-272 nt		
<i>Typ B</i>				
BHA-188s	AgA CCA gAg ggA AAC TAT gCC C	HA-Gen 188-209 nt	D38646	60
BHA-347as	CTg TCg TgC ATT ATA ggA AAg CAC	HA-Gen 324-347 nt		
BHA-307TM	F-ACC TCC ggC AAA AgC XTT CAA TAC TCC A-p	HA-Gen 273-299 nt		
Hantavirus				
<i>Dobrava</i>				
DOB-FP1s	Tgg CTT gAC CTC CCg Tg	S-Segment 750-766 nt	L41916	60
DOB-RP1as	CAA gCg CTC CTT gTC TTT gA	S-Segment 836-855 nt		
DOB-P1TM	F-ATC TCC AAC gTC TTT gAC CAA Agg CCC T-p	S-Segment 785-811 nt		
<i>Puumala 1</i>				
PUUFPunis	TAg TAg ACT CCT TgA ARA gCT RCT ACg A	S-Segment 4-31 nt	X61035	60
PUURP1as	ggg TCC ACT TCC ACT gCT	S-Segment 132-149 nt		
PUUP1TM	F-TgA CAg ATA TCC AAg Agg ATA TAA CCC gCC T-p	S-Segment 53-82 nt		
<i>Puumala 2</i>				
PUUP2TM	F-TgA CAg ACA TCC AAg Agg AgA TAA CCC gT T-p	S-Segment 53-80 nt	M32750	60
<i>Puumala 3</i>				
PUURP3as	gAg TTT Ytg TCT ggC AgC AA	S-Segment 98-117 nt	AJ223368	60
PUUP3TM	F-ACg AgA TAA CCC gCC ATg AAC AgC T-p	S-Segment 68-91 nt		
DNA-Viren				
Adenoviren				
AdVs	TgA TgC CgC AgT ggT CTT ACA TgC AC	Hexon-Gen 241-266 nt	Poddar,	68
AdVas	TCC AgC CCg Cgg ATg TCA AAg TA	Hexon-Gen 522-547 nt	1999	
HCMV				
CMVs	gCA gAg CTC gTT TAg TgA ACC	IE-Gen -21-(-2) nt	Olive et al.,	55
CMVas	ggC ACg ggg AAT CCg CgT TCC	IE-Gen 82-102 nt	1989	
Parvovirus B19				
B19s	CCT AgA AAA CCC ATC CTC TCT gTT	VP1/NS1-Region 2599-2622 nt	Donoso-M. et al.,	60
B19as	CCA ggC TTg TgT AAg TCT TCA CTA g	VP1/NS1-Region 2799-2775 nt	2004a	
B19TM	F-CCT CTA ggT TCT gCA TgA CTg CTA C Tgg A-p	VP1/NS1-Region 2729-2757 nt		

s, sense-Primer; as, antisense-Primer; TM, Sonde; F, FAM; T, TAMRA mit Thymidinen; p, 3'-Phosphat; nt, Nukleotidzahl; Acc. No., GenBank Accession number; Tm, Schmelztemperatur. IUB-Codes: Y= C/T; X= modifizierte Base; R= A/G.

2.2.4.1 Reverse-Transkriptase-Reaktion

Für den Nachweis von RNA-Viren ist vor der Amplifikation der Zielsequenz eine Reverse-Transkriptase-Reaktion (cDNA-Synthese) notwendig, um komplementäre DNA (cDNA) als geeignete Matrize für die Taq-Polymerase zu erhalten. Hierzu werden RNA-abhängige DNA-Polymerasen (Reverse-Transkriptasen) eingesetzt, die in der

Lage sind, RNA in DNA umzuschreiben. Diese kann in einem zweiten Schritt wieder in einer PCR-Reaktion eingesetzt werden. Auch ist es möglich, durch den Einsatz spezieller Polymerasen (z.B. Tth oder Tfl), beide Schritte zu kombinieren. Der Vorteil liegt im geringen Aufwand, doch ist die Empfindlichkeit größer, wenn man cDNA-Synthese und PCR getrennt durchführt.

Eine geringe Effizienz der RT-Reaktion kann zum Fehlen eines Amplifikationsproduktes in der nachfolgenden PCR führen. Durchschnittlich werden nur 10-30 % der ursprünglichen RNA-Moleküle in cDNA umgeschrieben. Deshalb muss die geringe Effizienz der RT-Reaktion durch eine hinreichende Menge an Ausgangsmaterial (0,5 bis 1 µg RNA) ausgeglichen werden.

Zum Umschreiben der RNA in einzelsträngige cDNA wurde in dieser Arbeit, je nach Untersuchung, einer von zwei verschiedenen Ansätzen gewählt: entweder RT-Ansatz I, hier wurde die RNA mit Zufallsoligodesoxynukleotiden (*random primers*), meist Hexameren, transkribiert; oder RT-Ansatz II, hier wurde spezifisch eine Zielsequenz mit Hilfe des antisense-Primers umgeschrieben (siehe Protokollschema auf der folgenden Seite):

RT-Ansätze zum Nachweis von RNA-Viren (Protokolle)	
Ansatz I (random primers)	Ansatz II (spezifischer Primer)
Arbeitsvolumen: 20 µl davon 12,5 µl RNA-Probe	Arbeitsvolumen: 10 µl davon 5 µl RNA-Probe
Zusammensetzung des RT-Mixes:	Zusammensetzung des RT-Mixes:
5x RT-Puffer 4,0 µl	Molekularwasser 1,0 µl
dNTPs [2,5 mM] 1,6 µl	5x RT-Puffer 2,0 µl
DTT [0,1 M] 0,5 µl	dNTPs [10 mM] 0,5 µl
random primers [25 µM] 0,4 µl	DTT [0,1 M] 0,5 µl
RNase-Inhibitor [40 U/µl] 0,5 µl	antisense-Primer [25 µM] 0,5 µl
SuperScript® II [200 U/µl] 0,5 µl	RNase-Inhibitor [40 U/µl] 0,25 µl
	M-MLV-RT [200 U/µl] 0,25 µl
Reaktionsbedingungen:	Reaktionsbedingungen:
<u>prä-cDNA-Synthese</u>	5 min bei der jeweils spezifischen Primer-Tm
RNA-Vorbehandlung 10 min bei 65 °C	20 min bei 37 °C
	5 min bei 95 °C
<u>cDNA-Synthese</u>	
60 min bei 37 °C	
5 min bei 93 °C	
Thermozykler: Biometra TRIO Thermoblock	Thermozykler: Biometra TRIO Thermoblock

cDNA-Synthesen mit random primers werden insbesondere dann angewendet, wenn lange RNA-Moleküle umgeschrieben werden sollen oder ein breiteres Untersuchungsspektrum an unterschiedlichen Zielsequenzen erwünscht ist. Die Reverse-Transkriptase aus dem Moloney-Maus-Leukämie-Virus (M-MLV-RT) ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase mit geringer RNase H-Aktivität. Ihr Arbeitsoptimum liegt bei 37 °C. Mit der modifizierten Form SuperScript® II, die keine intrinsische RNase H-Aktivität mehr besitzt, können längere Transkripte gewonnen werden. Beim Arbeiten mit Ansatz I ist vor der eigentlichen RT-Reaktion eine Vorbehandlung der RNA bei 65 °C ratsam, damit sich die RNA-Moleküle besser entfalten und dadurch die random primers später leichter daran hybridisieren können. Mit 95 °C wird die Reaktion gestoppt, und die entstandenen cDNA-Moleküle gehen vollständig von der RNA-Matrize ab.

2.2.4.2 Nachweis von Enteroviren mittels nested Reverse-Transkriptase-PCR

In der Diagnostik wird häufig die „verschachtelte“ PCR-Technik (nested PCR, nPCR) eingesetzt. Hier wird das Amplifikat einer ersten PCR-Reaktion wieder als Ausgangsmaterial in einer zweiten PCR eingesetzt, deren Produkt einen Ausschnitt des Produktes der ersten PCR darstellt. Die zweite PCR sichert als Bestätigungstest die Spezifität des Verfahrens, da hier mitunter die falschen Amplifikationsprodukte der ersten PCR ausselektiert werden. Gleichzeitig steigert die prä-Amplifikation der Zielsequenz die Sensitivität, so dass auch sehr geringe Templatemengen nachgewiesen werden können.

Nachdem die RNA aus den jeweiligen Myokardproben mit RT-Ansatz II unter Verwendung des entsprechenden antisense-Primers EV2 (siehe Tab. 5) umgeschrieben wurde, wurde die cDNA in einer nested PCR zum spezifischen Nachweis von Enteroviren eingesetzt:

Nested PCR zum Nachweis von Enteroviren aus cDNA (Protokoll)			
1. PCR		2. PCR (nested PCR)	
Arbeitsvolumen: 25 µl davon 5 µl cDNA-Probe		Arbeitsvolumen: 25 µl davon 2 µl Produkt der 1.PCR	
Zusammensetzung des PCR-Mixes:		Zusammensetzung des PCR-Mixes:	
Molekularwasser	14,4 µl	Molekularwasser	17,4 µl
10x Taq-Puffer	2,5 µl	10x Taq-Puffer	2,5 µl
MgCl ₂ [50 mM]	0,75 µl	MgCl ₂ [50 mM]	0,75 µl
dNTPs [2 mM]	1,25 µl	dNTPs [2 mM]	1,25 µl
Primer EV1s [25 µM]	0,5 µl	Primer EV5s [25 µM]	0,5 µl
Primer EV2as [25 µM]	0,5 µl	Primer EV80as [25 µM]	0,5 µl
Taq-Polymerase [5 U/µl]	0,1 µl	Taq-Polymerase [5 U/µl]	0,1 µl
Reaktionsbedingungen:		Reaktionsbedingungen:	
35 PCR-Zyklen	30 sec bei 94 °C	35 PCR-Zyklen	30 sec bei 94 °C
	30 sec bei 42 °C		30 sec bei 42 °C
	45 sec bei 72 °C		45 sec bei 72 °C
Finale Elongation	3 min bei 72 °C	Finale Elongation	3 min bei 72 °C
Thermozykler: Biometra TRIO Thermoblock		Thermozykler: Biometra TRIO Thermoblock	

Die Identifikation der PCR-Produkte wurde per Gelelektrophorese [Kap. 2.2.5] durchgeführt. Erwartet wurden für das Produkt der 1. PCR eine Fragmentgröße von 440 bp und für das Produkt der nested PCR eine Fragmentgröße von 340 bp. Als Kontrollen dienten aus Zellkultur isolierte RNAs, entweder von Echovirus 30 (Stamm 00-588/1 Rostock) oder (alternativ) Poliovirus Typ 3, die von der AG Dr. Schreier (RKI) bereitgestellt wurden. Die spezifische DNA der nested PCR wurde für eine Sequenzierungsreaktion [Kap. 2.2.7] und weiterer Typenbestimmung aus dem Gel später extrahiert.

2.2.4.3 Quantitative real-time RT-PCR für den Nachweis von Influenzaviren

Die Gesamt-RNA-Proben aus Myokardgewebe wurden für den Nachweis von Influenzaviren (Typ A und Typ B) unter Verwendung des RT-Ansatzes I umgeschrieben. Der TaqMan®-PCR-Assay war unter Verwendung der jeweils spezifischen Primer und Sonden (siehe oben Tab. 5, Seite 65) wie folgt:

Protokoll zum quantitativen real-time PCR-Nachweis für Influenzavirus-cDNA			
Assay-Zusammensetzung		Reaktionsbedingungen	
cDNA-Probe	2,5 µl	UDG-Behandlung	2 min bei 50 °C
10x Taq-Puffer+ROX	2,45 µl	Initiale Denaturierung	10 min bei 95 °C
dNUTPs [2,5 mM]	2,0 µl		
MgCl ₂ [25 mM]	4,0 µl	45 PCR-Zyklen	15 sec bei 95 °C
Primer (je 25 µM)	je 0,5 µl		60 sec bei 60 °C
Taq-Polymerase [100 U/µl]	0,25 µl	Thermozykler:	
Sonde [20 µM]	0,25 µl	ABI Prism® 5700 Sequence Detector	
UDG [100 U/µl]	0,25 µl	ABI Prism® 7700 Sequence Detector	
Molekularwasser	ad 25,0 µl		

Als positive Kontrollen wurden für die Influenzavirus-PCR RNA-Proben vom NRZ für Influenza (Dr. Schweiger, RKI) bereitgestellt. Dabei wurden jeweils die Stämme der jeweiligen Grippesaison berücksichtigt: Saison 2001/2002 (A/Beijing und B/Johannisburg), Saison 2002/2003 sowie Saison 2003/2004 (A/Moscow und B/HongKong).

Alle TaqMan[®]-Ansätze in dieser Arbeit wurden zuvor mit einer UDG-Reaktion als zusätzliche Kontaminationsvermeidung gestartet. Uracil-DNA-Glykosylase entfernt alle Uracil-Reste aus der Zuckerbindung von einzel- und doppelsträngiger DNA, ohne dass der Phosphodiester-Strang beschädigt wird. Auf diese Weise werden mögliche Uracil-haltige PCR-Produkte, die als Kontamination zuvor in den Ansatz gelangen konnten, für einen weiteren TaqMan[®]-PCR-Lauf als Matrize unbrauchbar gemacht. Nach Inaktivierung bei 95 °C kann anschließend die Amplifikationsreaktion unter Verwendung eines Uracil-haltigen Desoxynukleosidtriphosphat-Mixes erfolgen. Die Auswertung der PCR-Läufe erfolgte computergestützt mit der jeweiligen dem Thermozykler-Typ zugehörigen Software (Applied Biosystems).

2.2.4.4 Quantitative real-time RT-PCR für den Nachweis von Hantaviren

Die Gesamt-RNA-Proben aus Myokardgewebe wurden für den Nachweis von Hantaviren (Serotypen: Dobrava und Puumala) unter Verwendung des RT-Ansatzes I umgeschrieben. Der TaqMan[®]-PCR-Assay war unter Verwendung der jeweils spezifischen Primer und Sonden (siehe Tab. 5) wie folgt:

Protokoll zum quantitativen real-time PCR-Nachweis für Hantaviren-cDNA			
Assay-Zusammensetzung		Reaktionsbedingungen	
cDNA-Probe	2,5 µl	UDG-Behandlung	2 min bei 50 °C
10x Taq-Puffer+ROX	2,45 µl	Initiale Denaturierung	10 min bei 95 °C
dNUTPs [2,5 mM]	2,0 µl		
MgCl ₂ [25 mM]	4,0 µl	45 PCR-Zyklen	15 sec bei 95 °C
Primer (je 10 µM)	je 0,5 µl		30 sec bei 60 °C
Taq-Polymerase [100 U/µl]	0,25 µl	Thermozykler:	
Sonde [10 µM]	0,25 µl	ABI Prism [®] 5700 Sequence Detector	
UDG [100 U/µl]	0,25 µl	ABI Prism [®] 7700 Sequence Detector	
Molekularwasser	ad 25,0 µl		

Als positive Kontrollen und zur Sensitivitätsüberprüfung wurden für die Hantavirus-PCR Verdünnungen von *in vitro* transkribierten Standard-RNAs verwendet, die auf dem jeweiligen S-Fragment des Nucleocapsid-Gens beruhend hergestellt wurden. Die Standard-RNAs wurden freundlicherweise von Hr. Dr. M. Weidmann (Universitätsklinikum Freiburg) zur Verfügung gestellt.

2.2.4.5 PCR-Nachweis von Adenoviren

Für den Nachweis von Adenoviren wurde DNA aus Myokardproben mit folgendem PCR-Assay unter Verwendung der spezifischen Primer (siehe Tab. 5) untersucht (Bauer et al., 1991; Prösch et al., 2002):

Protokoll: PCR für Adenoviren-Nachweis			
Assay-Zusammensetzung		Reaktionsbedingungen	
DNA-Probe	300 ng	35 PCR-Zyklen	30 sec bei 95 °C
10x Taq-Puffer	5,0 µl		30 sec bei 55 °C
dNTPs	200 µM		60 sec bei 72 °C
MgCl ₂	4 mM		
Primer	je 25 pg		
Taq-Polymerase [100 U/µl]	2,5 U	Thermozykler:	
Molekularwasser	ad 50,0 µl	Biometra TRIO Thermoblock	

Die Identifikation des PCR-Produkts wurde per Gelelektrophorese [Kap. 2.2.5] durchgeführt. Erwartet wurde eine Fragmentgröße von 281 bp. Als Kontrolle diente aus Zellkulturüberständen isolierte DNA von Adenovirus Serotyp 5.

2.2.4.6 PCR-Nachweis von HCMV

Für den Nachweis des HCMV wurde DNA aus Myokardproben mit folgendem PCR-Assay unter Verwendung der spezifischen Primer (siehe Tab. 5) untersucht (Bauer et al., 1991; Prösch et al., 2002):

Protokoll: PCR für HCMV-Nachweis			
Assay-Zusammensetzung		Reaktionsbedingungen	
DNA-Probe	300 ng	35 PCR-Zyklen	30 sec bei 95 °C
10x Taq-Puffer	5,0 µl		30 sec bei 55 °C
dNTPs	200 µM		60 sec bei 72 °C
MgCl ₂	4 mM		
Primer	je 50 pg		
Taq-Polymerase [100 U/µl]	2,5 U	Thermozykler:	
Molekularwasser	ad 50,0 µl	Biometra TRIO Thermoblock	

Die Identifikation des PCR-Produkts wurde per Gelelektrophorese [Kap. 2.2.5] durchgeführt. Erwartet wurde eine Fragmentgröße von 123 bp. Als Kontrolle diente aus Zellkulturüberständen isolierte DNA von HCMV (Stamm AD 169).

2.2.4.7 Quantitativer PCR-Nachweis von Parvovirus B19

Die hier verwendeten Primer- und Sondensequenzen (siehe Tab. 5) wurden in Kooperation mit Hr. Dr. A. Nitsche (ZBS-1, RKI) nach generellen Maßstäben für das Primer- und Sondendesign zu real-time PCR-Zwecken computergestützt ausgewählt. Folgendes Assay wurde für den Nachweis von PVB19-DNA in Myokardproben etabliert und angewendet (Donoso Mantke et al., 2004a):

Protokoll zum quantitativen real-time PCR-Nachweis für PVB19			
Assay-Zusammensetzung		Reaktionsbedingungen	
DNA-Probe	2,5 µl	UDG-Behandlung	2 min bei 50 °C
10x Taq-Puffer+ROX	2,45 µl	Initiale Denaturierung	10 min bei 95 °C
dNUTPs [2,5 mM]	2,0 µl		
MgCl ₂ [25 mM]	4,0 µl	45 PCR-Zyklen	15 sec bei 95 °C
Primer (je 25 µM)	je 0,5 µl		60 sec bei 60 °C
Taq-Polymerase [100 U/µl]	0,5 µl	Thermozykler:	
Sonde [20 µM]	0,25 µl	ABI Prism [®] 5700 Sequence Detector	
UDG [100 U/µl]	0,5 µl	ABI Prism [®] 7700 Sequence Detector	
Molekularwasser	ad 25,0 µl		

Zur Etablierung der Methode wurden für die Sensitivitätsüberprüfung Verdünnungen des pPVB19-CR2.1T-Plasmids (Genexpress, Berlin) angewendet, die zuvor mit Hilfe des WHO Internationalen PVB19 DNA-Standards (99/800, NIBSC) eingestellt und überprüft wurden. Die Spezifität der Methode wurde mit Nicht-PVB19-Kontrollen der anderen viralen Erreger überprüft. Zur Inhibitionsüberprüfung wurden PVB19-negative Myokardlysate mit 100 µl 10-fach-Verdünnungen Plasmid-DNA gespickt. Außerdem wurden als klinische Negativkontrollen DNA-Proben von 50 gesunden Blutspendern verwendet, die zuvor aus Heparin-Plasma-Proben mit Hilfe des QIAamp[®] DNA Blood Kit (Qiagen) gemäß Herstellerangaben isoliert wurden.

2.2.4.8 Quantitativer Nachweis von zellulären Referenzgennukleinsäuren

Die Detektion von Nukleinsäuren sog. Haushaltsgene (*housekeeping genes*) dient zum einem als Nachweis dafür, dass die Probenaufarbeitung qualitativ gut war und inhibitorische Effekte für mögliche negative PCR-Resultate nicht verantwortlich waren. Zum anderem dient der Nachweis als externer Standard, um die Menge an spezifischem Produkt auf das Referenzgen beziehen zu können, dessen Menge man für eine Konstante hält. Aufgrund der unterschiedlichen Regulierung dieser Gene in den Zellen können unterschiedliche Werte in den verschiedensten Geweben nachgewiesen werden. I.d.R. nimmt man mehr als ein Referenzgen als externen Standard und wenn möglich solche, die mehr oder weniger in den verschiedensten Geweben konstant exprimiert werden. Mit human β -Aktin, GAPDH und RNA-Polymerase II (RPII) als Referenzgene wird ein großes Nachweisspektrum von in Myokardgewebe schwach bis stark präsenten Nukleinsäuren abgedeckt. Das folgende quantitative PCR-Assay wurde für die jeweiligen Referenzgen-Nachweise unter Beachtung der jeweils spezifischen Schmelztemperatur der Primer und Sonden (Aktin: 65 °C; GAPDH: 65 °C; RPII: 67 °C) verwendet:

Protokoll zum quantitativen real-time PCR-Nachweis für Referenzgene (β -Aktin, GAPDH und RPII)

Assay-Zusammensetzung		Reaktionsbedingungen	
cDNA-Probe	2,5 μ l	UDG-Behandlung	2 min bei 50 °C
10x Taq-Puffer+ROX	2,45 μ l	Initiale Denaturierung	10 min bei 95 °C
dNUTPs [2,5 mM]	2,0 μ l		
MgCl ₂ [25 mM]	4,0 μ l	45 PCR-Zyklen	20 sec bei 95 °C
Primer (je 10 μ M bei Aktin u. RPII, je 25 μ M bei GAPDH)	je 0,5 μ l		30 sec bei spezifischer T _m
Taq-Polymerase [100 U/ μ l]	0,25 μ l		
Sonde [10 μ M]	0,25 μ l	Thermozykler:	
UDG [100 U/ μ l]	0,25 μ l	ABI Prism [®] 5700 Sequence Detector	
Molekularwasser	ad 25,0 μ l	ABI Prism [®] 7700 Sequence Detector	

Für die Erstellung der jeweiligen Standardkurven wurden Verdünnungen von entsprechenden kommerziellen Standard-Plasmiden (Genexpress, Berlin) verwendet (siehe Materialliste).

2.2.5 Agarosegelelektrophorese zur Nukleinsäurencharakterisierung

Die Gelelektrophorese ermöglicht nicht nur eine optische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren mit Hilfe eines Nukleinsäuren-Längenstandards (Größenmarker) bekannter Konzentration durch Vergleich der Bandenstärken, sondern auch die Identifizierung von PCR-Produkten durch größenspezifische Auftrennung der Amplifikate. Trägt man ein Gemisch unterschiedlich großer Nukleinsäure-Fragmente auf ein Agarosegel auf und legt man dann ein elektrisches Feld an, so wandern die Nukleinsäuren aufgrund ihrer negativen Ladung zur Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist dabei umgekehrt proportional zum Logarithmus der Größe der jeweiligen Fragmente und diese bestimmt die einzusetzende Agarosekonzentration sowie die elektrischen Parameter.

In Abhängigkeit von der Größe der aufzutrennenden Nukleinsäuren wurde Agarose in einer Konzentration von 0,5 bis 3,0 % (w/v) in Elektrophoresepuffer verwendet. Als Elektrophoresepuffer diente 1x TBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA); dieser wurde gegenüber TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA) aufgrund seiner höheren Pufferkapazität bevorzugt, da dies eine schnellere Elektrophorese bei höherer Spannung erlaubt, ohne dass das Gel dabei schmilzt. Dem Elektrophoresepuffer wurde Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 200 ng/ml zugesetzt. Den Proben wurden vor dem Auftragen 0,1 Volumen Gel-Beladungspuffer zugegeben. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte für 30-60 min bei einer Spannung von 80-110 V. Der Elektrophoreseverlauf konnte anhand des Bromphenolblaus im Beladungspuffer verfolgt werden.

Das im Gel befindliche Ethidiumbromid interkaliert zwischen den benachbarten Basenpaare doppelsträngiger DNA oder bindet an die in zellulären bzw. Gesamt-RNA-Präparationen enthaltenen ribosomalen RNA-Moleküle und emittiert bei UV-Anregung Licht. So können die einzelnen Nukleinsäure-Banden auf dem Gel im UV-Licht (312 nm) sichtbar gemacht werden. Mittels geeigneter Größenmarker (z.B. 100 bp-Leiter oder 28-S- und 18-S-rRNA-Marker) konnte die Größe und/oder Konzentration der jeweiligen Nukleinsäure-Fragmente abgeschätzt werden. Zur Dokumentation der abgeschlossenen Elektrophorese wurde das Gel auf einem UV-Tisch mit einer Sofortbildkamera fotografiert.

Die Agarosegelelektrophorese wurde auch zur präparativen Isolierung doppelsträngiger DNA-Fragmente eingesetzt.

2.2.6 Präparation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur DNA-Isolierung aus Agarosegelen wurde der QIAquick[®] Gel-Extraction Kit (Qiagen) verwendet. Das gewünschte DNA-Fragment wurde aus dem Agarosegel mit einem Skalpell sauber herausgeschnitten, in ein Reaktionsgefäß überführt und das Gewicht des Gelstückchens bestimmt. Nach Zugabe des dreifachen Volumens (v/w) an QA-Extraktionspuffer zum Ansatz wurde für 10 min bei 50 °C bis zum vollständigen Schmelzen der Agarose inkubiert. Bei DNA-Fragmenten kleiner als 400 bp wurde dem Ansatz ein Volumen (v/w) Isopropanol p.A. hinzugefügt. Der Ansatz wurde dann auf eine Silikagelmembran-Säule gegeben. Die weitere Vorgehensweise erfolgte gemäß Herstellerangaben. Die benötigten Puffer und Verbrauchsmaterialien waren in dem Kit enthalten.

2.2.7 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzanalyse von DNA wurde in modifizierter Form nach der „Dideoxy“-Methode (Sanger et al., 1977) durchgeführt. Die Methode beruht auf der enzymatisch katalysierten Synthese von DNA-Strängen, welche zu dem zu sequenzierenden DNA-Strang komplementär sind. Für die Synthesereaktion werden neben den vier Desoxyribonukleotidtriphosphaten (dNTPs) auch Dideoxyribonukleotidtriphosphate (ddNTPs) eingesetzt, welche bei Einbau einen Kettenabbruch bewirken. Es entstehen so Fragmente verschiedener Länge mit einem gemeinsamen Startpunkt (5'-Ende) und einem ddNTP am 3'-Ende. Die ddNTPs sind je nach Base mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen konjugiert. Die Auftrennung der Fragmente in einer Gelelektrophorese zeigt eine Leiter, anhand derer die Sequenz der jeweiligen Basen ermittelt werden kann.

In dieser Arbeit wurde zur Erzeugung und Markierung der PCR-Fragmente das ABI PRISM[®] Big Dye[®] Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Bio-

systems) verwendet. Die Anwendung dieses Kits erlaubt, aufgrund der unterschiedlich markierten ddNTPs, den Ansatz der Sequenzierungsreaktion in einem Reaktionsgefäß durchzuführen. Die Analyse erfolgt dann in einer einzigen Spur eines Polyacrylamidgels oder in einer Kapillarelektrophorese.

Zur Sequenzierung wurden 30 bis 100 ng PCR-Produkt mit 5 pmol des verwendeten Primers, 3 µl Big Dye[®] Premix (mit allen hierfür notwendigen Reagenzien) und Molekularwasser ad 10 µl Endvolumen eingesetzt. Die Sequenzierungsreaktion erfolgte in einem Thermozykler (Biometra T Gradient) unter folgenden Bedingungen: Initiale Denaturierung für 2 min bei 96 °C; 25 Zyklen: Denaturierung für 10 sec bei 96 °C, Annealing für 5 sec bei Primer-spezifischer Schmelztemperatur und Elongation für 4 min bei 60 °C.

Die Sequenzierungsansätze wurden nach der Reaktion durch Gelfiltration aufgereinigt und die Proben anschließend in einem Kapillarelektrophorese-Sequenzierautomaten aufgetrennt. Die computergestützte Auswertung von Sequenzdaten erfolgte mit den Programmen BioEdit, SeqMan[®] II und BLAST.

2.2.8 *In situ*-Hybridisierung von Myokardgewebeschnitten

Zur Bestätigung einiger ausgewählter PCR-Befunde wurde die *in situ*-Hybridisierung (ISH) als eine zusätzliche Methode verwendet, die die Möglichkeit eröffnet, Nukleinsäuresonden in Geweben, Zellen, Zellkernen und sogar in Chromosomen sichtbar zu machen. Damit lässt sich eine Zielnukleinsäure gewissermaßen *in vivo* lokalisieren (Leitch et al., 1994). Neben dem Nukleinsäurenachweis (DNA oder RNA) von viralen Erregern in Myokardproben stellt die ISH den Befund gleichzeitig auch in einem histologischen Kontext dar. Nach der Präparation des biologischen Materials markiert man durch Einbau eines radioaktiven oder nicht-radioaktiven Markers eine Nukleinsäuresequenz. Sowohl die hierfür verwendete Sonde als auch das biologische Material werden anschließend denaturiert, damit alle Nukleinsäuren einzelsträngig vorliegen. Unter kontrollierten (stringenten) Bedingungen hybridisiert dann die einzelsträngige Sonde mit einer komplementären einzelsträngigen Zielnukleinsäuresequenz des biologischen Präparats. Das neu gebildete doppelsträngige Molekül

lässt sich aufgrund seiner Markierung nachweisen und die Stelle, an der die Hybridisierung stattgefunden hat, durch mikroskopische Verfahren sichtbar machen. Die Nachweismethode hängt von der Markierung der Sonde ab (z.B. Autoradiographie bei radioaktiv markierten Sonden, Avidin- oder Antikörpernachweis bzw. FISH bei nichtradioaktiv markierten Sonden). In dieser Arbeit wurde der Nachweis durch die AG Prof. Kandolf (Universität Tübingen) mittels ISH mit radioaktiv markierten Sonden durchgeführt.

Myokardproben gleicher Herzlokalisierung wurden am DHZB in 4 %-iger Formalinlösung zur Konservierung von Gewebestrukturen sowie Stabilisierung von zellulärer RNA und DNA fixiert [Kap. 2.2.9]. Insbesondere wenn Proben für RNA-ISH aufgearbeitet werden, sollte man besondere Vorsichtsmaßnahmen gegen RNase-Aktivitäten, ähnlich wie bei der PCR, bei allen Arbeitsschritten treffen. Nach Entwässerung in einer aufsteigenden Ethanolreihe (30 bis 100 %) wurden die fixierten Proben in Paraffin eingebettet. Mit einem Mikrotom wurden 5 µm dicke Schnitte angefertigt, auf einen nicht-beschichteten Objektträger aufgezogen und für den weiteren Nachweis verschickt. Die ISH erfolgte mit ³⁵S-Isotop-markierten antisense-RNA-Sonden (Ribosonden), die *in vitro* von einem virussequenzspezifischen Vektor in Gegenwart radioaktiv markierter und unmarkierter Nukleotide transkribiert wurden (Einsele et al., 1989; Klingel et al., 1992; Klingel, 2002; Bültmann et al., 2003). Nach der Permeabilisierung der zuvor quervernetzt fixierten Schnitte (z.B. durch Proteinase K-Behandlung), stringenter Hybridisierung und dem Waschen wurden die Objektträger für die Autoradiographie mit einer strahlungssensitiven Emulsion beschichtet und getrocknet. Die Schwärzung des Autoradiogramms entsteht durch die Wechselwirkung von β-Partikeln, die das Isotop ausstrahlt, mit Atomen in der Emulsion. Hierbei werden Silberhalogenide in der Emulsion zu metallischem Silber reduziert, und es entsteht eine unsichtbare Aufzeichnung, die mit gängigen photographischen Methoden entwickelt und fixiert werden kann. Die Silberkörner sind später im Durchlichtmikroskop durch einen roten Filter sichtbar. Man geht davon aus, dass das Zentrum einer Gruppe von Silberkörnern die Stelle repräsentiert, an der eine Sonde hybridisiert hat. Wie deutlich sich die Silberkörner abzeichnen, hängt von der Emissionsenergie des eingesetzten Isotops ab. Die Entwicklung der Photoemulsion mit ³⁵S dauerte drei Wochen. Anschließend wurden die Schnitte mit Hämatoxylin-Eosin (HE) angefärbt, um histologische Strukturen des Präparats sichtbar zu machen.

2.2.9 Histopathologische Bewertung der Explantate

Im Rahmen der Arbeiten des Homograftlabors (AG Prof. Meyer) am DHZB wurden routinemäßig die hier untersuchten Explantate qualifiziert und standardisiert, histomorphologisch untersucht und anschließend bewertet. Diese Daten wurden zum Vergleich mit den PCR-Befunden herangezogen.

Nach Abschluss der jeweiligen Präparationen wurde das gesamte Herz in 4 %-iger, neutraler, gepufferter Formalinlösung bei RT für mindestens 12 Stunden vor der standardisierten Probenentnahme fixiert. Myokardproben gleicher Lokalisationen wie für die PCR-Diagnostik (LVVW, LVHW, RV und Septum) wurden mit einer Kantenlänge von 10 mm herausgeschnitten. Des Weiteren wurden aus den zentralen Abschnitten der Koronararterien jeweils 5 mm große, alle Wandschichten der Koronararterien umfassende Proben entnommen. Zum Probenumfang gehörte letztendlich auch eine Probenentnahme aus dem supra-valvulären Anteil der *Aorta ascendens* und der *Arteria pulmonalis*. Alle Proben wurden zunächst entwässert und anschließend in Paraffin eingebettet. Für die Anfertigung eines Präparats wurden jeweils 1 bis 3 µm dicke Schnitte auf mit aktiviertem 3-Aminopropyltriethoxy-Silan (APES) beschichteten Objektträgern gezogen, um die Haftung des Schnittpräparats zu verbessern. Nach Entparaffinierung in Xylol und Rehydrierung in einer absteigenden Ethanolreihe (90 bis 70 % und aq. dest.) wurden die Schnitte verschiedenen Färbetechniken unterzogen: Übersichtsfärbung HE, verschiedene Färbungen für Bindegewebe und elastischen Strukturen, Färbung interstitieller Strukturen im Myokard.

Mit Hämatoxilin-Eosin (HE) als Übersichtsfärbung werden saure Moleküle im Schnitt durch das Hämatoxilin dargestellt, so dass die Kerne (aber auch saure Schleimsubstanzen, Bakterien und Kalk) blau erscheinen. Das Zytoplasma der Zellen, Kollagen und proteinhaltige Lösungen werden nuanciert rot angefärbt. Mit der HE-Färbung der Präparate lassen sich die meisten diagnostischen Fragestellungen beantworten. Zur Darstellung von bindegewebigen bzw. elastischen Strukturen wird für die Myokardproben Siriusrot verwendet; für die Koronararterien und die Aorta bzw. die *Arteria pulmonalis* die Elastica-van-Gieson-Färbung benutzt, mit der Kollagen rot dargestellt wird. Die Beurteilung der elastischen Fasern ist wichtig insbesondere bei der

Diagnostik von größeren Blutgefäßen. Weitere wichtige Spezialfärbungen für die Gefäße sind die purpurrote PAS-(Perjodsäure-Schiffsches Reagens-)Färbung sowie die Alzianblau-Färbung zur Darstellung von sauren Mucopolysacchariden. Darüber hinaus wird zur Sicherstellung von frischen Myozytolysen im Myokard eine modifizierte Fibrindarstellung mittels Domagk-Färbung angefertigt.

Die histologische Untersuchung wurde mit einem Durchlichtmikroskop durchgeführt, hierbei wurden folgende Parameter/Fragestellungen nach einem einheitlichen Graduierungsstandard bewertet (Donoso Mantke et al., 2003):

1. Beurteilung der Größen und Kaliberunterschiede der Herzmuskelzellen sowie ihre Verteilung einschließlich der Bewertung möglicher Störungen der Myokardarchitektur.
2. Bewertung der Größe und Form der Herzmuskelzellkerne.
3. Erfassung des Ausmaßes und der Verteilung einer Fibrose sowie möglicher Narben.
4. Beurteilung der Qualität der Endothelzellen und
5. Bewertung der Wandveränderungen der Blutgefäße, insbesondere im Bereich der terminalen Strombahn.
6. Nachweis bzw. Ausschluss pathologischer Veränderungen wie Zeichen einer Myokarditis (Abb. 10a), Folgen einer koronaren Herzkrankheit, Hinweiszeichen für Kardiomyopathie oder Schäden im Rahmen der Spenderkonditionierung (Abb. 10b).

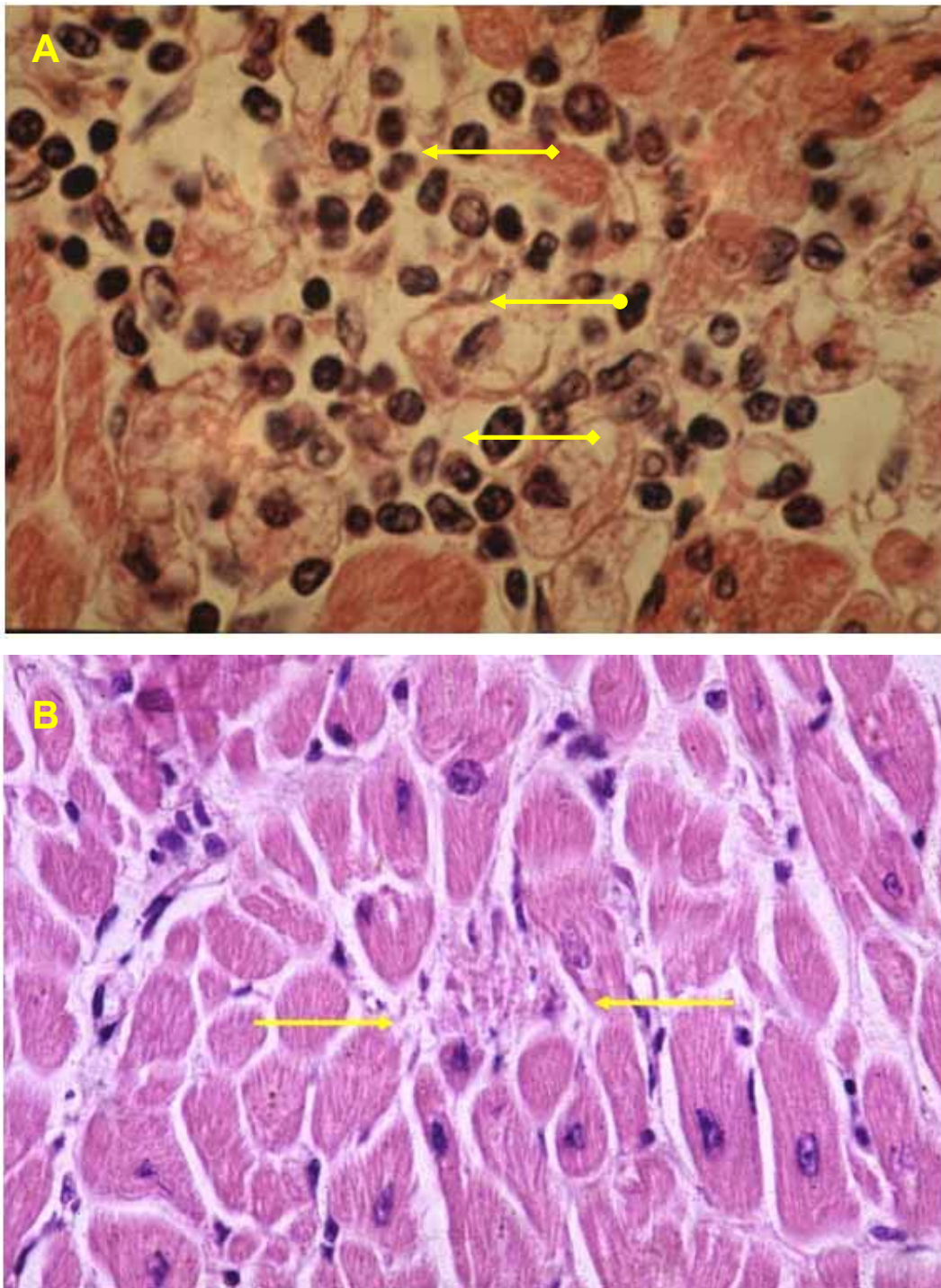


Abbildung 10: Exemplarische Darstellungen pathologischer Veränderungen, die zur Ablehnung eines Spenderorgans führen würden.

A Floride rundzellige Myokarditis (Pfeil mit Rautenmarkierung: lymphozytäre Infiltrate; Pfeil mit Kreismarkierung: nekrotische Myozyte). **B** Einzelzellnekrose durch Konditionierungsschaden (durch Pfeile markiert). Vergrößerung ca. 300x.

Bilder: AG Prof. R. Meyer, DHZB

Das Ergebnis der jeweiligen histologischen Untersuchungen wurde in Form einer Diagnose für alle untersuchten Myokardproben sowie für das gesamte Herz in einem Befundbericht zusammengefasst. Abschließend erfolgte eine Bewertung über die Verwendbarkeit der Homografts.

2.2.10 Serologische Untersuchungen mittels ELISA

Mit Hilfe indirekter Nachweismethoden von Virusinfektionen kann die Immunreaktion, die sich während der Infektion gegen die jeweiligen Erreger ausbildet, bestimmt werden. Man weist dabei im Serum der Patienten Antikörper nach, die spezifisch an definierte Virusproteine binden. IgM-Antikörper weisen darauf hin, dass es sich um eine akute oder erst kürzlich erfolgte Infektion handelt. IgG-Antikörper lassen hingegen auf eine länger zurückliegende, bereits abgelaufene Infektion schließen. Vor allem für die Diagnostik akuter Infektionen ist es wichtig, dass man die Konzentration der IgM- bzw. IgG-Antikörper im Infektionsverlauf bestimmt. Die Antikörper lassen sich mit ELISA-, Immunfluoreszenz- [siehe Kap. 2.2.14] oder Western Blot-Tests nachweisen.

Beim herkömmlichen ELISA-(*enzyme linked immunosorbent assay*-)Test wird das Antigen, d.h. bestimmte Virusproteine oder –partikel, vorgegeben, welches an die Mikrotiterplatten gebunden ist. Die Patientenserum, in denen die fraglichen Antikörper nachgewiesen werden sollen, werden in die Vertiefungen der Mikrotiterplatten pipettiert. Die in den Proben vorhandenen Antikörper binden an das Antigen. Nach sorgfältigem Waschen, bei dem alle nicht gebundenen Serumbestandteile entfernt werden, werden zur Nachweisreaktion Peroxidase-gekoppelte, sekundäre Antikörper hinzugegeben, die spezifisch den Fc-Anteil von menschlichen IgM oder IgG erkennen und daran binden. Im anschließenden Waschvorgang wird überschüssiges Konjugat entfernt. Durch Zugabe des chromogenen Substrats Tetramethylbenzidin (TMB) entsteht eine blaue Farbreaktion, die durch Abstoppen mit einer Säurelösung (Citrat, Phosphat oder Sulfat) nach gelb umschlägt und photometrisch gemessen wird. Der Absorptionswert ist proportional zu der in der Probe enthaltenen Konzentration an spezifischen Antikörpern.

In dieser Arbeit wurden, sofern vorhanden, Patientenseren mittels kommerzieller ELISA-Tests auf Präsenz von Antikörpern gegen Enteroviren (Genzyme Virotech), Adenoviren (BAG) oder Parvovirus B19 (Mikrogen) getestet. Die einzelnen Arbeitsschritte wurden nach Vorschrift des Herstellers durchgeführt. Die benötigten Puffer und Verbrauchsmaterialien waren in den jeweiligen Kits enthalten. Die photometrische Bestimmung erfolgte unmittelbar nach Abstoppen der Reaktion bei 450 nm in einem Mikrotiterplattenphotometer (SLT Laborinstruments Austria) und wurde gegen den Substrat-Leerwert gemessen.

Die serologischen Befunde wurden mit den PCR- und histopathologischen Befunden verglichen. Für den Serostatus auf HCMV wurden die Patientendaten vom DHZB eingesehen.

2.2.11 Zellkultur, Stammhaltung und Zellzahlbestimmung

Für die Virusanzucht und Infektionsstudien von Ljunganviren wurden unterschiedliche adhärente Zelllinien verwendet: Vero-B4, BHK-21, 3T3, Mv 1 Lu, CHO und LTK. Die Haltung der Mykoplasmen-freien Zellen erfolgte in Kulturflaschen verschiedener Größen bei 37 °C in einem mit 5 % CO₂ begasten Feuchtbrutschrank. Als Kulturmedien wurden RPMI 1640-Fertigmedium oder DMEM unter Zusatz von 10 % fötales Kälberserum (FKS), 1% Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin und (im Falle von DMEM) 2% nicht-essentielle Aminosäuren eingesetzt. Alle vier Tage erfolgte ein Mediumwechsel. Zum Passagieren wurde das Kulturmedium entfernt, der Zellrasen mit Diluent und Trypsinlösung gewaschen und für ca. 10 min bei 37 °C bis zum Ablösen der Zellen inkubiert. Die Zellen wurden anschließend in Kulturmedium resuspendiert, im Verhältnis 1:10 verdünnt und in neue Kulturgefäße überführt. In der Regel wurden die Zellen je nach Dichte zwei Mal pro Woche passagiert. Hierzu wurde das Zellwachstum regelmäßig unter dem Invert-Mikroskop (10er Okular) kontrolliert.

Für das Einfrieren von Zellen (Stammhaltung) wurden die Zellen einer konfluent bewachsenen großen Zellkulturflasche (175 cm³) mit Medium gewaschen, abtrypsinisiert und in 10 ml frischem Medium aufgenommen. Die Zellen wurden anschließend bei 800 UpM in einer Eppendorf-Zentrifuge 5403 für 10 min zentrifugiert. Die pelletierten

Zellen wurden nachfolgend mit 5 ml Freeze-Mix resuspendiert, in Kryoröhrchen aliquotiert und für eine Woche bei -80 °C eingefroren. Danach erfolgte die Lagerung der Zellen in flüssigem Stickstoff. Für das Auftauen von eingefrorenen Zellen wurde ein Kryoröhrchen aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und sofort in warmes Wasser gehalten. Anschließend wurde die aufgetaute Zellsuspension in eine Kulturflasche (i.d.R. 25 cm³) pipettiert, mit frischem Medium aufgefüllt und bei 37 °C im CO₂ begasten Brutschrank kultiviert.

Die Zellzahlbestimmung erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (Rich, 1977). Hierfür wurden 10 µl einer 1:10 verdünnten Zellsuspension unter ein Deckgläschen auf die Zählkammer aufgebracht und 4 Eckquadrate ausgezählt (Volumen 0,4 µl). Die Zellzahl (N) wurde gemittelt und auf die Zellsuspension bezogen folgendermaßen berechnet:

$$N \times 1,0/0,1 = N \times 10 = N' \text{ (Zellzahl in 1 } \mu\text{l Zellsuspension)}$$

$$N' \times 1000 = N \times 10^4 \text{ (Zellzahl in 1 ml Zellsuspension)}$$

$$\text{Also: } N \times 10^4 = \text{Zellzahl/ ml Zellsuspension}$$

2.2.12 Anzucht von Ljunganviren

Für die Infektionsstudien von Ljunganviren wurden Virusstocks verschiedener Stämme hergestellt: LV 87-012, LV 174F, LV 145SL, LV 342SL, M-1146 und NY 64-7855. Dafür wurden adhärente Zellen zunächst mit Virusüberständen, die freundlicherweise von Hr. Dr. Dr. B. Niklasson (Apodemus AB, Stockholm) zur Verfügung gestellt wurden, in kleinen Kulturflaschen (25 cm³) infiziert. Nachdem die infizierten Zellen konfluent gewachsen waren, wurden sie auf größere Flaschen umgesetzt und so lange kultiviert, bis auch diese konfluent zugewachsen waren. Um nun das Virus sowohl aus dem Überstand als auch aus den Zellen zu isolieren, wurden die bewachsenen Flaschen bei -20 °C gelagert. Sobald das Medium eingefroren war, wurden die Flaschen aus dem Gefrierfach entnommen und bei RT angetaut. Mit dem angetauten,

noch vereisten Medium wurde durch Schütteln der Flaschen ein Aufschließen der Zellen erreicht. Nach völligem Auftauen des Mediums wurden die Flaschen erneut eingefroren und der Vorgang insgesamt dreimal wiederholt. Nach Beendigung des Aufschlussvorganges wurde die Zellsuspension in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und zweimal für 30 min bei 1000 UpM in einer Eppendorf-Zentrifuge 5403 zentrifugiert, um die Zellrückstände zu entfernen. Danach erfolgte eine UZF mit einem SW28 Rotor (25000 UpM; 1,5 h; 4 °C). Die Überstände wurden verworfen und das Viruspellet in 250 µl Medium aufgenommen.

2.2.13 Bestimmung des Virustiters verschiedener LV-Stämme und Infektionsstudien in Zellkultur

Da Ljunganviren schlecht sichtbare Plaques bilden, wurde die Virusmenge einer vorhandenen Suspension in einer Zellkultur titriert und als TCID₅₀ (*median tissue culture infectious dose*) nach der Methode von Reed und Munch (Burkhardt, 1992) berechnet. Die TCID₅₀ gibt die Verdünnung (Titer) eines Virus in einer Suspension an, die erforderlich ist, um 50 % der vorhandenen Zellkultur zu infizieren. D.h., diese Einheit gibt an, in welcher errechneten Verdünnung noch im Mittel ein infektiöses Partikel pro Volumeneinheit vorhanden ist, die im Testsystem zur vollständigen Zerstörung des Zellrasens – also zu einer Alles-oder-Nichts-Reaktion führt. Die Methode erlaubt eine Rückrechnung zur unverdünnten Virussuspension. Zur Vorbereitung der Virustiterbestimmung wurde eine 96er-Lochplatte drei Tage vor der Viruszugabe mit ca. 5×10^5 Zellen/ml (0,1 ml pro Vertiefung) ausgesät. Nachdem die Zellen zu etwa 60 % konfluent gewachsen waren, wurden sie mit verschiedenen Virusverdünnungen infiziert, wobei eine Reihe mit Zellen auf der Lochplatte jeweils als Negativkontrolle uninfiziert blieb. Hierzu wurden Verdünnungsreihen des jeweils zu untersuchenden Virus in 10er-Schritten angesetzt und je Verdünnungsstufe mindestens vier Parallelansätze mit 0,1 ml Probe pro Vertiefung in die Lochplatte hinzugegeben. Im Verlauf der Kultivierung der Lochplatten bei 37 °C und 5 % CO₂ wurden die infizierten Zellkulturen auf das Vorhandensein und das Ausmaß eines zytopathischen Effekts (CPE) – Änderung der Zellform von spindel- zu kugelförmig mit einhergehender Dunkelfärbung sowie Ablösung der Zellen vom Zellrasen – über ca. 7 Tage bis zur vollständigen Zerstörung des Zellrasens (Endverdünnungsmethode)

beobachtet. Die Titerhöhe in TCID₅₀/ml wurde mit Hilfe einer Tabellenkalkulation folgendermaßen berechnet:

Beispiel zur Berechnung der TCID₅₀ nach Reed und Münch -

Kumulative Werte							
Infektion							
Virus- verdünnung (A)	Infektions- verhältnis (B)	infizierte Kulturen (C)	nicht inf. Kulturen (D)	Spalte C kumulativ (E)	Spalte D kumulativ (F)	Verhältnis (G)	Prozent (H)
10 ⁻¹	6/6	↑ 6	0	17	0	17/17	100
10 ⁻²	6/6	6	0	11	0	11/11	100
10 ⁻³	4/6	4	2	5	2	5/7	71
10 ⁻⁴	1/6	1	5	1	7	1/8	13
10 ⁻⁵	0/6	0	↓ 6	0	13	0/13	0

A: 10er-Verdünnungsreihe im Sechsfach-Ansatz (mindestens Vierfach-Ansatz notwendig)

B: Das Infektionsverhältnis entspricht dem Verhältnis der Anzahl infizierter Kulturen/ Gesamtzahl der inokulierten Kulturen bei der jeweiligen Virusverdünnung. Eine Kultur wird bei der Endablesung als „nicht-infiziert“ angesehen, wenn die Zellen keinen CPE anzeigen, und als „infiziert“, wenn sie mindestens einen schwachen CPE aufweisen.

CPE-Bewertungsskala:

+ = schwacher CPE; ++ = mittelstarker CPE (ca. 50% der Zellen zytopathisch verändert);
+++ = starker CPE (alle Zellen zytopathisch verändert)

C: Anzahl der infizierten Kulturen bei der jeweiligen Virusverdünnung

D: Anzahl der nicht-infizierten Kulturen bei der jeweiligen Virusverdünnung

E: kumulative Werte bezogen auf Spalte C (Addition in Pfeilrichtung)

F: kumulative Werte bezogen auf Spalte D (Addition in Pfeilrichtung)

G: kumulative Werte für die Infektionsverhältnisse bei den jeweiligen Virusverdünnungen, bezogen auf die Spalten E und F

H: kumulative Infektionswerte in Prozent bei den jeweiligen Virusverdünnungen, bezogen auf die Spalte G (Wo liegt in ungefähr der 50%-Wert ?)

Zur Berechnung des genaueren Wertes muss der „proportionale Abstand“ (P.A.) ermittelt werden:

$$P.A. = \frac{(\% \text{ Infektion bei Verdünnung unmittelbar über } 50\%) - (50\%)}{(\% \text{ Infektion bei Verdünnung unmittelbar über } 50\%) - (\% \text{ Infektion bei Verdünnung unmittelbar unter } 50\%)}$$

Der P.A.-Wert ist zu korrigieren, indem er mit dem Logarithmus des Faktors multipliziert wird, der für die Verdünnungsreihe gewählt wurde [z.B. bei 10er-Verdünnungsreihen ist der Faktor 1 ($\log 10 = 1$)].

Beispielrechnung:

Bei einem Sechsfach-Ansatz mit den Verdünnungsstufen 10^{-1} - 10^{-5} , bei dem am Ende aus der Spalte H abgelesen wird, dass der 50%-Wert zwischen 10^{-3} (71 % Infektion) und 10^{-4} (13 % Infektion) liegt, errechnet sich der P.A. folgendermaßen:

$$71 - 50 / 71 - 13 = 21 / 58 = 0,36 (\cong 0,4)$$

Subtrahiert man den korrigierten P.A. (0,4) vom Logarithmus der niedrigeren Verdünnung unmittelbar über dem 50%-Wert (also hier: -3), so ergibt sich ein Wert von -3,4. Somit ist 1 TCID₅₀ bei einer Virusverdünnung von $10^{-3,4}$ erreicht, was bedeutet, dass das Virusinokulum einen TCID₅₀-Titer von $10^{3,4}$ /ml aufweist.

Für die Infektionsstudien wurde jeweils ein 60 %-iger konfluenter Zell-Monolayer mit dem zu untersuchenden Virus aus den angefertigten Stocks mit einer MOI (*multiplicity of infection*) von 1 (entspricht 1 Viruspartikel/1 Zelle) infiziert und im Verlauf der Kultivierung die TCID₅₀ berechnet. Bezieht man den jeweilig berechneten TCID₅₀-Wert auf die Zeit (Tage nach Infektion), so lässt sich der zeitliche Verlauf einer Infektion (Virusvermehrung) anhand des zunehmenden CPEs darstellen. Die Zeit bis zum Auftreten des CPEs ist abhängig von der spezifischen Geschwindigkeit der Virusvermehrung und der Menge des verimpften Virus (Inokulum).

2.2.14 Indirekter Immunfluoreszenz-Test zum Nachweis des Ljunganvirus

Der indirekte Immunfluoreszenztest (IFT) wurde verwendet, um nach der Infektion von eukaryontischen Zellen mit verschiedenen LV-Stämmen virale Proteine in den Zellen zu detektieren und zu lokalisieren. Für diese Methode wurden zwei Antikörper verwendet, von denen der Primärantikörper spezifisch an das viral exprimierte Protein bindet, während der Sekundärantikörper wiederum spezifisch den Primärantikörper erkennt und an diesen bindet. Der Sekundärantikörper ist mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt und somit kann das virale Protein auf indirektem Wege unter einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden.

Zur Durchführung des IFT wurden Zellen (3 bis 5×10^5 /ml) auf 15 mm Durchmesser sterilen Glasplättchen ausgesät und in 24er-Lochplatten bzw. auf Objektträgern mit 8er-Lochkammern aus Kunststoff kultiviert. Nachdem die Zellen etwa 60 % konfluent gewachsen waren, wurden sie infiziert. Jeden Tag bis einschließlich am Tag des vollständigen CPEs (Ablösung des Zellrasens) wurde jeweils ein Glasplättchen entnommen und i.d.R. gleich weiter bearbeitet.

Für den IFT wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und dann mit 4 % (v/v) Paraformaldehyd in PBS für 15 min bei RT fixiert. Nachdem die Zellen erneut gewaschen wurden, erfolgte die Permeabilisierung mit $0,1$ % (v/v) Triton[®]-X-100 in PBS für 10 min bei RT, um ein späteres Eindringen des Antikörpers zu ermöglichen. Danach wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Dann erfolgte die Zugabe des Blockpuffers und die anschließende Inkubation für 1 h bei RT, um überschüssige Bindungsstellen zu blockieren. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS wurde der gegen den spezifischen LV-Stamm gerichtete Primärantikörper in der Verdünnung $1:50$ (mit Albuminazid) auf die Zellen gegeben, so dass die Zellen damit ausreichend benetzt waren. Danach erfolgte die Inkubation in feuchter Atmosphäre für 1 h bei RT. Später wurde der überschüssige Primärantikörper mit PBS entfernt, woran sich dann eine 45 -minütige Inkubationszeit unter feuchten und dunklen Bedingungen mit dem FITC-gekoppelten-Sekundärantikörper anschloss, der zuvor $1:300$ mit PBS verdünnt wurde. Überschüssiger Antikörper wurde später durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Anschließend erfolgte ein kurzer Waschschritt mit aq bidest., um störendes Salz zu entfernen. Danach wurden die Glasplättchen

auf einen Objektträger in einen Tropfen Eindeckmedium gelegt und luftdicht fixiert. Den Kammer-Objektträgern wurde die 8er-Loch-Kammer abgenommen und die Zellen gleichfalls mit Eindeckmedium betropft und mit einem passenden Deckgläschen luftdicht verschlossen.

Die lichtmikroskopische Analyse der Fluoreszenzpräparate erfolgte an einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop mit einem Argon-Laser bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm. Die Daten konnten mit einer entsprechenden Software bearbeitet und anschließend in einem Rechner bzw. auf einen Datenträger gespeichert werden.

Der IFT erfolgte parallel zur Virustiterbestimmung, um erste Ergebnisse über den zeitlichen Infektionsverlauf mit Ljunganviren zu erhalten.

2.2.15 Elektronenmikroskopische Untersuchungen des Ljunganvirus

In der Infektionsdiagnostik und für Morphologiestudien von Viren wird zum direkten Nachweis und zur Visualisierung kompletter Viruspartikel häufig die Elektronenmikroskopie herangezogen. Grundsätzlich kommen für die elektronenmikroskopische Virusdiagnostik zwei Präparationstechniken in Frage: die Negativkontrastierung und die Einbettungs- und Ultradünnschnitttechnik. Während bei der Negativkontrastelektronenmikroskopie die im Untersuchungsgut enthaltenen Erreger durch Anlagerung des Kontrastmittels an die Strukturen vor allem von außen dargestellt werden, ermöglicht die Ultradünnschnitttechnik die Darstellung von Virus-Wirtszell-Wechselwirkungen sowie den Blick in zelluläre, möglicherweise virusenthaltende Kompartimente. Nachteilig ist hier der große Zeitaufwand für die Einbettung und Herstellung von Ultradünnschnitten.

In dieser Arbeit wurde die Morphologie von Ljunganvirus in Zellkulturüberständen und in infizierten Zellen mit fortgeschrittenen CPE mittels der Negativkontrastierung studiert. Des Weiteren wurde der virusdiagnostische Nachweis von Ljunganviren in infizierten Mäusepankreasproben, die wir im Rahmen einer Kooperation mit Hr. Dr. Dr. B. Niklasson (Apodemus AB, Stockholm) erhalten haben, mit Hilfe der Ultradünnschnitttechnik durchgeführt. Die Pankreasproben waren zuvor in 2,5 %-igem Glutar-

aldehyd zur Inaktivierung von Proteasen fixiert und stammen von vier verschiedenen Rötelmäusen (*Clethrionomys glareolus*), die alle an Diabetes erkrankt waren. Ein Teil der gleichen Proben wurde zum Department of Medicine, University of Washington, Seattle, WA, USA verschickt, um dort immunhistologische Untersuchungen mit spezifischen Antisera durchzuführen. Sämtliche elektronenmikroskopischen Untersuchungen fanden in Kooperation mit der AG Dr. Gelderblom (ZBS-4, RKI) statt.

2.2.15.1 Sedimentierung von Kulturüberständen und Zellen zur Probenpräparation

Zur Probenvorbereitung für die Negativkontrastierung von Viren wurde der Zellkulturüberstand differenziell zur Aufreinigung im SW40-Rotor zentrifugiert: für 15 min bei 6000 UpM, und danach der neue Überstand für 15 min bei 10000 UpM. Anschließend wurde die klare Überstandsprobe mittels UZF für eine Stunde bei 35000 UpM ins Sediment gefahren. Das Sediment wurde zu einem Teil bei -80 °C in aq bidest. und zum anderen Teil in 2,5 %-igem Glutaraldehyd bei 4 °C für die elektronenmikroskopische Untersuchung gelagert.

Zum Nachweis von intrazellulären Viren wurde der Zellrasen abtrypsiniert und die Zellsuspension komplett für 20 min bei 5000 UpM im SW40-Rotor pelletiert. Der Überstand wurde abdekantiert und das Zellpellet in 0,1 M HEPES resuspendiert und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. HEPES ist für Untersuchungen an Proteinen und Zellen gut geeignet, da es sich als stabiles Puffersystem bei enzymatischen Reaktionen inert verhält. Danach wurde das gleiche Volumen 5 %-iges Glutaraldehyd dazugegeben und gevortext. Die Zellen wurden dann bei 4 °C bis zur Weiterverwendung (Einbettung, Zellschnitttechnik, Negativkontrastierung) gelagert.

2.2.15.2 Negativkontrastierung

Zur elektronenmikroskopischen Untersuchung werden Partikelsuspensionen auf Trägernetze (sog. Grids) aufgebracht, die zuvor gereinigt, mit einer dünnen, gut durchstrahlbaren Folie aus Pioloform F befilmt und zur thermischen und mechanischen Stabilisierung mit Kohle bedampft wurden. Für die Negativkontrastierung werden Kupfergrids mit relativ kleinen Maschen (300 oder 400 mesh) verwendet.

Die zu untersuchenden Suspensionen und die weiteren für die Präparation benötigten Medien wurden auf einem Streifen Parafilm als einzelne Tropfen (ca. 50 µl) aufgetragen. Ein bis zwei Kupfergrids wurden mit der behandelten Trägerfläche auf die jeweilige Oberfläche eines Tropfens der zu kontrastierenden Partikelsuspension abgelegt. Die Virussuspension wurde einige Minuten zur Adsorption auf dem Grid belassen. Danach wurde die Flüssigkeit mit einem Streifen Filterpapier vom Grid weitgehend abgesaugt. Das Grid wurde in 4 bis 5 Tropfen aq bidest. (je nach Verunreinigung der Probe) kurz durchgezogen, um gröbere Verunreinigungen zu entfernen. Allerdings nicht zu lange, da sonst die Viruspartikel weggespült werden können. Zwischendurch wurde immer wieder kurz abgetupft. Anschließend wurden die Kupfergrids zur Kontrastierung auf je einen Tropfen Uranylacetat gelegt und 5 bis 7 min im Dunkeln inkubiert. Uranylacetat bindet an Phosphatgruppen und fixiert Biomembranen. Das Kontrastmittel wurde im Anschluss mit einem Stück Filterpapier teilweise abgesaugt und das Grid an der Luft getrocknet. Anschließend erfolgte die elektronenmikroskopische Auswertung [Kap. 2.2.15.4].

2.2.15.3 Eponeinbettung und Ultradünnschnitttechnik zur Probenpräparation

Die zu untersuchenden Proben (Zellen oder Gewebe) werden für die Ultradünnschnitttechnik jeweils in 2,5 %-igen Glutaraldehyd und Osmiumtetroxid fixiert, zusätzlich mit Tannin und Uranylacetat behandelt und schließlich in Epon eingebettet. Nach dieser Art von Probenpräparation werden von den Proben Ultradünnschnitte angefertigt, auf einen Kupfergrid mit Bleicitrat nachkontrastiert und am Elektronenmikroskop ausgewertet.

Für die Einbettung und Ultradünnschnitttechnik wurden die Glutaraldehyd-fixierten Zellproben zunächst bei 1000 UpM in einer Eppendorf-Zentrifuge 5403 für 10 min sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment mit reichlich PBS aufgenommen und nach erneuter Zentrifugation zweimal mit aq bidest. gewaschen. Die Glutaraldehyd-fixierten Gewebeproben wurden hingegen zweimal für je 10 min mit aq bidest. gewaschen. Vor der Osmiumbehandlung, die den Lipidanteil fixiert, muss im Präparat noch vorhandenes freies Aldehyd ausgewaschen werden, da sonst das Osmiumtetroxid (OsO_4) zu metallischen Osmium reduziert, das sich dann als elektronendichter Niederschlag im Präparat verteilt. Die Gewebeproben mussten

mit einem Skalpell zuvor zerstückelt werden, damit das OsO_4 später besser einwirken kann. Danach wurde erneut mit aq bidest. gewaschen. Anschließend erfolgte die Osmiumbehandlung mit 1 %-igem OsO_4 für ca. eine Stunde bei 4 °C und ohne Lichteinwirkung. Die Zellen im Präparat wurden dadurch schwarz gefärbt. Nach der Behandlung wurde das Präparat zweimal in aq bidest. gewaschen (Zellen jeweils sedimentiert; 5 min, 1000 UpM), um überschüssiges OsO_4 zu entfernen. Alle Arbeiten mit Osmium und anschließend mit Epon werden mit Einweghandschuhen und unter dem Abzug durchgeführt, da diese Substanzen als Haut- und/oder Atemgifte hohe Toxizität besitzen.

Damit die OsO_4 -geschwärzten Zellen bzw. Gewebeproben in einfacher Weise durch die Einbettungsschritte gebracht werden konnten, wurden sie in 3 %-iger Agarose eingebettet. Die Agaroseblöckchen mit den eingeschlossenen Zellen bzw. Gewebe wurden in 0,1 %-igen Tannin in HEPES (frisch angesetzt) für eine Stunde bei 4 °C im Dunkeln unter gelegentlichem Schütteln inkubiert. Tannin dient zur Kontrastierung von Zellorganellen. Anschließend wurde das Tannin gegen 1 %-iges NaSO_4 in HEPES ausgetauscht und die Blöckchen für 10 min bei 4 °C im Dunkeln unter gelegentlichem Schütteln gewaschen. Dieser Schritt wurde nochmals wiederholt, um das überschüssige Tannin zu entfernen, bevor das NaSO_4 gegen aq bidest. ausgetauscht wurde und erneut für 10 min bei 4 °C im Dunkeln gewaschen wurde. Dieser Schritt wurde nochmals wiederholt, bevor das aq bidest. durch 2 %-iges Uranylacetat ersetzt wurde und für 1 Stunde bei 4 °C im Dunkeln unter gelegentlichem Schütteln inkubiert wurde. Die Uranylacetat-Behandlung dient sowohl zur Nachkontrastierung, besonders von Nukleinsäureanteilen, als auch zur Fixation von Biomembranen. Das Uranylacetat wurde im Anschluss gegen aq bidest. ausgetauscht und für 10 min bei 4 °C gewaschen.

Vor dem Einschluss in die hydrophobe organische Epoxidharzmischung musste das biologische Material stufenweise in einer aufsteigenden Ethanolreihe (50 %, 70 %, 95 % und Propylenoxid) unter ständigem Rotieren in einem Rotationsmischer bei RT entwässert werden. Danach wurde das Propylenoxid durch Epon-Propylenoxid (1:1-Gemisch) ersetzt und über Nacht mit offenen Röhrchen bei RT im Rotationsmischer inkubiert, damit der Propylenoxid-Anteil abdampft. Durch die Verdunstung des leicht flüchtigen Propylenoxid kommt es zur Konzentration des Einbettungsgemischs und

zur gründlichen Infiltration der Proben. Die vollständige Entwässerung und Infiltration wurden durch das völlige Absinken der Agarblöckchen auf den Boden des Röhrchens angezeigt. Danach wurde das zurückgebliebene Epon abgesaugt und durch Epon + 1,3 % (v/v) DMP-30 (Dimethylaminophenol) für zwei bis drei Stunden bei RT unter ständigem Rotieren ersetzt. Zur Einbettung wurden Gelatinekapseln 2 Stunden bei 60 °C getrocknet. Die Blöckchen wurden anschließend mit einer spitzen Nadel auf dem Boden der Kapsel orientiert und diese mit Hilfe einer 5 ml Einwegspritze randvoll mit Epon + 1,3 % (v/v) DMP-30 gefüllt. Zur Kennzeichnung wurden beschriftete Papierschildchen hineingesteckt. Die Gelatinekapsel wurde bei 60 °C im Brutschrank für zwei Tage gebacken, damit das Epoxidharz auspolymerisiert.

Mit der Diamantenfräse eines Trimmergerätes wurden die auspolymerisierten Blöckchen in Pyramidenform zugespitzt und apikal im Objektbereich mit einer trapezförmigen Anschnittfläche versehen. Die Schnitte wurden an einem Ultramikrotom mit einem Diamantenmesser angefertigt. Semidünnschnitte für die Lichtmikroskopie sind 300 bis 500 nm dick. Sie wurden mit einer Metallöse von der Wasseroberfläche abgenommen und auf einen Objektträger abgesetzt. Nach Färbung mit 1 %-iger Toluidinblau/Boraxlösung (5 min) wurden sie zur Kontrolle und zum gezielten Aufspüren von Zellstrukturen am Lichtmikroskop untersucht. Ultradünnschnitte sind – entsprechend der Schnittdicken- und Farbskala von Peachey (im Okular meist silbrig) – 30 bis 50 nm dick. Sie wurden nach dem Spreiten mit einem Xylol-getränkten Filterpapier, das 1 min dicht über die Schnitte gehalten wurde, durch Auftupfen mit unbeduftetem 300 mesh Kupfergrids von der Wasseroberfläche abgenommen und auf Filterpapier in Glaspetrischalen gelegt. Durch die Schnitt-Nachkontrastierung mit alkalischen Bleisalzen wird der Kontrast vor allem an den Strukturen verstärkt, die Uranyl- und OsO_4 -Ionen gebunden haben. Als möglicher, sehr unerwünschter Nebeneffekt kann dabei aus dem Bleihydroxid und dem CO_2 der Luft schwerlösliches Bleicarbonat entstehen und als Niederschlag die Schnitte bedecken. Daher erfolgte die Schnittkontrastierung in einer geschlossenen Petrischale, ausgelegt mit einem Streifen Paraffin (Plattenwachs) und geschützt von NaOH-Plätzchen.

Ein Tropfen Bleicitrat und drei Tropfen 0,02 M NaOH wurden auf das Wachs pipettiert. Die Schnitte-tragenden Grids wurden für 15 sec auf das Bleicitrat gelegt und anschließend mit einer Pipette schnell nacheinander durch die NaOH-Tropfen

gezogen und für 3 bis 5 sec in aq bidest. gewaschen. Zum Trocknen wurden die Grids zwischen zwei Filterpapierstreifen angedrückt und anschließend an der Luft getrocknet. Anschließend erfolgte die elektronenmikroskopische Auswertung [Kap. 2.2.15.4].

2.2.15.4 Elektronenmikroskopische Auswertung und fotografische Dokumentation

Die Präparate wurden an einem Transmissionselektronenmikroskop bei einer Primärvergrößerung von 5000:1 bis 40000:1 und bei einer Beschleunigungsspannung von 80 kV unter Verwendung der 30 µm Objektapertur-Kontrastblende ausgewertet. Zur Verminderung der Probenkontamination wurde immer mit Objektraumkühlung durch flüssigen Stickstoff gearbeitet. Die Befunde wurden auf Scientia Planfilmen bei automatischer Belichtungssteuerung mit Zeiten von 0,5 bis 1 sec dokumentiert. Die Negative wurden mit Refinal 8-10 min bei 20 °C entwickelt, Kontaktabzüge sowie Nachvergrößerungen einzelner Negative auf Brovira BN-Fotopapier der Härtegrade 1-5 angefertigt.

2.2.16 Etablierung von RT-PCR-Methoden für den Nachweis von Ljunganviren

Für den Nachweis von LV-spezifischen Nukleinsäuresequenzen im Myokardgewebe von HTx-Patienten und Herzspendern aus dem DHZB (insgesamt 100 verschiedene Proben jeweils aus dem linken Ventrikel), aber auch von anderen Patienten- und Nagetierproben aus Schweden, wurden in dieser Arbeit eine konventionelle RT-PCR sowie erstmalig eine quantitative real-time RT-PCR-Methode in Kooperation mit Hr. Dr. Dr. B. Niklasson (Apodemus AB, Stockholm) etabliert. Zunächst wurden dazu die entsprechenden Primersequenzen nach generellen Maßstäben für das Primer- und Sondendesign, in Zusammenarbeit mit Hr. Dr. A. Nitsche (ZBS-1, RKI), computergestützt innerhalb der konservierten 5'-nicht-codierenden-Region (5'-NCR) des Genoms ausgewählt, um möglichst alle bisher bekannten LV-Typen detektieren zu können. Mit Hilfe einer RNA-Standardkontrolle des LV-Prototyps 87-012 (Apodemus AB), isoliert aus Jungmäusehirn (SMB)-Zellkulturüberständen (TCID₅₀ 6,2 x10³), wurde ein RT-PCR-Protokoll (Kap. 2.2.16.2) ausgearbeitet und die optimale Annealing-Temperatur für die Primer mit einem Gradiententhermozykler (Biometra) ermittelt.

Für die real-time RT-PCR [Kap. 2.2.16.4] wurden zum gruppenspezifischen Nachweis zwei sog. TaqMan[®]-*minor-groove-binder*-Sonden (MGB[®]-*probes*) hergestellt und eingesetzt. Diese haben einen nichtfluoreszierenden Quencher am 3'-Ende, so dass das real-time Detektionssystem den emittierenden Reporterfarbstoff präziser messen kann. Des Weiteren ist am 3'-Ende ein *minor groove binder* lokalisiert. Dabei kann es sich um eine Vielzahl von verschiedenen organischen Ringverbindungen handeln, die mit der einzelsträngigen Ziel-DNA sehr stabile Duplexstrukturen bilden können. Dies bewirkt eine Erhöhung der Schmelztemperatur der Sonde, weshalb es möglich ist, kürzere Sonden zu entwickeln (Kutyavin et al., 2000). Dies ermöglicht es, die Spezifität der Sonde innerhalb komplexer Ziel-DNA-Abschnitte zu erhöhen, indem die Sonde auf kurze spezifische Sequenzen ausgerichtet wird.

Die Spezifität der Nachweismethoden wurde mit aus Zellkulturüberständen extrahierter RNA folgender LV-Stämme überprüft: LV 87-012, LV 174F, LV 145SL, LV 342SL, M-1146, NY64-7855, NY-64-7947. Die RNA wurde zuvor mit Hilfe des QIA-amp[®] Viral RNA Kit (Qiagen) gemäß Herstellerangaben isoliert. Außerdem dienten als Negativkontrollen extrahierte RNA bzw. DNA aus: Echovirus 30 (AG Dr. Schreier, FG15/NRZ, RKI), ADV Serotyp 2, 3, 4, 5, 9, 12, 40 (Fr. Dr. B. Chmielewicz, ZBS-1, RKI), HCMV Stamm AD-169 (AG Dr. Prösch, Charité), Influenzavirus Typ A und Typ B (AG Dr. Schweiger, FG12/NRZ, RKI), Hantavirus Stamm 76-118, Dobravavirus Stamm Slovenia, Puumalavirus Stamm Sotkamo und Seoulvirus Stamm 80-39 (Hr. Dr. R. Ulrich, Inst. f. Virologie, Charité), PVB19 (99/800, NIBSC), sowie den nahverwandten Viren, das humanpathogene Parechovirus Typ 1 (vormals Echovirus 22) und das Encephalomyocarditisvirus sowie das Theilers Encephalomyelitisvirus, welche beide in Mäusen pathogen sind (Hr. Dr. B. Niklasson, Apodemus AB, Stockholm).

Die Sensitivität der quantitativen real-time PCR wurde mit 10-fach-Verdünnungen eines selbst hergestellten Insert-Plasmids [Kap. 2.2.16.3] überprüft, der das PCR-Produkt der RNA-Standardkontrolle des LV-Prototyps 87-012 aus der RT-PCR enthielt. Zur Inhibitionsüberprüfung wurden Myokardlysate von gesunden Herzspendern mit 100 µl 10-fach-Verdünnungen der RNA-Standardkontrolle gespikt.

Als Sample-Kontrollen wurden insgesamt 60 verschiedene Gewebeproben (aus Hirn, Leber, Lunge, Niere, Pankreas und Herz) von sechs Labormäusen getestet, die intraperitoneal mit LV 145SL infiziert wurden, sowie von vier nicht-infizierten Mäusen. Alle Mäuse wurden nach einer Woche zwecks Probenentnahme seziiert. Des Weiteren wurden von fünf Labormäusen, die ebenfalls zuvor mit LV infiziert wurden und während der Schwangerschaft Symptome von intrauterinem Fruchttod aufwiesen, Plazentaproben entnommen. Schließlich wurden sechs verschiedene Proben (Plazenta oder Nabelschnur) von vier schwedischen Patientinnen mit Diagnose auf Präeklampsie untersucht, sowie ein Schweineisolat (SMB 941), welches zuvor in einem anderen Labor mittels einer semi-nested PCR auf LV positiv getestet wurde.

Alle positiven Befunde wurden zur Kontrolle nach einer Gelelektrophorese und Gel-extraktion im Anschluss direkt sequenziert [siehe Kap. 2.2.7].

2.2.16.1 Primer- und Sondendesign

Folgende Primer- und Sondensequenzen wurden nach einer Alignmentstudie mit 5'-NCR-Sequenzen aus LV 87-012 (GenBank Acc. No. NC003976 und AF327920), LV 174F (Acc. No. AF327921), LV 145SL (Acc. No. AF327922), M-1146 (Acc. No. AF538689) und NY64-7855 (persönliche Mitteilung Dr. B. Niklasson) ausgewählt:

LV-sense-Primer	5'-gCggTCCCACTCTTCACAg-3' (255-274 nt)
LV-antisense-Primer	5'-gCCCAgAggCTAgTgTTACCA-3' (442-424 nt)
LV-MGBc-Sonde	5'-TgTCC <u>C</u> AgAggTgAAAgC-3' (306-290 nt)
LV-MGBg-Sonde	5'-TgTC <u>g</u> AgAggTgAAAgC-3' (306-290 nt)

Die Sonden waren am 5'-Ende mit dem Reporterfarbstoff FAM und am 3'-Ende mit einem MGB gekoppelt und wurden über Applied Biosystems, Warrington, Cheshire, UK bezogen. Sie unterschieden sich jeweils an der nt-Position 302, welche einen Polymorphismus manifestiert. Dies ermöglicht eine erste Differenzierung der in Betracht kommenden schwedischen bzw. nordamerikanischen LV-Typen.

2.2.16.2 RT-PCR für den Nachweis von Ljunganviren

Die cDNA-Synthese wurde wie oben erwähnt [Kap. 2.2.4.1] nach dem RT-Ansatz II bei 60 °C (Tm) mit dem antisense-Primer durchgeführt. Die im Anschluss folgende konventionelle PCR war wie folgt:

PCR für Nachweis von LV-cDNA			
Assay-Zusammensetzung		Reaktionsbedingungen	
cDNA-Probe	5,0 µl	35 PCR-Zyklen	30 sec bei 94 °C
10x Taq-Puffer	2,5 µl		30 sec bei 60 °C
dNTPs [2 mM]	1,25 µl		45 sec bei 72 °C
MgCl ₂ [50 mM]	0,75 µl		
Primer (je 25 µM)	je 0,5 µl		Finale Elongation
Taq-Polymerase [5 U/µl]	0,1 µl		
Molekularwasser		ad 25,0 µl	Thermozykler: Biometra TRIO Thermoblock

Die Größe des hieraus entstehenden Amplifikats ist durch die Primer festgelegt und beträgt 187 bp.

2.2.16.3 Klonierung von PCR-Produkten, Amplifikation und Plasmidisolierung

Für die Sensitivitätsüberprüfung der real-time PCR und der Herstellung einer Standardkurve wurden PCR-Produkte, die in der RT-PCR zuvor mit der RNA-Standardkontrolle des LV-Prototyps 87-012 generiert worden sind, kloniert. Für die Klonierung der frisch erzeugten 187 bp-Amplifikate wurde das pcDNA3.1/V5-His TOPO[®] TA Expression Kit (Invitrogen) verwendet. Die Anwendung beruht auf folgendem Prinzip: Die Taq-Polymerase weist eine terminale Transferaseaktivität auf, durch die ein Desoxyadenosin an die 3'-Enden der PCR-Produkte angehängt wird. Der bereits linearisierte TOPO[®] TA Cloning Vektor pcDNA3.1/V5-His hat an seinen 3'-Enden einen Desoxythymidin-Überhang und ist zusätzlich mit Topoisomerase I gekoppelt. Dadurch wird eine schnelle und effiziente Ligation von PCR-Produkten in den Vektor ermöglicht. Es empfiehlt sich, vor der Klonierung die PCR bei der finalen Elongation 10 min statt 3 min laufen zu lassen, damit PCR-Produkte mit längeren poly-A-Schwänzen entstehen.

Für die Klonierungsreaktion wurden jeweils 4 µl PCR-Produkt eingesetzt. Die einzelnen Schritte sowohl für die Klonierungsreaktion als auch für die Transformation der mitgelieferten chemisch kompetenten One Shot® TOP10 *Escherichia coli*-Bakterien (Invitrogen) erfolgten gemäß den Angaben des Herstellers. Die transformierten Zellen wurden auf vorgewärmten LB-Agarplatten (mit 1,5 % w/v Agar) mit 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Der Nachweis, dass das gewünschte Fragment in den nach der Klonierung entstandenen Plasmidkonstrukten vorhanden ist, erfolgte mit Hilfe der sog. Kolonie-PCR unter Verwendung der mitgelieferten Plasmidprimer T7 und BGHrev (Invitrogen). Hierbei wurden pro Platte ca. 10 Einzelkolonien gepickt und in 50 µl aq bidest. überimpft. Hieraus wurden je 5 µl entnommen, um 50 µl LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin als Stock anzupflanzen. Die restliche wässrige Zellsuspension wurde gemischt und 5 min bei -80 °C inkubiert. Nach Antauen der Proben wurden die Reaktionsgefäße wiederum gemischt und 5 min bei 100 °C aufgeköcht. Durch diese Kälte- und Hitzeschockbehandlung werden die Plasmide aus den Bakterien isoliert. Schließlich wurde nochmals gemischt und kurz vor Gebrauch der Plasmid-Lösung wurden die Zellreste herunterzentrifugiert. Vom Überstand wurden 2,5 µl direkt in folgendem PCR-Ansatz eingesetzt:

Kolonie-PCR			
Assay-Zusammensetzung		Reaktionsbedingungen	
DNA-Probe	2,5 µl	Initiale Denaturierung	3 min bei 94 °C
10x Taq-Puffer	2,5 µl	35 PCR-Zyklen	30 sec bei 94 °C
dNTPs [10 mM]	0,5 µl		30 sec bei 64 °C
MgCl ₂ [50 mM]	0,75 µl		60 sec bei 72 °C
Primer (je 25 µM)	je 0,5 µl		
Taq-Polymerase [5 U/µl]	0,2 µl	Finale Elongation	3 min bei 72 °C
Molekularwasser		Thermozykler: Biometra TRIO Thermoblock	
	ad 25,0 µl		

Erwartet wurde ein Plasmid-Amplifikat, das um das entsprechende LV-Insert vergrößert wurde, also von 265 bp auf 452 bp. Die entsprechenden Fragmente wurden aus dem Gel extrahiert und mit T7 bzw. BGHrev ansequenziert, um mittels Sequenz-

analyse die endgültige Bestätigung zu erhalten, dass das gewünschte LV-Insert im Plasmid enthalten war.

Für die Plasmidgewinnung aus den positiven Klonen wurden die jeweiligen Bakterienstocks (50 µl) in 5 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin zwecks Anreicherung in einer Minikultur überführt und über Nacht bei 37 °C in einem Brutschrank mit Schüttler bei 200 UpM inkubiert. Nachdem die Kulturen ihre stationäre Wachstumsphase erreicht hatten, wurden die Plasmide mit Hilfe des QIAGEN® Plasmid Mini Kit gemäß Herstellerangaben isoliert.

Die Plasmid-Konzentration wurde photometrisch (in µg/ml) gemessen und die Plasmidzahl pro µl folgendermaßen errechnet:

$$\begin{aligned}
 &\text{Plasmid: } 5523 \text{ bp} + 187 \text{ bp} = 5710 \text{ (Vektor + Insert)} \\
 &5710 \text{ bp} \times 650 \text{ g/ bp} = 3711500 \text{ g (1 mol Plasmid)} \quad \begin{array}{l} \downarrow \\ \text{geteilt durch} \\ \text{die} \\ \text{Avogadrozahl} \end{array} \\
 &3711500 / 6,023 \times 10^{23} = 6,1611323 \times 10^{-18} \text{ g (1 Plasmid)} \\
 &1 \text{ Plasmid} / 6,1611323 \times 10^{-18} \text{ g} = x / \text{gemessene Konzentration} \times 10^{-9} \\
 &x = \text{Plasmidzahl} / \mu\text{l}
 \end{aligned}$$

Mit einer 10-fach Verdünnungsreihe des Insert-Plasmids konnte die Sensitivität der quantitativen real-time PCR für LV überprüft und die Standardkurve erstellt werden.

2.2.16.4 Quantitative real-time RT-PCR für den Nachweis von Ljunganviren

Die cDNA-Synthese wurde wie oben erwähnt [Kap. 2.2.4.1] nach dem RT-Ansatz II bei 60 °C (T_m) mit dem antisense-Primer durchgeführt. Die im Anschluss folgende quantitative real-time PCR war wie folgt:

quantitative real-time PCR für LV-Nachweis

Assay-Zusammensetzung		Reaktionsbedingungen	
cDNA-Probe	2,5 µl	UDG-Behandlung	2 min bei 50 °C
10x Taq-Puffer+ROX	2,45 µl	Initiale Denaturierung	10 min bei 95 °C
dNUTPs [2,5 mM]	2,0 µl		
MgCl ₂ [25 mM]	4,0 µl	35 PCR-Zyklen	15 sec bei 95 °C
Primer (je 10 µM)	je 0,5 µl		30 sec bei 60 °C
Taq-Polymerase [100 U/µl]	0,25 µl	Thermozykler:	
Sonde (je 10 µM)	je 0,25 µl	ABI Prism [®] 7700 Sequence Detector	
UDG [100 U/µl]	0,25 µl	ABI Prism [®] 7900 HT Sequence Detector	
Molekularwasser	ad 25,0 µl		

2.2.17 Statistische Analysen

Sämtliche Befunddaten wurden in Microsoft Excel tabellarisch festgehalten und mit EpiInfo 6 statistisch analysiert. Hierbei wurden deskriptive statistische Standard-techniken angewendet. Der Vergleich kontinuierlicher Variablen zwischen den zwei untersuchten Patientengruppen wurde mit dem Student-t-Test für Variable mit normaler Verteilung durchgeführt. Ergebnisse kategorischer Variablen wurden als Anteile mit einem 95 %-Konfidenzintervall dargestellt und mit dem Chi Quadrat- (χ^2)-Test nach Maentel Haenszel analysiert. Bei kleineren Stichproben wurde der Fisher-Exakt-Test angewendet. P-Werte $\leq 0,05$ wurden als statistisch relevant angezeigt.

3. Ergebnisse

3.1 Daten zu den Patienten und Proben

Im Rahmen dieser Arbeit sind insgesamt 536 Gewebeproben untersucht worden (Tab. 6): 177 Myokardproben aus vier Lokalisationen (LVVW, LVHW, Septum, RV) explantierter Herzen von insgesamt 73 HTx-Patienten sowie 272 Myokardproben von insgesamt 80 für die Allografttransplantation abgelehnten Donor-Herzen. Darüber hinaus sind 58 subvalvuläre Myokardproben, die sowohl unterhalb der Aorten- als auch unterhalb der Pulmonalarterienklappe entnommen wurden, und 29 Non-Koronar-Herzklappen von insgesamt 30 Patienten aus beiden Gruppen (HTx-Patienten bzw. Herzspendern) untersucht worden, um zu testen, ob myokardiotrope Viren auch in Herzklappengewebe vorkommen können.

Von den 73 HTx-Explantaten stammten 59 (81 %) von Patienten männlichen Geschlechts, wohingegen bei den abgelehnten 80 Donor-Herzen lediglich 38 (47,5 %) auf männliche Spender zurückgingen. Die Verteilung der explantierten Herzen zwischen beiden Geschlechtern zeigt im Falle der HTx-Explantate, dass sich im Untersuchungszeitraum signifikant mehr Männer als Frauen einer Herztransplantation unterzogen haben ($\chi^2 = 55,48$; $P < 0,001$) (Tab. 6).

Tabelle 6:

Daten zu den Patienten und Proben.

	HTx-Gruppe Donor-Gruppe	
Anzahl Explantate	73	80
Patientendaten:		
Anteil Männer	59 (81,0 %) [†]	38 (47,5 %)
Altersumfang [J.]	8-65	4-79
Durchschnittsalter [J.]*	46	49
Anzahl		
Myokardproben	177	272
subvalvuläres Myokard	14	44
Herzklappen	7	22
Gesamtprobenzahl	198	338

J.= Jahr(e). * Mittelwert. [†] $\chi^2 = 55,48$; $P < 0,001$

Das durchschnittliche Lebens- bzw. Spenderalter (Mittelwert) in beiden Gruppen war annähernd gleich. Es betrug im Falle der HTx-Patienten 46 Jahre (Minimum: 8 Jahre, Maximum: 65 Jahre) und im Falle der Spender 49 Jahre (Minimum: 4 Jahre, Maximum: 79 Jahre) (Tab. 6). Tabelle 7 zeigt im Folgenden, wie sich die Patienten jeweils auf die unterschiedlichen Altersklassen verteilen:

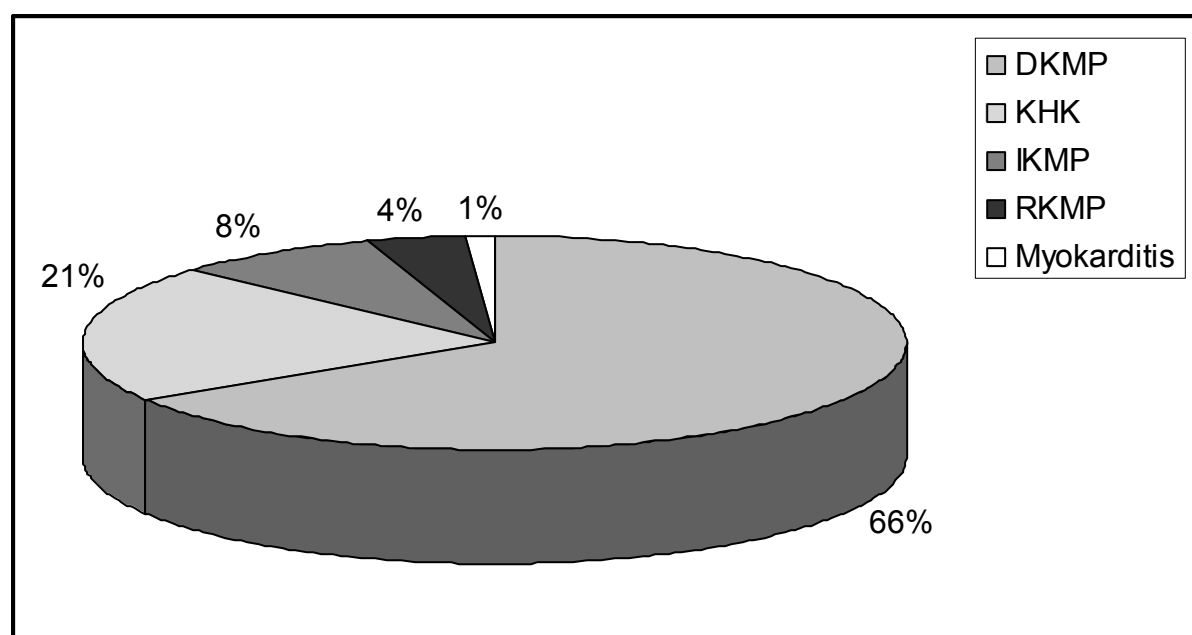
Tabelle 7: Altersverteilung der HTx-Patienten und Herzspender.

Alter [J.]	0-10	11-20	21-30	31-40	41-50	51-60	61-65	66-70	71-80	Gesamt
HTx [n]	1	6	2	12	23	19	10	0	0	73
HTx [%]	1,4	8,2	2,7	16,4	31,5	26,1	13,7	0	0	100
Donor [n]	1	5	4	6	17	23	9	5	10	80
Donor [%]	1,2	6,2	5,0	7,5	21,2	28,8	11,3	6,3	12,5	100

Altersgrenze für Herz- bzw. Klappenspende

57,6 % aller Herztransplantationen entfielen in die Altersklassen zwischen 41 und 60 Jahren, in denselben Altersklassen waren auch 50 % aller Spender (Tab. 7, grau unterlegt). Die Altersgrenze für Allograft- bzw. Homograftspenden ist zur Zeit bei 65 Jahren festgesetzt. Im Rahmen einer sog. Altersherzstudie bezüglich der Verwertbarkeit derartiger Spenderorgane, die zur Zeit am DHZB läuft, wurden auch Donor-Explantate von Spendern mit einem Alter über 65 Jahre gesammelt (hier insgesamt 15 Explantate) und daraus Gewebeproben für die vorliegende virologische Studie zur Verfügung gestellt.

Die HTx-Patienten mussten sich einer Herztransplantation vorwiegend aufgrund des Verdachts einer dilatativen Kardiomyopathie (DKMP) in Begleitung einer chronischen Herzinsuffizienz unterziehen. Die zweithäufigste gestellte klinische Diagnose war die koronare Herzkrankheit (KHK) (Abb.11), gefolgt von IKMP und RKMP.

**Abbildung 11: Klinische Diagnosen der HTx-Patienten (n= 73).**

Prozentwerte sind gerundet.

Die häufigste Todesursache bei den Spendern waren Schäden im Schädel-Hirn-Bereich, meist traumatischer Natur, da es sich in der Regel um Unfallopfer handelte. An zweiter Stelle stand als Todesursache der Herzinfarkt (Abb.12).

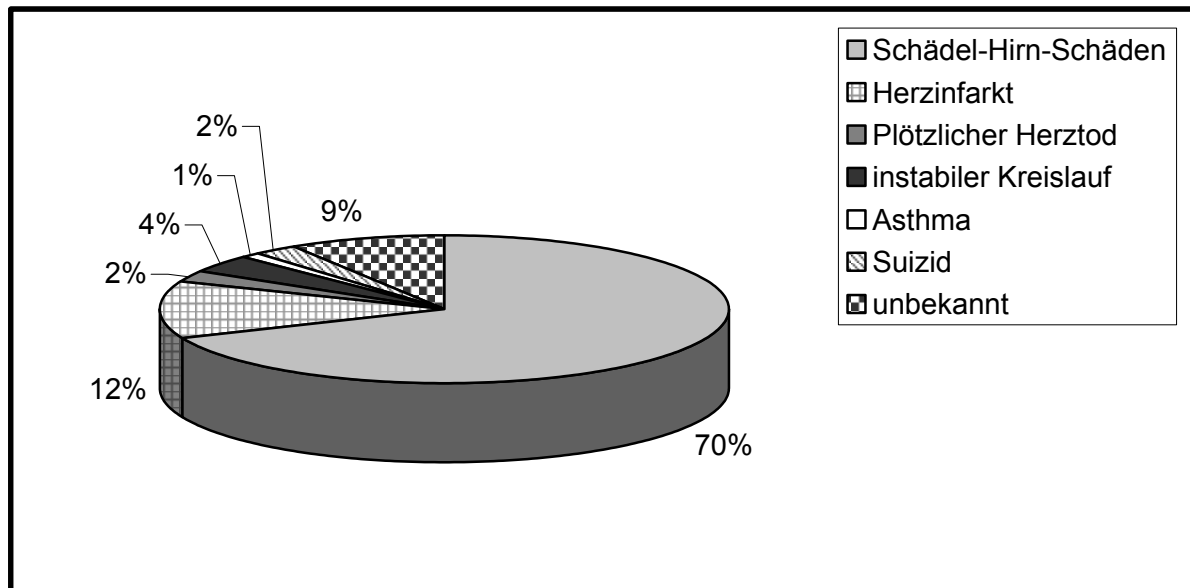


Abbildung 12: Todesursachen der Herzspender (n= 80).

Prozentwerte sind gerundet.

Alle hier untersuchten Donor-Explantate waren aus mehreren Gründen für eine Allografttransplantation ungeeignet (Abb. 13).

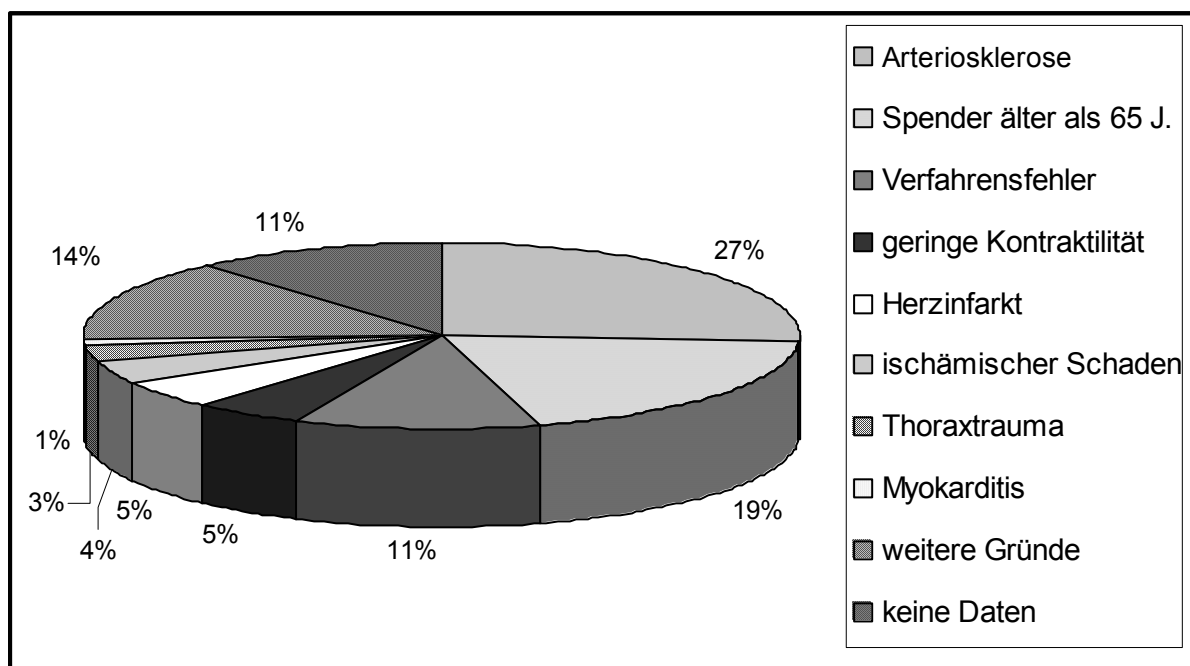


Abbildung 13: Ablehnungsgründe der Donor-Herzen (n= 80).

Prozentwerte sind gerundet.

Den häufigsten Ablehnungsgrund bildeten Erkrankungen der Koronararterien; vorwiegend stenosierende atheromatöse Arteriosklerosen, die entweder anhand der Krankengeschichte bereits bekannt oder durch den Chirurgen während der Entnahme durch Palpation ertastet worden waren. Der zweithäufigste Grund war ein Spenderalter über 65 Jahre. Verhältnismäßig hoch waren auch Ausfälle der Spenderorgane zur Transplantation aufgrund technischer Mängel während der Entnahme. Unter die Rubrik „weitere Gründe“ entfielen schlechte Blutgase, Aortenklappeninsuffizienz, jahrelang dokumentierter hoher Blutdruck, Tod durch Strangulation, Gewebeerkrankungen (z.B. Marfan-Syndrom), kein geeigneter Empfänger, Alkoholabusus usw.

3.2 Extraktion von Nukleinsäuren aus Myokardgewebe

Für die optimale Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren (DNA bzw. RNA) aus Myokardgewebe wurden verschiedene kommerzielle Extraktionsmethoden (Kits) mit konventionellen Methoden verglichen. Hierzu wurden für die Evaluation der Methoden folgende Parameter berücksichtigt: Konzentration, Ausbeute und Reinheitsgrad der jeweils extrahierten Nukleinsäuren, DNA-Gehalt im Falle der RNA-Extrakte sowie Intensität bzw. Qualität der RNA-Banden im 1 %-igen Agarosegel.

3.2.1 Evaluation verschiedener DNA-Extraktionsmethoden

Für die Evaluation der DNA-Extraktionsmethoden wurden die Resultate aus der Aufarbeitung von jeweils 50 mg tiefgefrorenem Myokardgewebe aus einem Testexplantat im Doppelansatz verglichen. Die getesteten Parameter in Tabelle 8 zeigen, dass die konventionelle Phenol-Chloroform-Methode modifiziert nach Sambrook et al. (1989) im Vergleich zu den kommerziellen Kits eine wesentlich höhere DNA-Konzentration und Ausbeute in den Gewebeaufarbeitungen ergeben hat. Mit Hilfe des davor geschalteten UZF-Schritts [siehe Kap. 2.2.2.4] wird hier die DNA sauber von der Gesamt-RNA im Gewebelysate getrennt, so dass weitere Bearbeitungsschritte, wie z.B. die Behandlung durch RNase A, nicht notwendig sind. Im Vergleich zu den kommerziellen Methoden wurde hier ein ähnlich guter Reinheitsgrad für die DNA-Extrakte erzielt (Tab. 8).

Tabelle 8: Vergleich der Parameter zur DNA-Isolierung von drei verschiedenen DNA-Extraktionsmethoden.^a

Methoden	[DNA] ^b (µg/ml)	Ausbeute ^c (µg/mg Gewebe)	Reinheit ^d (OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀ -Ratio)
Phenol-Chloroform-Methode (modifiziert nach Sambrook et al., 1989)	26,1 ± 1,0	0,08 ± 0,02	1,79 ± 0,00
QIAamp [®] DNA Kit (Qiagen)	14,6 ± 7,2	0,04 ± 0,02	2,08 ± 0,01
NucleoSpin [®] Tissue Kit (Macherey-Nagel)	11,5 ± 4,3	0,03 ± 0,01	1,80 ± 0,00

^aDie Ergebnisse repräsentieren Mittelwerte mit Varianzen aus den jeweiligen Doppelansätzen.

^bDie Konzentration wurde photometrisch bei 260 nm mit einem Eppendorf Bio-Photometer gemessen.

^cDie Gesamt-Ausbeute wurde zuvor auf die jeweils eingesetzte Menge an gefrorenem Gewebe bezogen (hier: 50 mg).

^dDie Reinheit der isolierten DNA wurde mit der OD₂₆₀/OD₂₈₀-Ratio ermittelt. Werte unter 1,8 deuten auf Verunreinigungen mit Proteinen oder Phenol hin. Ein RNase A Inkubationsschritt wurde bei den beiden kommerziellen Kits angewendet.

3.2.2 Evaluation verschiedener RNA-Extraktionsmethoden

Für die Evaluation der RNA-Extraktionsmethoden wurden die Resultate aus der Aufarbeitung von jeweils 50 mg bzw. 25 mg (HighPure[®]-Protokoll) tiefgefrorenem Myokardgewebe aus einem Testexplantat im Doppelansatz verglichen. Auch der Vergleich der Parameter zwischen der konventionellen RNA-Extraktionsmethode nach Chirgwin et al. (1979) und fünf verschiedenen kommerziellen Kits zeigt, dass die konventionelle Methode in den Gewebeaufarbeitungen wesentlich höhere RNA-Konzentrationen und Ausbeuten ergeben hat (Tab. 9). Der Reinheitsgrad ist mit 1,8 optimal im Vergleich zu den kommerziellen Verfahren mit dem peqGOLD[®]- bzw. HighPure[®]-Kit, die mit ihren sehr niedrigen Reinheitsgraden auf erhebliche Verunreinigungen durch Protein- oder Phenolreste hinweisen. Für den Vergleich der RNA-Extraktionsmethoden wurden unter anderem die RNA-Extrakte auf mögliche DNA-Kontamination, die während der Präparation entstanden ist, getestet. Hierzu wurden die Extrakte fluorometrisch auf ihren DNA-Gehalt mit Hilfe des PicoGreen[®] dsDNA Quantitation Reagens (Molecular Probes) getestet. Vor der Konzentrationsbestimmung der Extrakte mussten zuvor gemäß Herstellerangaben Standardkurven mit Lambda-DNA-Standard in verschiedenen Konzentrationen erstellt werden, um nach der fluorometrischen Bestimmung der Extrakte daraus die jeweiligen exakten DNA-

Konzentrationen ermitteln zu können [siehe Kap. 2.2.3.2]. Lediglich bei dem RNAzol[®] B-Verfahren konnten teilweise DNA-Übertragungen nachgewiesen werden. Bei der konventionellen Methode wurde unter anderem keine Kontamination von DNA in das Extrakt festgestellt, was auf die saubere Trennung von DNA und RNA durch den UZF-Schritt zurückgeführt werden kann [siehe Kap. 2.2.2.4]. Anders als vom Hersteller angegeben, scheint der Total Quick[®] RNA Cells and Tissues Kit, trotz Proteinase K-Verdau und selbst mit geringeren Gewebeeinwaagen (25 mg), für Lysate aus dem fibrogenen Herzmuskelgewebe nicht geeignet zu sein. Die Minisäulen aus dem Kit waren stets mit dem sehr konsistenten Lysat verstopft, daher konnten für diese Methode keine Parameter ermittelt werden (Tab. 9).

Tabelle 9: Vergleich der Parameter zur RNA-Isolierung von sechs verschiedenen RNA-Extraktionsmethoden.^a

Methode	[RNA]^b (µg/ml)	Ausbeute^c (µg/mg Gewebe)	Reinheit^d (OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀ -Ratio)	DNA-Anteil^e (%)
GTC-Methode (Chirgwin et al., 1979)	92,3 ± 5,5	0,28 ± 0,02	1,80 ± 0,02	ND
RNAzol [®] B (Cinna/Tel-Test)	23,1 ± 4,5	0,07 ± 0,01	1,78 ± 0,02	2,2
peqGOLD RNAPure [®] (Pqrlab)	9,9 ± 0,6	0,03 ± 0,00	1,32 ± 0,00	ND
RNeasy [®] Protect (Qiagen)	27,2 ± 0,1	0,08 ± 0,00	2,14 ± 0,01	ND
HighPure [®] RNA Tissue Kit (Boehringer-Mannheim)	33,4 ± 7,6	0,10 ± 0,02	1,00 ± 0,03	ND
Total Quick RNA [®] Kit (Talent)	ND	ND	ND	ND

^aDie Ergebnisse repräsentieren Mittelwerte mit Varianzen aus den jeweiligen Doppelansätzen. ND= nicht detektierbar.

^bDie Konzentration wurde photometrisch bei 260 nm mit einem Eppendorf Bio-Photometer gemessen.

^cDie Gesamt-Ausbeute wurde zuvor auf die jeweils eingesetzte Menge an gefrorenem Gewebe bezogen (50 mg bei allen Methoden, außer beim HighPure[®]-Verfahren mit 25 mg gemäß Herstellerangaben).

^dDie Reinheit der isolierten RNA wurde mit der OD₂₆₀/OD₂₈₀-Ratio ermittelt. Werte unter 1,8 deuten auf Verunreinigungen mit Proteinen oder Phenol hin.

^eDNA wurde mit dem PicoGreen[®] dsDNA Quantitation Reagents (Molecular Probes) fluorometrisch nachgewiesen.

Die Qualität der verschiedenen RNA-Präparationen wurde anhand der 28-S- und 18-S-rRNA-Banden im 1 %-igen Agarosegel überprüft. Hierbei wurde stets die gleiche Menge an RNA eingesetzt (Abb. 14). Die unterschiedlichen Konzentrationen in den jeweiligen Präparationen konnten anhand der Bandenintensität abgelesen werden. Mögliche DNA-Kontamination (Pfeilmarkierung) konnte ebenfalls nachgewiesen werden.

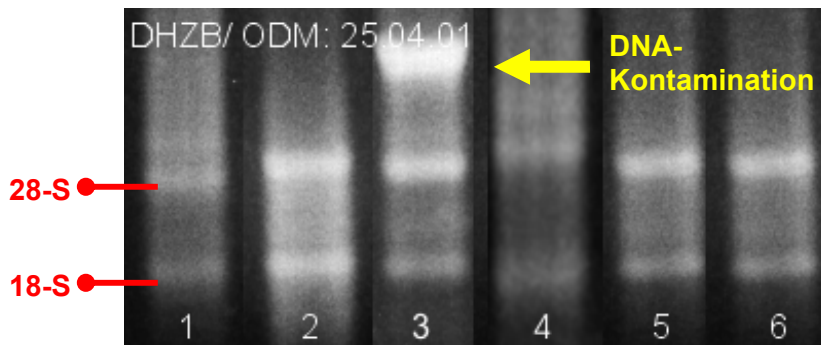


Abbildung 14: Gelelektrophoretische Darstellung von unterschiedlich präparierten RNA-Proben aus gefrorenem Herzmuskelgewebe. Die RNA-Präparationen (je 200 ng) wurden auf einem 1 %-igen, mit Ethidiumbromid gefärbten Agarosegel aufgetragen. Spur 1: 18-S-/28-S-rRNA-Marker (Sigma-Aldrich), Spur 2: GTC-Präparation, Spur 3: RNAzol[®] B-Präparation, Spur 4: peqGOLD[®]-Präparation, Spur 5: RNeasy[®]-Präparation, Spur 6: HighPure[®]-Präparation. Die 28-S- und die 18-S-rRNA-Banden sind durch Balken entsprechend markiert. Der Pfeil im Bild weist auf eine DNA-Kontamination in der RNAzol[®] B-Präparation hin. Bild: O. Donoso Mantke (ODM)

3.2.3 Daten zur Nukleinsäurepräparation aller untersuchten Gewebeproben

Die Guanidinisothiocyanat-Methode nach Chirgwin et al. (1979) für die RNA-Isolierung und die modifizierte Phenol-Chloroform-Methode nach Sambrook et al. (1989) für die DNA-Isolierung wurden aufgrund der Ergebnisse aus dem Methodenvergleich für die Extraktion von Nukleinsäuren aus Myokard- und Herzklappengewebe in der vorliegenden Arbeit angewendet.

Die folgenden Daten der Gewebepreparationen zur Isolierung von Nukleinsäuren für die vorliegende Studie zeigen, dass je nach Größe des Explantats (z.B. Kind oder Erwachsener) sehr verschiedene Probeneinwaagen mit den beiden ausgewählten Methoden bearbeitet wurden. Die Parameter für Konzentration, Ausbeute und Reinheitsgrad waren für alle Präparationen im akzeptablen Bereich (Tab. 10).

Tabelle 10: Daten der Nukleinsäurepräparation aller untersuchten Gewebeproben (n= 536).

Gewebeeinwaage [mg]:	
minimal	10
maximal	1750
Mittelwert	451,8
Daten zur DNA-Extraktion*:	
Konzentration [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	52,9
Gesamt-Ausbeute [μg]	12,1
Reinheitsgrad ($\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ -Ratio)	1,5
Daten zur RNA-Extraktion*:	
Konzentration [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	1254,4
Gesamt-Ausbeute [μg]	142,6
Reinheitsgrad ($\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ -Ratio)	1,7

* Mittelwerte

Vor allem die RNA-Präparationen waren von guter Qualität, wie in Abbildung 15 anhand der klaren und scharf umrissenen Banden (keine Ausdünnung, keine Schlierenbildung) exemplarisch dargestellt wird.

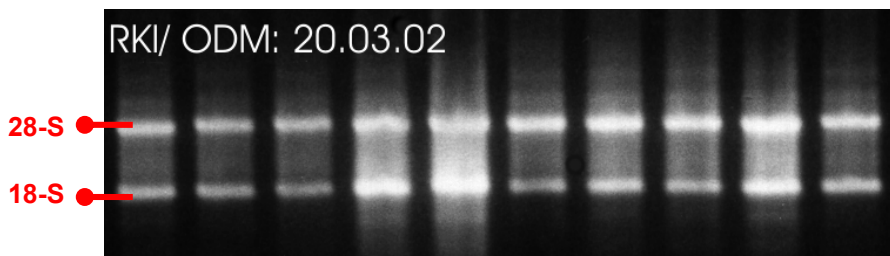


Abbildung 15: RNA aus unterschiedlichen Gewebeproben (Beispiele).

Die 28-S- und die 18-S-rRNA-Banden sind durch Balken entsprechend markiert.
Bild: O. Donoso Mantke

Die extrahierten Nukleinsäuren wurden in flüssigem Stickstoff gelagert und waren somit sehr lange haltbar, was anhand einer aliquotierten RNA-Probe zu unterschiedlichen Zeitpunkten (nach 1, 3, 6, 12, 24 Monaten) mittels Gelelektrophorese überprüft wurde (Lagerungsversuch). Die Qualität der RNA-Banden blieb während der gesamten Lagerungszeit konstant gut; es war kein exonukleolytischer Abbau sichtbar (keine Darstellung).

3.3 Nachweis viraler Nukleinsäuresequenzen in Myokard- und Herzklappengewebe

Mit Hilfe geeigneter PCR-Methoden [siehe Kap. 2.2.4] wurde extrahierte RNA bzw. DNA aus Myokard- und Herzklappengewebeproben, jeweils im Doppelansatz, auf die Präsenz spezifischer Genomsequenzen kardiotoxischer Viren (EV, ADV, HCMV, PVB19, Influenzaviren und Hantaviren) getestet. Die EV-positiven Amplifikate wurden zusätzlich aus dem 1,5 %-igen Agarosegel extrahiert und anschließend zur Bestätigung und näheren Typisierung sequenziert. Einige PCR-positive Befunde wurden außerdem mittels der ISH überprüft, um die Lokalisation der viralen Erreger anhand ihrer nachgewiesenen spezifischen Nukleinsäuresequenzen im Gewebe näher bestimmen zu können. Für den Nachweis von PVB19 wurde in dieser Arbeit eine quantitative real-time PCR etabliert. Alle getesteten Proben waren positiv für Nukleinsäuresequenzen der Referenzgene β -Aktin, GAPDH und/oder RNA-Polymerase II, was darauf schließen lässt, dass alle Proben in den jeweiligen PCR-Ansätzen amplifizierbar waren.

3.3.1 Nachweis viraler Nukleinsäuren in Myokardproben aus Standardpositionen

Tabelle 11 zeigt im Überblick, dass spezifische Nukleinsäuresequenzen verschiedener kardiotoxischer Viren mittels der PCR in 57 von 177 (32 %) untersuchten Myokardproben verschiedener Standardpositionen (LVVW, LVHW, Septum, RV), aus 34 von 73 HTx-Explantaten (47 %) amplifiziert werden konnten. Ebenso wurden virale Amplifikate in 107 von 272 untersuchten Myokardproben (39 %) verschiedener Standardpositionen aus 48 von 80 Donor-Explantaten (60 %) nachgewiesen. Die Donor-Gruppe wurde für die sog. Altersherzstudie in zwei Untergruppen aufgeteilt, um die Prävalenz von Nukleinsäuresequenzen kardiotoxischer Viren zwischen den Spendern mit einem Spenderalter unter 65 Jahren ($\text{Donor}_{<65}$) und den Spendern mit einem Spenderalter über 65 Jahren ($\text{Donor}_{>65}$) vergleichen zu können. Signifikant hohe Nachweisraten konnten für die $\text{Donor}_{>65}$ -Untergruppe sowohl anhand der Explantate als auch anhand der Myokardproben belegt werden (Tab. 11). In dieser Untergruppe wurden häufiger virale Nukleinsäuresequenzen nachgewiesen als im Vergleich zu den Explantaten bzw. Myokardproben der HTx-Patienten ($\chi^2 = 7,95$;

P= 0,005 bzw. $\chi^2= 9,00$; P= 0,003) oder der Donor_{<65}-Untergruppe ($\chi^2= 5,40$; P= 0,02 bzw. $\chi^2= 6,82$; P= 0,009).

Tabelle 11:

Positive PCR-Ergebnisse der untersuchten Explantate und Myokardproben.*

	EV	ADV	HCMV	PVB19	Gesamt
Explantate:					
HTx (n= 73)	15 (21 %)	15 (21 %)	14 (19 %)	7 (10 %)	34 (47 %)
Donor _{<65} (n= 65)	17 (26 %)	7 (11 %)	15 (23 %)	7 (11 %)	35 (54 %)
Donor _{>65} (n= 15)	9 (60 %)†	0	4 (27 %)	1 (7 %)	13 (87 %)†
Myokardproben:					
HTx (n= 177)	21 (12 %)	18 (10 %)†	17 (10 %)	12 (7 %)	57 (32 %)
Donor _{<65} (n= 215)	49 (23 %)	7 (3 %)	17 (8 %)	12 (6 %)	76 (35 %)
Donor _{>65} (n= 57)	27 (47 %)†	0	4 (7 %)	1 (2 %)	31 (54 %)†

*Prozentwerte gerundet und bezogen auf die jeweiligen Explantat- bzw. Probenzahlen.

Mögliche Mehrfach-Nachweise verschiedener viraler Erreger sind in den Daten enthalten.

Donor_{<65}, Herzspender unter 65 Jahre alt; Donor_{>65}, Herzspender über 65 Jahre alt.

†Statistisch relevante Ergebnisse (P<0,05).

In 15 HTx-Explantaten (21 %) konnte enterovirale RNA (Abb. 16a), in weiteren 15 Explantaten (21 %) DNA von ADV (Abb. 16b), in 14 Explantaten (19 %) DNA von HCMV (Abb. 16c) und in sieben Explantaten (10 %) DNA von PVB19 nachgewiesen werden. Des Weiteren konnten in 26 (32,5 %) von insgesamt 80 untersuchten Donor-Explantaten EV-spezifische Sequenzen, in sieben Explantaten (9 %) DNA von ADV, in 19 Explantaten (24 %) DNA von HCMV und in acht Explantaten (10 %) parvovirale DNA nachgewiesen werden. Signifikant höhere Nachweisraten wurden für Enteroviren in Explantaten ($\chi^2= 9,90$; P= 0,007) und Myokardproben ($\chi^2= 32,43$; P<0,001) aus Herzspendern mit einem Spenderalter über 65 Jahren gegenüber den anderen Patientengruppen ermittelt. Ebenso für Adenoviren in Myokardproben ($\chi^2= 12,67$; P= 0,002) aus HTx-Patienten. Alle untersuchten Proben waren negativ für Influenza- und Hantaviren. In insgesamt 26 Explantaten kam es zu einem Nachweis von mehr als einem kardiotropen Virustyp: in der HTx-Gruppe konnten 13 Doppelnachweise und zwei Dreifach-Nachweise ermittelt werden; in der Donor_{<65}-Untergruppe neun Doppelnachweise und ein Dreifach-Nachweis; in der Donor_{>65}-Untergruppe ein Doppelnachweis. Signifikante Unterschiede bezüglich der Verteilung von kardiotropen Vi-

ren zwischen den verschiedenen Standardpositionen im Herzen waren nicht festzustellen. Eine Ausnahme bildete das Septum, in dem tendenziell eine stärkere Präsenz von HCMV in HTx-Patienten ($\chi^2= 7,43$; $P= 0,06$) und Herzspendern ($\chi^2= 6,52$; $P= 0,09$) festzustellen war.

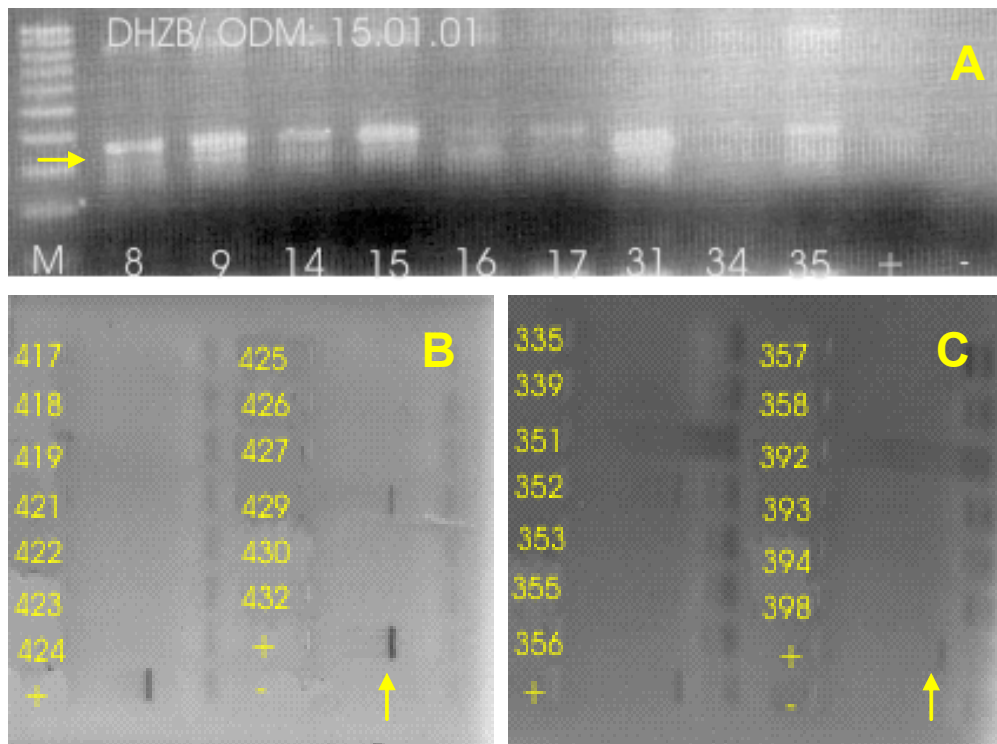


Abbildung 16: Nachweis von PCR-Produkten mittels Agarose-Gelelektrophorese.

Pfeil markiert jeweils die Höhe der positiven Banden:

A Enterovirus (Fragmentgröße 340 bp)*

B Adenovirus (Fragmentgröße 307 bp)**

C HCMV (Fragmentgröße 133 bp)**

Gelbilder: * O. Donoso Mantke; ** AG Dr. S. Prösch, Charité, Berlin

3.3.2 Nachweis viraler Nukleinsäuren im Herzklappengewebe

In den Gewebeproben aus Herzklappen (58 subvalvuläre Myokardproben und 29 Non-Koronar-Herzklappen) von insgesamt 30 ausgewählten, potenziellen Herzklappenspendern (8 HTx-Patienten, 13 Donor_{<65}, 9 Donor_{>65}) konnten ebenfalls virale Nukleinsäuresequenzen nachgewiesen werden (Tab. 12). Neun von 14 subvalvulären Myokardproben (64 %) aus sieben HTx-Explantaten wiesen positive Amplifikate auf, ebenso 28 von 44 subvalvulären Myokardproben (64 %) aus 22 Donor-Explantaten,

die wiederum in zwei Subgruppen bezüglich der sog. Altersherzstudie, wie oben bereits erwähnt, unterteilt wurden. Außerdem waren zwei von sieben untersuchten Herzklappen (29 %) aus sog. Dominoherzen von HTx-Patienten und 13 von 22 untersuchten Herzklappen (59 %) aus Donor-Explantaten positiv in der PCR-Diagnostik. Signifikante Unterschiede bezüglich der Nachweisrate von viralen Nukleinsäuresequenzen zwischen der HTx-Gruppe und den beiden Donor-Untergruppen konnten hier nicht nachgewiesen werden. Andererseits scheint die Prävalenz von viralen Nukleinsäuresequenzen in Herzklappen-Gewebeproben (insbesondere subvalvulären Myokardproben) von Herzklappenspendern (HTx-Patienten und Donor_{<65}) tendenziell höher zu liegen als in Myokardproben aus anderen Herzklokalisationen (vergleiche mit Tab. 11).

Tabelle 12:

Positive PCR-Ergebnisse der Herzklappen-Gewebeproben.*

	EV	ADV	HCMV	PVB19	Gesamt
subvalvuläre Myokardproben: (Aorten- bzw. Pulmonalarterienklappe)					
HTx (n= 14)	3 (21 %)	2 (14 %)	2 (14 %)	2 (14 %)	9 (64 %)
Donor _{<65} (n= 26)	9 (35 %)	0	14 (54 %) ^T	3 (12 %)	18 (69 %)
Donor _{>65} (n= 18)	7 (39 %)	0	6 (33 %)	3 (17 %)	10 (56 %)
Non-Koronar-Klappenproben:					
HTx (n= 7)	1 (14 %)	0	0	1 (14 %)	2 (29 %)
Donor _{<65} (n= 13)	5 (38 %)	0	5 (38 %)	1 (8 %)	9 (69 %)
Donor _{>65} (n= 9)	0	0	1 (11 %)	3 (33 %)	4 (44 %)

*Prozentwerte gerundet und bezogen auf die jeweiligen Probenzahlen.

Mögliche Mehrfach-Nachweise verschiedener viraler Erreger sind in den Daten enthalten.

Donor_{<65}, Herzspender unter 65 Jahre alt; Donor_{>65}, Herzspender über 65 Jahre alt.^T $\chi^2 = 6,28$; P= 0,04

Für die Untersuchung von Herzklappen-Gewebeproben kann festgehalten werden, dass 16 von 30 untersuchten Explantaten (53 %) potenzieller Herzklappenspender entweder in den subvalvulären Myokard- oder in den Herzklappenproben positiv für enterovirale Nukleinsäuresequenzen waren, zwei von 30 Explantaten (7 %) für DNA von ADV, 15 von 30 Explantaten (50 %) für DNA von HCMV und 12 von 30 Explantaten (40 %) für parvovirale DNA. Alle untersuchten Proben waren ebenfalls wie

die übrigen untersuchten Myokardproben aus den Standardpositionen negativ für Influenza- und Hantaviren. Insgesamt waren 37 subvalvuläre Myokardproben (64 %) und 15 Herzklappen (52 %) positiv für Nukleinsäuresequenzen mindestens eines kardiotropen viralen Erregers. In 11 Fällen wurden Doppelnachweise und in drei Fällen Dreifach-Nachweise mit mehr als einem kardiotropen Virustyp ermittelt.

3.3.3 Sequenzanalysen der EV-positiven Amplifikate

Die Sequenzanalysen (Abb. 17) aller EV-spezifischen-Amplifikate (n= 122) aus dieser Studie haben ergeben, dass 85 % der gefundenen Nukleinsäuresequenzen dem sog. B-Cluster (Coxsackievirus B-ähnliche Viren) der Enteroviren zugeordnet werden können. Hier wurden als „erster Treffer“ bei der Alignmentstudie mit BLAST Coxsackieviren B 1, 2, 4 und/oder 5 sowie Echoviren 6, 11 oder 13 identifiziert. Weitere Sequenzen tendierten eher zum sog. A-Cluster (Coxsackievirus A16-ähnliche Viren) mit Coxsackievirus A 2 oder Enterovirus 71 als erste Näherung in der Alignmentstudie.

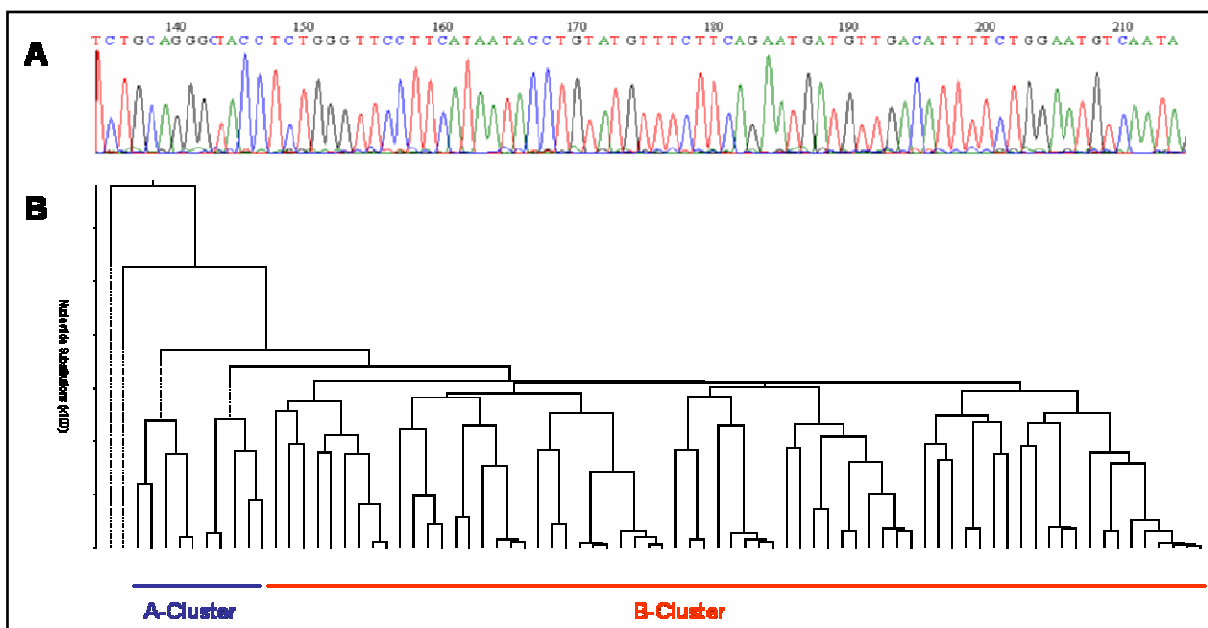


Abbildung 17: Sequenzanalysen der EV-spezifischen Amplifikate.

A Beispiel einer Sequenz (Ausschnitt). **B** Phylogenetische Auswertung aller EV-spezifischen Sequenzen nach der jeweiligen ersten Näherung in der Alignmentstudie (Neighbor-joining-Methode).

Cluster A: Coxsackievirus A16-ähnliche Viren; Cluster B: Coxsackievirus B-ähnliche Viren.

3.3.4 Etablierung der quantitativen real-time PCR für den Nachweis von PVB19

Für den quantitativen Nachweis von PVB19 DNA in Herzmuskel- und Herzklappengewebe wurde eine neue PCR nach dem TaqMan[®]-Prinzip etabliert. Primer und Sonde wurden nach generellen Maßstäben für das Primer- und Sondendesign ausgewählt. Die Größe des amplifizierten Fragments betrug 160 bp. Eine Verdünnungsreihe mit 10-fach-Verdünnungen des pPVB19-CR2.1T-Plasmids wurde zur Erstellung einer Standardkurve (Abb. 18) verwendet: pro Verdünnung wurden sechs Ansätze pipettiert. Das Standardplasmid wurde zuvor mit dem Internationalen PVB19 DNA-Standard (99/800) eingestellt und überprüft: eine Plasmidkopie bzw. ein Genomäquivalent (ge) entspricht einer Internationalen Einheit (IU).

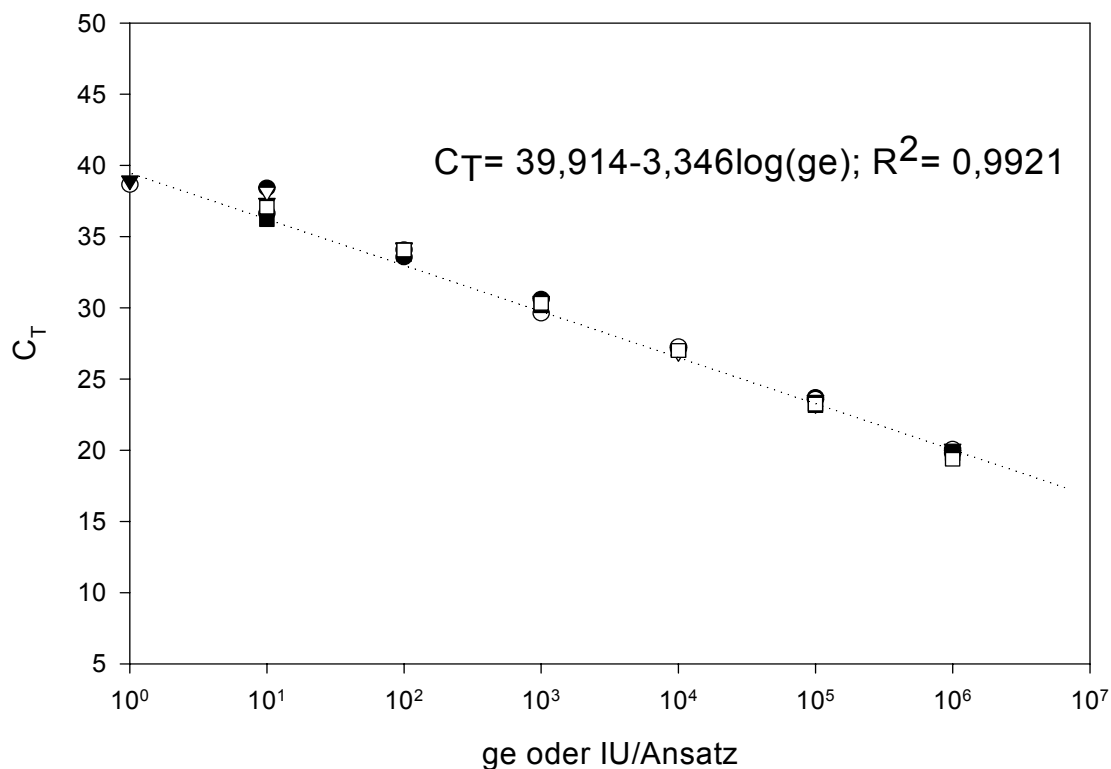


Abbildung 18: Standardkurve für die quantitative real-time PCR zum Nachweis von PVB19. Es wurden PCR-Läufe mit 10^0 bis 10^6 Plasmidkopien des Standardplasmids jeweils in 6-fach Bestimmungen ($\blacktriangle, \triangle, \blacksquare, \square, \bullet, \circ$) durchgeführt. Gezeigt wird der C_T -Wert in Abhängigkeit von der Anzahl der Kopien. Der Korrelationskoeffizient beträgt 0,9921. Für die PCR wurde eine Effizienz von 99 % berechnet.

Die Resultate der Standardkurve zeigen eine hohe lineare Korrelation für die PCR in einem Bereich von sieben 10er-Potenzen (10^0 bis 10^6 ge/Ansatz). Die Nachweisgrenze lag bei ca. 10^1 Plasmidkopien, da alle sechs Ansätze bei 10^1 noch nachgewiesen wurden und lediglich zwei von sechs Ansätzen bei 10^0 . Des Weiteren wurden ein sog. Intra-Assay-spezifischer- bzw. Inter-Assay-spezifischer-Test mit drei positiven Plasmidkontrollen (10^1 , 10^2 und 10^3 ge/Ansatz) jeweils in 6-fach-Bestimmungen durchgeführt, um die Messabweichungen innerhalb einer Messung an einem Tag bzw. zwischen drei verschiedenen Messungen an drei verschiedenen Tagen zu bestimmen. Die Mittelwerte für den C_T -Wert sowie die jeweiligen Standardabweichungen sind in Tabelle 13 dargestellt.

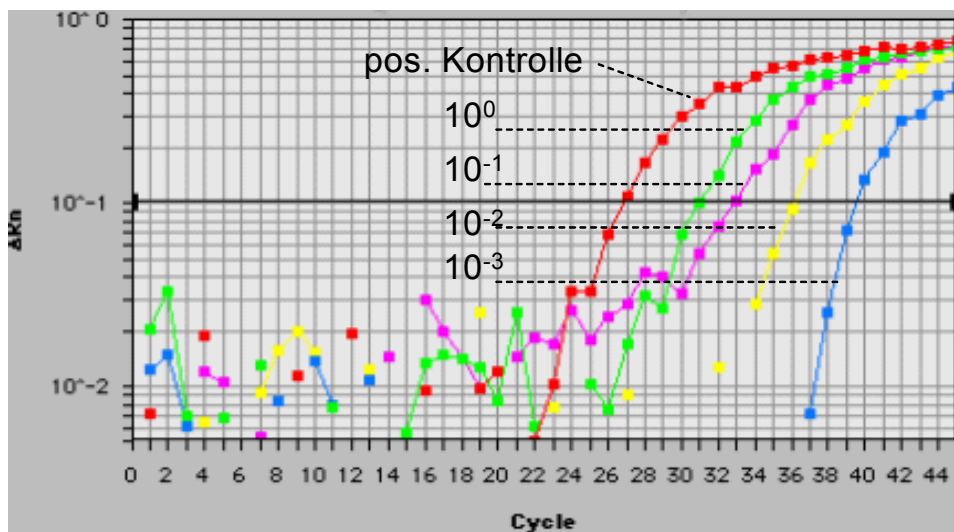
Tabelle 13: Intra-Assay-spezifischer und Inter-Assay-spezifischer Test für die quantitative real-time PCR zum Nachweis von PVB19.

	Kontrolle 1	Kontrolle 2	Kontrolle 3
ge/Ansatz	1000	100	10
Intra-Assay			
C_T^*	30,26	33,98	37,31
Stabw	0,35	0,27	0,86
Inter-Assay			
C_T^*	30,83	34,31	37,69
Stabw	0,38	0,57	2,39

* Mittelwert; Stabw= Standardabweichung.

Tests mit PVB19-Plasmid-DNA gespickten Myokardlysaten haben gezeigt, dass die DNA direkt nach der Extraktion aus dem Gewebe getestet werden kann, da kein inhibitorischer Effekt für die real-time PCR durch gewebeigene Substanzen nachgewiesen wurde (Abb. 19a). Die Spezifität der Methode wurde durch die Verwendung anderer Nicht-PVB19-Kontrollen (Echovirus 30, Adenovirus, HCMV, Influenzaviren) überprüft. Keine dieser Viruskontrollen führte zu einem falsch-positiven Signal in der getesteten real-time PCR (Abb. 19b). Ebenso waren 50 extrahierte DNA-Proben von gesunden Blutspendern in der Etablierung der Methode negativ.

A PVB19 Inhibitionstest



B PVB19 Spezifitätstest

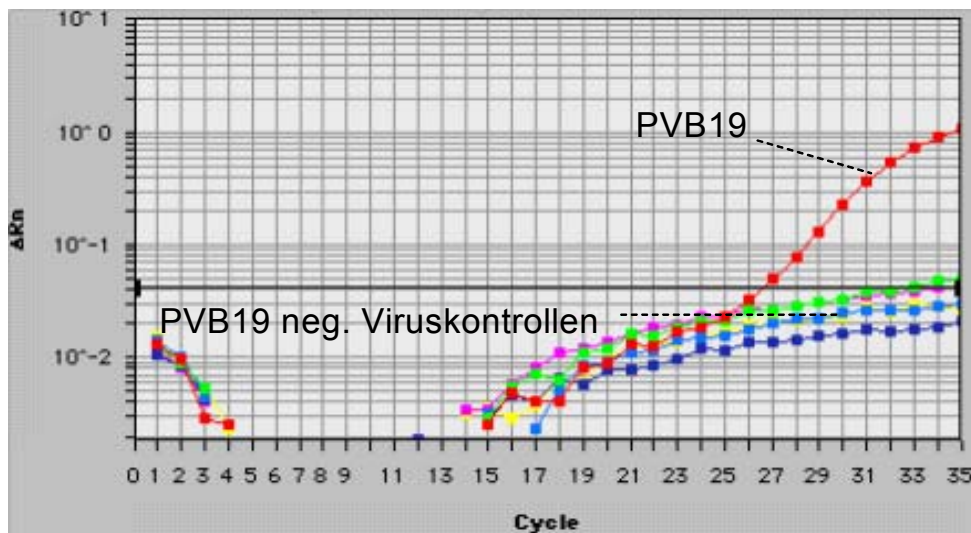


Abbildung 19: Tests zur Etablierung der quantitativen real-time PCR zum Nachweis von PVB19.

A Inhibitionstest:

PVB19-negative Myokardlysate wurden mit jeweils 100 μ l 10-fach-Verdünnungen Plasmid-DNA (10^0 - 10^{-3}) gespikkt. Als Kontrolle wurde DNA von pPVB19-CR2.1T-Plasmid verwendet. Alle Verdünnungen wurden im Myokardlysate nachgewiesen.

B Spezifitätstest:

Die Methode wurde auf ihre Spezifität mit verschiedenen Viruskontrollen getestet: PVB19 (Plasmid-DNA), Nukleinsäureisolate aus Zellkulturüberständen von EV (Echovirus 30, Stamm 00-588/1 Rostock), Adenovirus (Serotyp 5), HCMV (AD169), Influenzavirus Typ A (Moscow) und Typ B (Hong Kong). Nur PVB19 DNA wurde durch die etablierte PCR nachgewiesen.

Die quantitative Auswertung aller positiven PVB19-Ergebnisse dieser Studie hat ergeben, dass die Viruslast für PVB19 zwischen 0,02 und 18922,64 ge/1000 Kopien Aktin-DNA lag, bei einem Mittelwert von 664,60 ge/1000 Kopien Aktin-DNA, was eher auf das Vorliegen von persistierenden bzw. chronischen Infektionen hinweist. Für die anderen kardiotropen Viren EV, ADV und HCMV wurden ähnliche Werte anhand der Bandenintensitäten in der Gelelektrophorese geschätzt (1 bis 10000 Kopien viraler Nukleinsäuren).

3.3.5 Ergebnisse der *In situ*-Hybridisierung

Einige ausgewählte PCR-Befunde wurden zusätzlich mit Hilfe der ISH geprüft, um die nachgewiesenen viralen Nukleinsäuren im Gewebe genauer zu lokalisieren. Dazu wurden Myokardproben gleicher Herzlokalisationen entsprechend präpariert. Eine von acht EV-RNA-positiven Proben war positiv für EV in der ISH (12,5 %), eine von sechs für ADV PCR-positiven Proben war ebenfalls positiv in der ISH (17 %), eine von neun PCR-positiven Proben wurde ebenfalls für HCMV bestätigt (11 %) und acht von zehn PCR-positiven Proben für PVB19 (80 %) (Abb. 20).

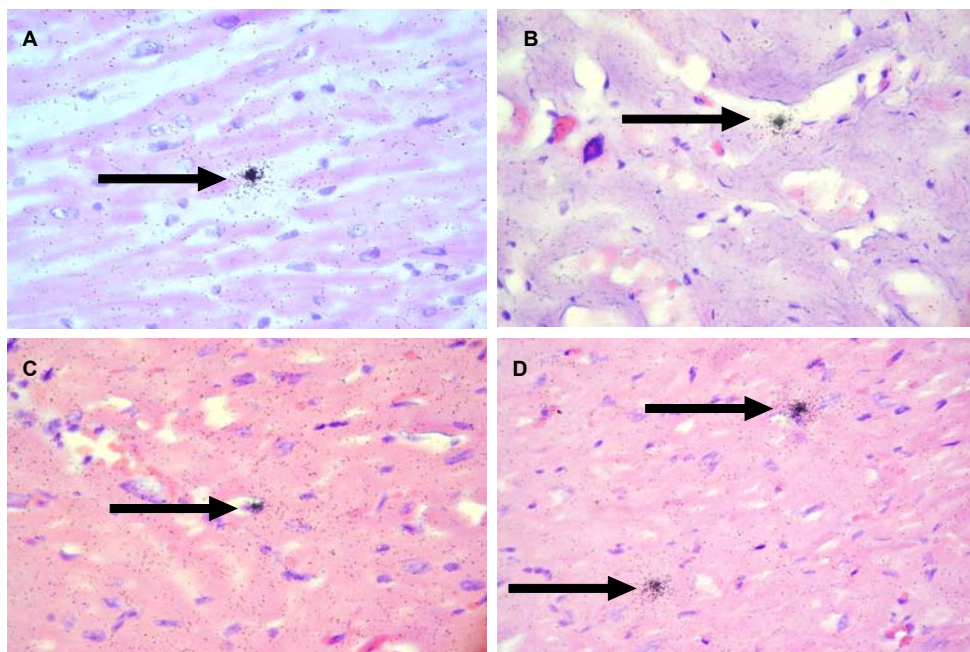


Abbildung 20: Nachweis von Nukleinsäuresequenzen kardiotroper Viren mittels ISH.

Pfeile markieren jeweils eine Gruppe von Silberkörnern, in deren Zentrum eine Nukleinsäuresonde hybridisiert hat. Nachweise sind abgebildet für:

A Enterovirus, **B** Adenovirus, **C** HCMV, **D** Parvovirus B19. Vergrößerung ca. 200x.

Bilder: PD Dr. K. Klingel, AG Prof. R. Kandolf, Universität Tübingen

Die lichtmikroskopische Auswertung der Präparate für die ISH hat ergeben, dass es sich bei den mit kardiotropen Viren infizierten Zellen um sog. interstitielle Zellen handelt wie mononukleäre Entzündungszellen, Fibroblasten oder Endothelzellen kleinerer Blutgefäße (Venolen bzw. Arteriolen).

3.4 Vergleich der Ergebnisse aus der Serologie und Histopathologie mit denen aus der PCR-Diagnostik

Um Aussagen bezüglich der Nützlichkeit und Zuverlässigkeit einzelner diagnostischer Methoden zum Nachweis möglicher viraler Infektionen im Herzmuskelgewebe treffen zu können, wurden die Ergebnisse verschiedener kommerzieller ELISA-Tests (als weiterer virusspezifischer Marker) sowie die der Histopathologie mit denen der PCR verglichen.

3.4.1 Serologische Befunde versus PCR

Seitens des DHZB lagen serologische Befunde von 140 Patienten vor, deren Seren routinemäßig auf das Vorhandensein von HCMV-spezifischen Antikörpern (IgM und IgG) getestet wurden. Die Auswertung dieser serologischen Daten im Vergleich mit den jeweiligen PCR-Resultaten hat ergeben, dass 23/140 Patienten (16 %) seronegativ für HCMV-spezifische Antikörper waren, aber im Myokardgewebe virusspezifische Nukleinsäuresequenzen aufwiesen. Des Weiteren konnten von 48 Patienten Seren für eine zusätzliche serologische Untersuchung auf EV-, ADV- und PVB19-spezifische Antikörper mittels kommerzieller ELISA-Tests gewonnen werden. Auch hier wurden zu den PCR-Befunden diskordante Ergebnisse ermittelt: für EV waren 13 von 48 Patienten (27 %) und für ADV sowie PVB19 jeweils zwei von 48 Patienten (4 %) seronegativ, aber positiv in der PCR-Diagnostik der jeweiligen Myokardproben.

3.4.2 Histopathologische Befunde versus PCR

Die histopathologischen Untersuchungen des Homograflabors am DHZB dienen in erster Linie dazu, entzündliche Herzmuskelerkrankungen unterschiedlicher Genese im Myokard beider Ventrikel und des Septums mit absoluter Sicherheit ausschließen zu können, um sicherzustellen, dass myokardiale inflammatorische Veränderungen

keinen Einfluss auf die Qualität der Funktion der Klappenhomografts nehmen können. Außerdem wurden durch die histomorphologischen Untersuchungen des Myokards, aber auch insbesondere der Koronararterien, Entscheidungen des entnehmenden Ärzteteams bezüglich der Verwendung eines Spenderorgans bestätigt bzw. nicht bestätigt (z.B. durch Beurteilung des Ausmaßes einer erasteten Koronararteriosklerose oder durch Beurteilung von Schäden im Rahmen der Spenderkonditionierung). Auch wurden neue Erkenntnisse und Ergebnisse von Myokard und von Koronararterien in unterschiedlichen Altersperioden von abgelehnten „normalen“ Spenderorganen, die für eine Transplantation nicht in Frage kamen, gesammelt. Die histopathologischen Untersuchungen eines Explantats ergaben letztendlich einen definitiven Befund (Zustandsbewertung), der durchaus von der anfangs erhobenen klinischen Diagnose abweichen konnte.

Tabelle 14 zeigt im Überblick die histopathologischen Befunde der Myokardproben aus Standardpositionen (LVVW, LVHW, RV, Septum). Aufgelistet sind alle untersuchten 153 Explantate dieser Studie, unterteilt nach HTx-Patienten und Herzspendern mit einem Spenderalter unter bzw. über 65 Jahren. Darüber hinaus werden die histopathologischen Befunde mit den jeweiligen PCR-Ergebnissen verglichen, um eventuelle Zusammenhänge zwischen dem Nachweis von viralen Nukleinsäuresequenzen und dem histologischen Zustand des Myokards zu ermitteln.

Tabelle 14: Vergleich zwischen den histopathologischen Befunden und den PCR-Ergebnissen.*

Histopathologische Befunde (n= 153)	Nachweis viraler Nukleinsäuresequenzen (PCR)											
	HTx (n= 73)				Donor _{<65} (n= 65)				Donor _{>65} (n=15)			
	EV	ADV	HCMV	PVB19	EV	ADV	HCMV	PVB19	EV	ADV	HCMV	PVB19
DKMP (n= 27)	10/27	9/27	6/27	5/27	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
KHK (n= 10)	2/9	2/9	3/9	0/9	∅	∅	∅	∅	0/1	0/1	1/1	0/1
IKMP (n= 4)	0/4	0/4	1/4	1/4	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
RKMP (n= 2)	0/2	0/2	0/2	0/2	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
Myokarditis (n= 7)	1/4	0/4	0/4	0/4	1/3	0/3	1/3	1/3	∅	∅	∅	∅
Hypertrophie (n= 75)	2/20	3/20	3/20	1/20	15/42	6/42	11/42	4/42	9/13	0/13	3/13	1/13
o.B. (n= 13)	∅	∅	∅	∅	1/13	1/13	2/13	2/13	∅	∅	∅	∅
keine Daten (n= 15)	0/7	1/7	1/7	0/7	0/7	0/7	1/7	0/7	0/1	0/1	0/1	0/1

* Gezeigt werden jeweils die Anzahl der PCR-positiven Explantate/Anzahl der Explantate mit einem definitiven histopathologischen Befund. Mögliche Mehrfach-Nachweise verschiedener viraler Erreger sind in den Daten enthalten. Donor_{<65}, Herzspender unter 65 Jahre alt; Donor_{>65}, Herzspender über 65 Jahre alt.

o.B.= ohne wesentlichen pathologisch-anatomischen Befund; ∅ = kein diagnostischer Befund.

Mit Ausnahme von sieben HTx-Explantaten, für die keine histopathologischen Daten vorlagen, waren alle übrigen 66 explantierten Herzen von HTx-Patienten deutlich hypertrophisch (Tab. 14). Häufig (60 von 66 Explantaten; 91 %) waren insbesondere im linksventrikulären Myokard typische Anzeichen struktureller Umbildungen zu erkennen, wie linksventrikuläre Dilatation und Herzwandverdünnung mit mittelgradigen bis schweren myokardialen Folgeschäden. Hiervon konnte in insgesamt 46 HTx-Explantaten das Vorliegen einer Herzerkrankung histologisch einwandfrei belegt werden: 27 Herzen mit DKMP (41 %), neun mit KHK (14 %), vier mit IKMP (6 %), zwei mit RKMP (3 %) und vier mit Myokarditis (6 %). Vergleicht man diese Ergebnisse (Abb. 21) mit den anfangs erhobenen klinischen Diagnosen (Abb. 11), zeigt sich einerseits, dass nicht immer eine zuvor in der Klinik festgestellte DKMP bzw. KHK histologisch bestätigt werden konnte, sondern lediglich ein hypertrophischer Zustand des Herzens vorlag. Andererseits war der Anteil einer histologisch nachgewiesenen Myokarditis geringfügig höher im Vergleich zu den klinischen Daten.

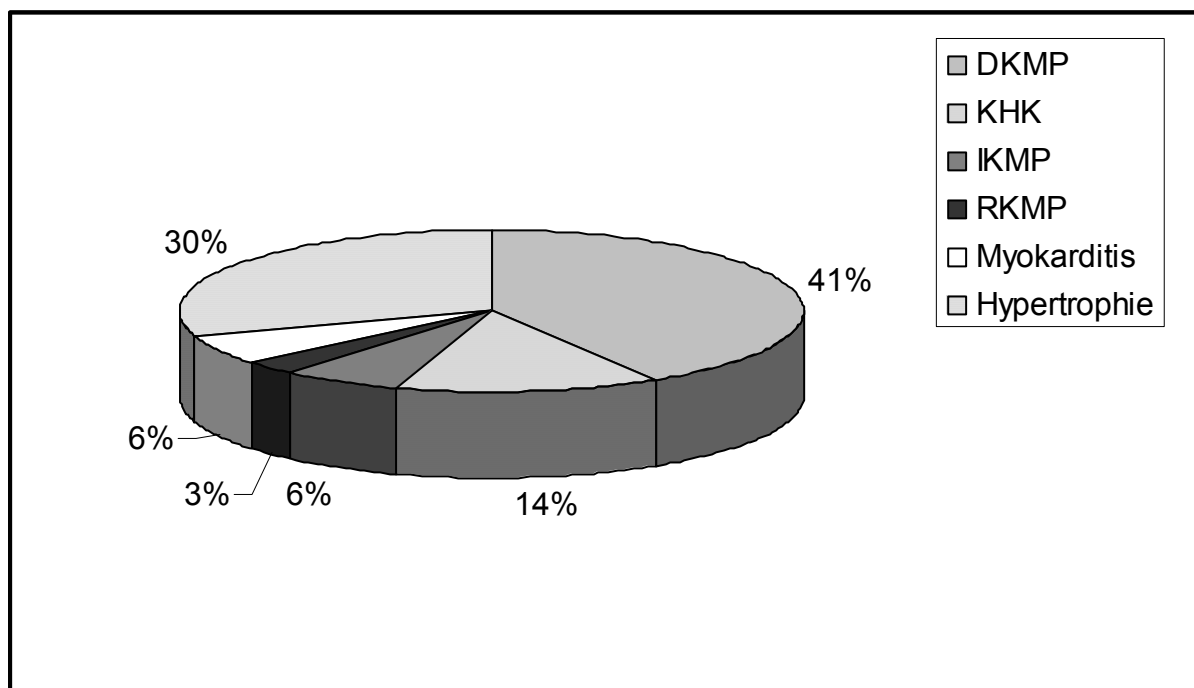


Abbildung 21: Histopathologische Befunde der HTx-Explantate (n= 66).

Prozentwerte sind gerundet.

Die Mehrzahl (59 Herzen) aller untersuchten Spenderherzen waren ebenfalls hypertrophisch mit ähnlichen Anzeichen wie zuvor beschrieben. In dreien davon konnte

sogar eine Myokarditis und in einem eine KHK bestätigt werden. 13 Herzen von Spendern mit einem Spenderalter unter 65 Jahren zeigten einen pathologisch unauffälligen Befund, für acht weitere Spenderherzen lagen keine histopathologischen Daten vor (Tab. 14).

Die Prävalenz von viralen Nukleinsäuren war in Herzen mit einer histologisch definierten, entzündlichen Herzerkrankung oder mit einem hypertrophischen Zustand signifikant höher als in Herzen ohne einen wesentlichen histologisch-anatomischen Befund ($\chi^2= 7,98$; $P= 0,02$). 50 % aller histologisch auffälligen Herzen von HTx-Patienten (33 von 66 Herzen) hatten einen positiven PCR-Befund mit mindestens einem kardiotropen viralen Erregertyp; davon hatten 19 Herzen eine DKMP, sechs eine KHK, eins eine IKMP, eins eine Myokarditis und weitere sechs waren hypertrophisch. 71 % aller histologisch auffälligen Spenderherzen (42 von 59 Herzen) hatten ebenfalls einen positiven PCR-Befund; davon hatten zwei Herzen eine Myokarditis, eins eine KHK und die restlichen 39 waren hypertrophisch. Im Gegensatz dazu waren nur 38 % der histologisch unauffälligen Herzen (5 von 13 Herzen) in der PCR positiv. Die Prävalenzen der einzelnen viralen Erreger für die jeweiligen Herzerkrankungen bzw. für den hypertrophischen Zustand der Herzen können aus Tabelle 14 abgelesen werden. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass 72 von 82 Herzen (88 %) mit einem positiven PCR-Befund auch histologisch auffällig waren.

Daneben zeigten eine hohe Anzahl von Herzen mit einem positiven PCR-Befund (41 von 79 Explantaten; 52 %) eine starke Schädigung des Gewebes (Abb. 22). Hierbei wurde aber keine Beziehung zwischen Mehrfach-Nachweisen verschiedener viraler Nukleinsäuresequenzen und dem Grad der Gewebsschädigung festgestellt.

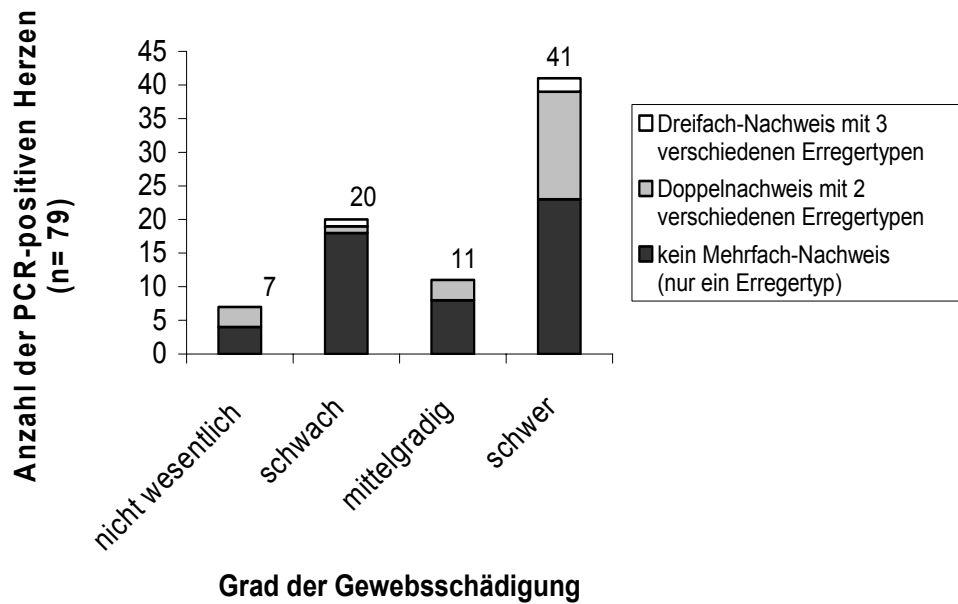


Abbildung 22: Darstellung der Beziehung zwischen der Anzahl der nachgewiesenen verschiedenen Erregertypen pro Explantat und dem Grad der Gewebsschädigung.

3.4.3 Anwendung der diagnostischen Methoden in Einzelfällen

Das Homografftlabor des DHZB hat sechs von sieben Herzen mit einem histologisch eindeutigen Befund auf Myokarditis für die Spende von Klappenhomografts ausgeschlossen: drei Fälle deuteten auf eine entzündlich floride Myokarditis hin, ein Fall auf eine diskret aktive Myokarditis und zwei Fälle auf eine granuläre, chronisch verlaufende Myokarditis. Die serologischen und/oder molekularbiologischen Befunde dieser Studie bestätigten recht gut die floriden Myokarditis-Fälle, die im Folgenden kurz dargestellt werden:

Fall 1

Eine 37-jährige weibliche Spenderin hatte je einen positiven PCR-Befund für EV und PVB19 im Myokard des LVVW. Serum für weitere Untersuchungen war leider nicht vorhanden. Die Befunde wurden aber durch die ISH jeweils bestätigt.

Fall 2

Ein 13-jähriger männlicher HTx-Patient hatte je einen positiven PCR-Befund für EV im LVHW, RV und Septum, und einen weiteren Nachweis für ADV im subvalvulären

Myokard der Pulmonalklappe. Das Serum des Patienten war für beide Erregertypen jeweils IgM-positiv.

Fall 3

Ein 35-jähriger männlicher Spender hatte einen schwach-positiven IgM-Befund für PVB19. Die untersuchten Myokardproben waren alle negativ in der PCR.

Das nicht ausgeschlossene siebte Explantat zur Spende von Klappenhomografts deutete lediglich auf eine chronische Myokarditis hin, welche zur Zeit nicht als Kontraindikation zur Herzklappenspende angesehen wird. Das Herz, welches einen positiven PCR-Befund für HCMV im Myokard des RV aufwies, stammt von einem 50-jährigen männlichen Spender. Das Serum des Patienten war zudem auch IgG-positiv.

3.5. Charakterisierung und Nachweis von Ljunganviren

In Kooperation mit dem schwedischen Partner wurden die erst kürzlich entdeckten Ljunganviren hinsichtlich ihres Infektionsverlaufs in Zellkulturen, der Lokalisation ihrer Oberflächenproteine in infizierten Zellen und ihrer Morphologie näher charakterisiert. In diesem Zusammenhang wurden Pankreasproben von infizierten Rötelmäusen (*Clethrionomys glareolus*), die typische Anzeichen einer Diabetes aufwiesen, mit Hilfe der Elektronenmikroskopie auf die Präsenz von LV-Partikeln untersucht. Zusätzlich wurden in dieser Arbeit unterschiedliche RT-PCR-Methoden (sowohl konventionell als auch quantifizierend) entwickelt, um LV-spezifische Nukleinsäuresequenzen in Gewebe- und Liquorproben sowohl von Patienten als auch von Laborieren aus Schweden nachweisen zu können. Schließlich wurden mit Hilfe der neu entwickelten quantitativen real-time PCR Myokardproben von HTx-Patienten und Organspendern des DHZB auf die Präsenz von LV untersucht.

3.5.1 Charakterisierung von Ljunganviren

Für die *in vitro* Infektionsstudie wurden zunächst unterschiedliche adhärenente Zelllinien mit Überständen von mit verschiedenen LV-Typen infizierten Zellkulturen in Lochplatten infiziert, um zu überprüfen, welche Zellen durch welchen LV-Typ infizierbar sind. Tabelle 15 zeigt, dass insbesondere die Vero-B4-Zellen (Affennierenzellen) sich für die Virusanzucht und Infektionsverlaufsstudie eignen (grau unterlegt), da diese Zellen nach Infektion mit allen getesteten LV-Typen spätestens nach drei Tagen einen gut erkennbaren CPE zeigten: 1. die spindelförmigen Zellen wurden zunehmend kugelig und färbten sich dunkel, 2. lösten sich die Zellen zunehmend vom Zellrasen ab, bis schließlich 3. der Zellrasen vollständig aufgelöst war und die Zellen im Überstand schwammen.

Tabelle 15: Überprüfung der Infektionseffizienz verschiedener LV-Isolate für unterschiedliche adhärenente Zelllinien.

Zelllinie*	LV-Typ					
	87-012	174F	145SL	342SL	M-1146	NY64-7855
Vero-B4	++	+	++	+	+	+
BHK-21	++	+	(+)	+	-	-
3T3	++	(+)	(+)	++	-	-
Mv 1 Lu	++	+	(+)	(+)	-	(+)
CHO	-	+	(+)	(+)	-	-
LTK	++	(+)	(+)	(+)	-	-

Die Auswertung erfolgte mittels der Beurteilung des CPE drei Tage nach der Infektion.

(+), schwacher CPE; +, gut sichtbarer CPE; ++, starker CPE; -, kein CPE.

* nähere Angaben zu den Zelllinien vergleiche Kap. 2.1.4.

Unterschiede bezüglich der Infektionseffizienz der verschiedenen LV-Typen waren vor allem zwischen den unterschiedlichen Nagetier-Zelllinien zu erkennen. Der schwedische Virus-Prototyp LV 87-012 hat bis auf die CHO-Zelllinie in allen übrigen verwendeten Zelllinien einen starken CPE gezeigt. Während die weiteren schwedischen LV-Stämme 174F, 342SL und 145SL hinsichtlich des CPEs in allen Zelllinien unterschiedliche Ausprägungen zeigten (wahrscheinlich aufgrund unterschiedlicher Virusreplikation), waren bei den amerikanischen LV-Stämmen M-1146 und NY64-7855 kein CPE (und keine Virusreplikation) in den verwendeten Nagetier-Zelllinien zu beobachten (Tab. 15). Diese Ergebnisse wurden parallel durch einen indirekten Immunfluoreszenz-Test bestätigt (keine Darstellung).

Abbildung 23 zeigt den Infektionsverlauf (Wachstumskurven) unterschiedlicher LV-Stämme in Vero-B4-Zellen. Schon nach einem Tag ist der Beginn eines CPEs erkennbar, obwohl zunächst der Virustiter im Überstand abnimmt, da die Viren aus dem Überstand in die Zellen internalisieren. Danach geht der Verlauf in die sog. log-Phase über, wobei der Virustiter im Überstand stetig ansteigt und auch der CPE sich immer deutlicher ausprägt. Schließlich wird nach 3 bis 4 Tagen die stationäre Phase (lag-Phase) erreicht, bei der der höchste Virustiter gemessen wird, zwischen 10^2 und 10^6 TCID₅₀/ml, einhergehend mit einem stark fortgeschrittenen CPE. Bei den LV-Typen 87-012 und 145SL werden nach drei Tagen besonders hohe Titer mit 10^5 und 10^6 TCID₅₀/ml gemessen. Nach Erreichen der Wachstumseklipse nimmt der Titer wieder ab, da die sog. Absterbephase erreicht wird. Hierbei können einerseits Viren durch toxische Metaboliten der Zellen inaktiviert werden und andererseits sind Viren außerhalb von Zellen meist instabil.

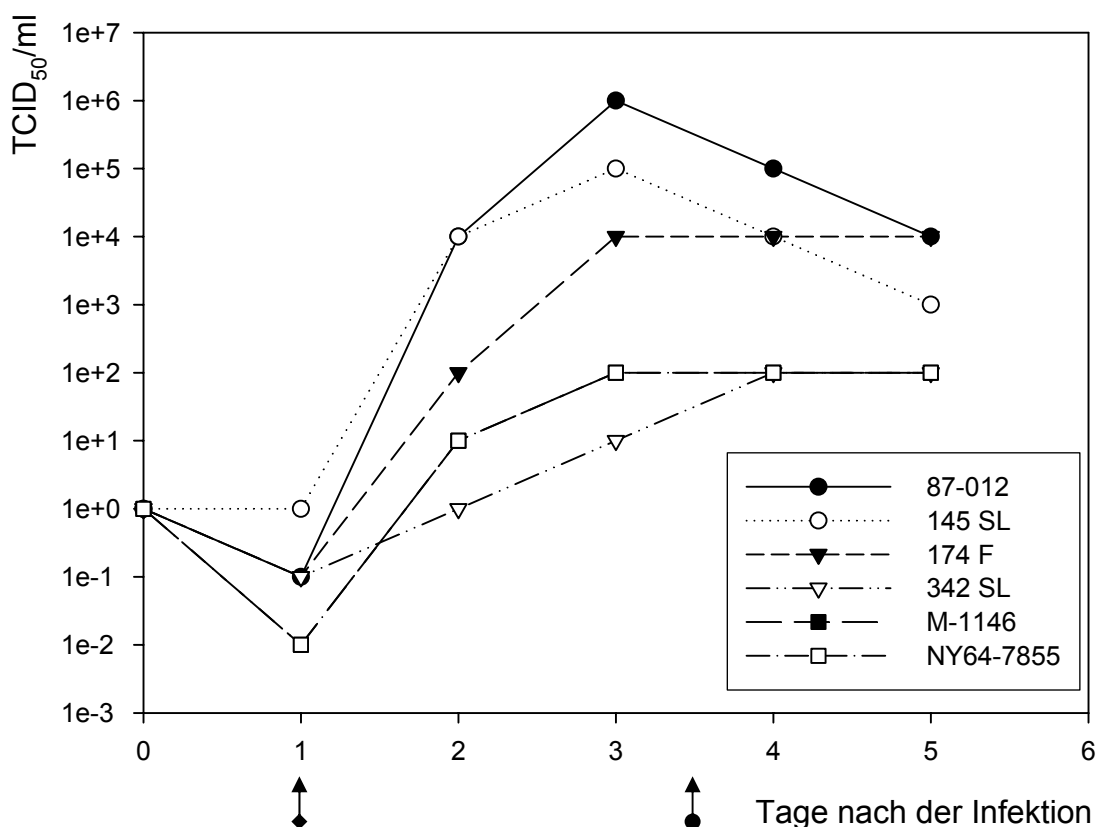


Abbildung 23: Infektionsverlauf unterschiedlicher LV-Stämme in Vero-B4-Zellen.

Pfeil mit Rautenmarkierung: Beginn eines CPEs; Pfeil mit Kreismarkierung: stark fortgeschrittener CPE.

Einhergehend mit dem CPE lassen sich mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz auch die viralen Oberflächenproteine der Ljunganviren in den Zellen zeigen. Besonders gut korrelierende Resultate wurden mit LV 87-012 in Vero-B4-Zellen und BHK-21-Zellen erreicht. Hierbei zeigte sich, dass die Viren sich im Zytoplasma vermehren (Abb. 24).

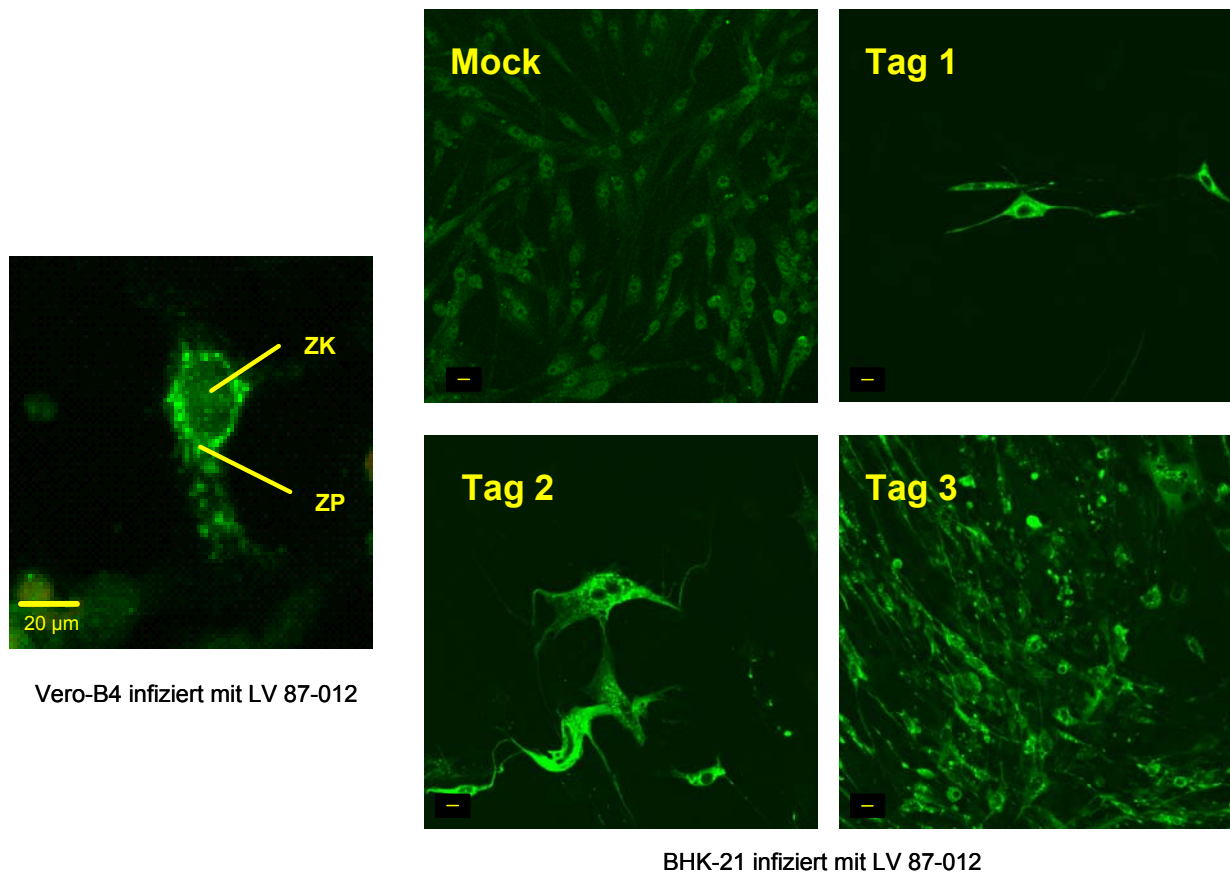


Abbildung 24: Immunzytochemischer Nachweis von LV in Vero-B4-Zellen.

Links: Vero-B4-Zellen infiziert mit LV 87-012. Nachweis der viralen Oberflächenproteine erfolgte im Zytoplasma [Vergrößerung: 100x]. ZK, Zellkern; ZP, Zytoplasma.

Rechts: Verlauf der Infektion/Replikation mit LV 87-012 infizierter BHK-21-Zellen an drei aufeinander folgenden Tagen [Vergrößerung: 40x]. Mock, nicht-infizierte Kontrolle.

Bilder: O. Donoso Mantke

Elektronenmikroskopische Untersuchungen von Ultradünnschnitten aus Zellen einer mit LV 87-012 infizierten Vero-B4-Zellkultur und aus einer Pankreasprobe einer infizierten Rötelmaus (*C. glareolus*) mit typischen Anzeichen von Diabetes gaben Aufschluss über die Morphologie der Ljunganviren (Abb. 25).

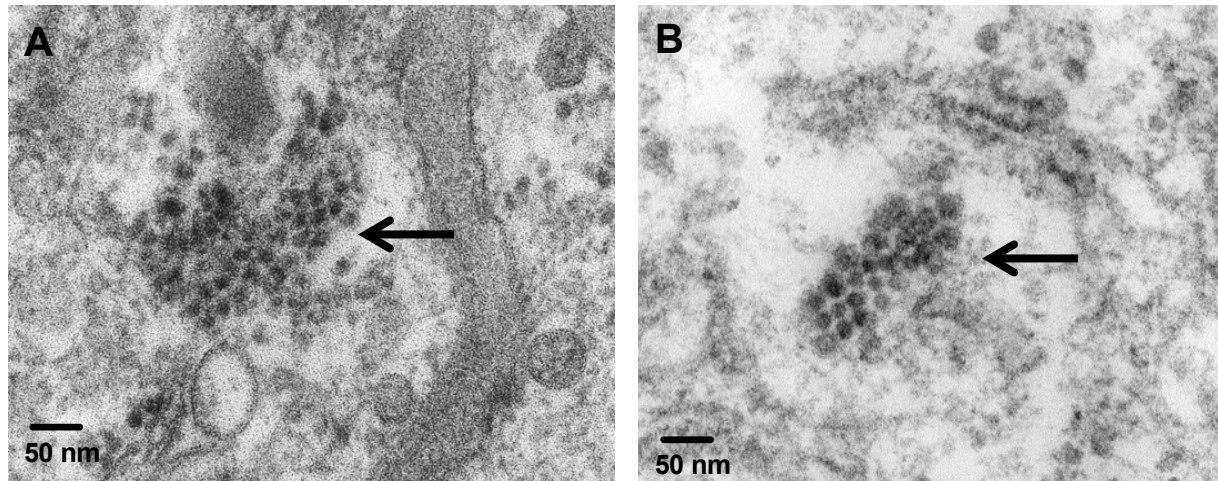


Abbildung 25: Elektronenmikroskopischer Nachweis von Ljunganviren (Pfeil).

A Ultradünnschnitt aus der Pankreas einer Diabetes-erkrankten Rötelmaus (*C. glareolus*) mit LV-Partikeln in einer Inselzelle. Die Picornavirus-ähnlichen Partikel erscheinen als kleines Aggregat im Zytoplasma. Außerdem zu erkennen sind die typischen granulären Einschlüsse der Inselzellen. Die Schnittdicke des Präparats ist mit ca. 50 nm dicker als der Umfang der viralen Partikel mit 27 nm [Vergrößerung: 40,000x].

B Ultradünnschnitt einer infizierten Vero-B4-Zelle mit LV-Partikel als Referenz. Die Viruspartikel sind im Durchmesser 27 nm groß, haben eine sphärische Form und weisen eine kaum strukturierte Oberfläche auf. Sie erscheinen als kleines Aggregat im Zytoplasma der Zelle [Vergrößerung: 40,000x].

Bilder: O. Donoso Mantke

Ljunganviren sind demnach sehr kleine (27 nm im Durchmesser), kugelförmige Viren, die eine nicht-strukturierte Oberfläche aufweisen. Sie kommen meist als kleine Aggregate (Ansammlungen) im Zytoplasma der infizierten Zellen vor.

3.5.2 Etablierung von RT-PCR-Methoden für den Nachweis von Ljunganviren

Für den Nachweis von LV-spezifischen Nukleinsäuresequenzen wurde eine RT-PCR etabliert mit Primern, die innerhalb der 5'-NCR des Genoms binden. Mit Hilfe eines Gradiententhermozyklers wurde zunächst die optimale Annealing-Temperatur bei 60° C ermittelt. Unter Verwendung zwei sog. TaqMan[®]-*minor-groove-binder*-Sonden, die nach generellen Maßstäben für das Primer- und Sondendesign ausgewählt wurden, konnte erstmalig auch die Viruslast von LV in Proben quantifiziert werden. Die Auswahl der Primer- und Sondensequenzen ermöglichte den Nachweis aller bisher bekannten LV-Stämme (Abb. 26). Insbesondere wurde bei den Sonden ein Polymorphismus bei nt-Position 302 im LV-Genom berücksichtigt: alle schwedischen LV-Stämme (87-012, 145SL, 174F) tragen hier ein Cytosin (C) und alle amerikanischen LV-Stämme (M-1146, NY64-7855) ein Guanosin (G) als Base im Nukleotidstrang. Dies ergaben eigene Alignmentstudien anhand der bisher veröffentlichten Genomsequenzen. Die Größe des amplifizierten Fragments betrug 187 bp. Die Spezifität der Methoden wurde durch die Verwendung anderer Nicht-LV-Kontrollen (Echovirus 30, verschiedene Adenovirus-Serotypen, HCMV, Influenzavirus Typ A und B, verschiedene Hantavirus-Stämmen, PVB19, Parechovirus Typ 1, Encephalomyocarditisvirus und Theilers Encephalomyelitisvirus) getestet. Keine dieser Viruskontrollen führte zu einem falsch-positiven Ergebnis, wie in der real-time RT-PCR gezeigt werden konnte (Abb. 26).

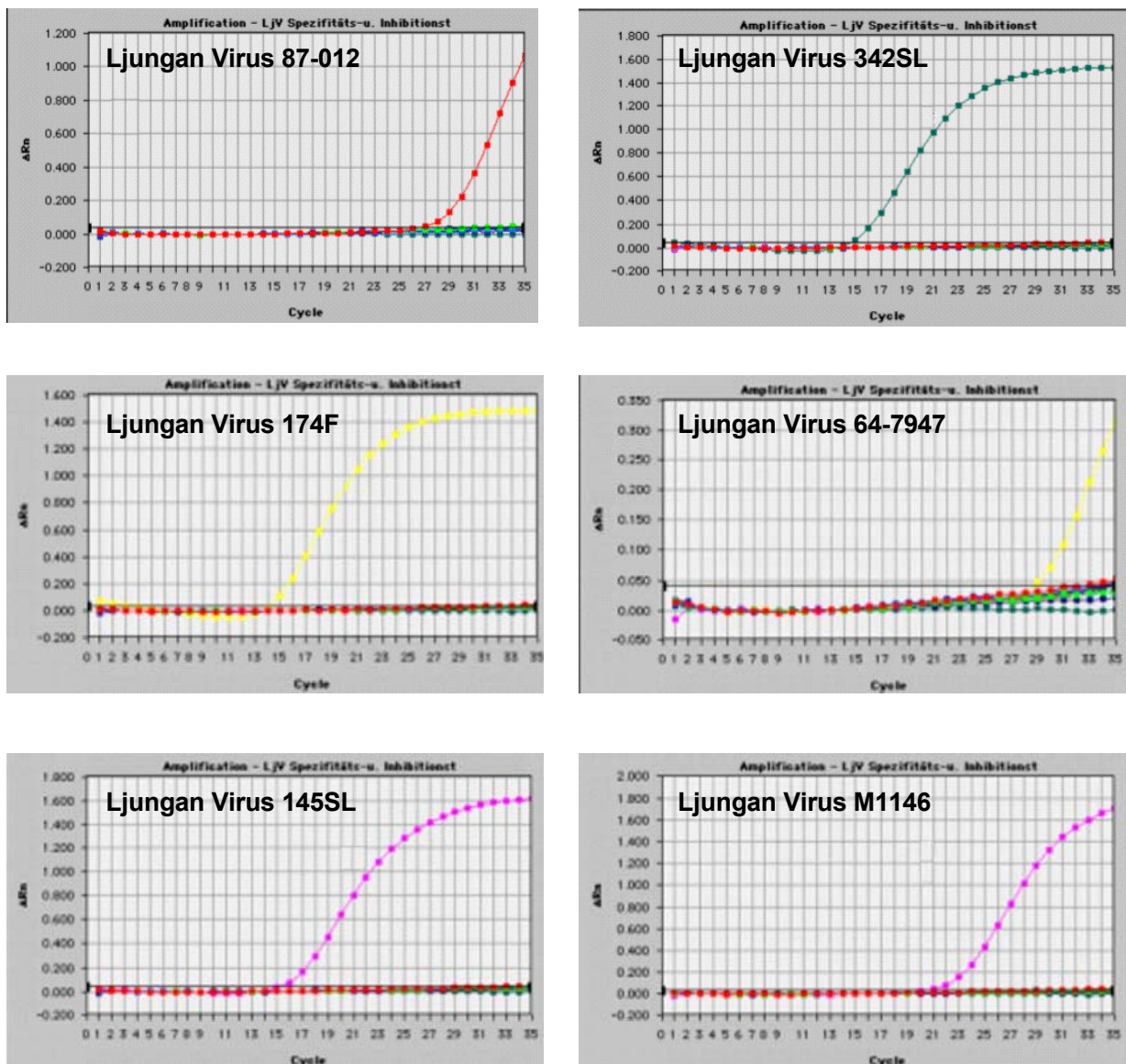


Abbildung 26: Spezifitätstests zur Etablierung der quantitativen real-time RT-PCR für LV. Die Methode wurde auf ihre Spezifität mit verschiedenen Viruskontrollen getestet. Je eine Positiv-Kontrolle: LV 87-012, LV 174F, LV 145SL, LV 342SL, M-1146 oder NY64-7947. Negativ-Kontrollen: EV (Echovirus 30, Stamm 00-588/1 Rostock), ADV (Serotypen 2, 3, 5, 9, 12, 40), HCMV (AD169), Influenzavirus Typ A (Moscow) und Typ B (Hong Kong), Hantaviren (Hanta 76-118, Dobrava Slovenia, Puumala Sotkamo, Seoul 80-39) und PVB19 (99/800), des Weiteren als Negativ-Kontrollen das nahe verwandte Parechovirus Typ 1, Encephalomyocarditisvirus sowie das Theilers Encephalomyelitisvirus. Nur LV-spezifische Nukleinsäuresequenzen wurden jeweils durch die etablierte PCR nachgewiesen.

Eine Verdünnungsreihe mit 10-fach-Verdünnungen eines selbst klonierten Insert-Plasmids (PCR-Produkt LV-Prototyp 87-012) wurde zur Erstellung einer Standardkurve für die etablierte real-time RT-PCR verwendet, pro Verdünnung 6 Ansätze (Abb. 27).

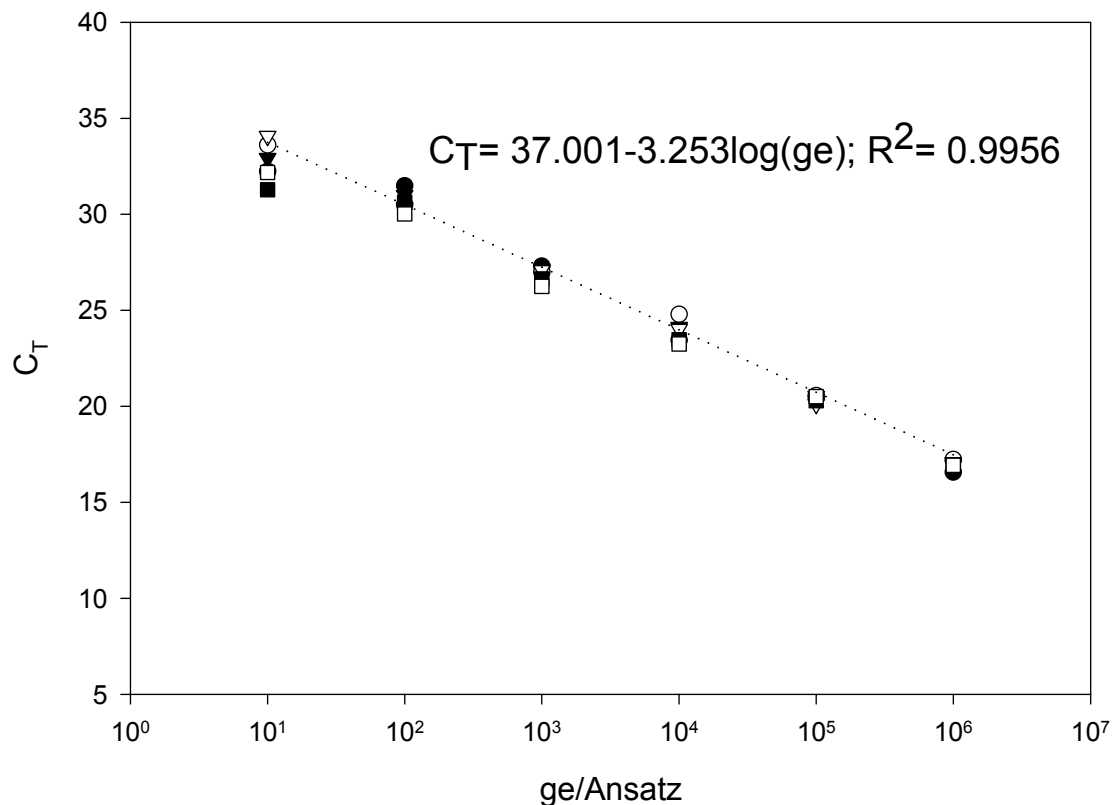


Abbildung 27: Standardkurve für die quantitative real-time RT-PCR zum Nachweis von LV. Es wurden PCR-Läufe mit 10^0 bis 10^6 Plasmidkopien des Insert-Plasmids jeweils in 6-fach Bestimmungen (▲,△,■,□,●,○) durchgeführt. Gezeigt wird der C_T -Wert in Abhängigkeit von der Anzahl der Kopien. Die Nachweisgrenze liegt bei 10^1 Plasmidkopien. Der Korrelationskoeffizient beträgt 0,9956. Für die PCR wurde eine Effizienz von 100 % berechnet.

Die Resultate der Standardkurve zeigen eine hohe lineare Korrelation für die PCR in einem Bereich von sechs 10er-Potenzen (10^1 bis 10^6 ge/Ansatz). Die Nachweisgrenze lag bei 10^1 Plasmidkopien. Hier waren alle sechs Ansätze noch positiv, wohingegen bei 10^0 kein Signal mehr festgestellt wurde. Des Weiteren wurden ein Intra-Assay-spezifischer- bzw. Inter-Assay-spezifischer-Test mit drei positiven Plasmidkontrollen (10^1 , 10^2 und 10^3 ge/Ansatz) jeweils in 6-fach-Bestimmungen durchgeführt, um die Messabweichungen innerhalb einer Messung an einem Tag bzw. zwischen drei verschiedenen Messungen an drei verschiedenen Tagen zu bestimmen. Die Mittelwerte für den C_T -Wert sowie die jeweiligen Standardabweichungen sind in Tabelle 16 dargestellt.

Tabelle 16: Intra-Assay-spezifischer und Inter-Assay-spezifischer Test für die quantitative real-time PCR zum Nachweis von LV.

	Kontrolle 1	Kontrolle 2	Kontrolle 3
ge/Ansatz	1000	100	10
Intra-Assay			
C_T^*	26,89	30,66	32,71
Stabw	0,39	0,51	1,02
Inter-Assay			
C_T^*	26,82	29,95	31,89
Stabw	0,29	1,27	1,42

* Mittelwert; Stabw= Standardabweichung.

Darüber hinaus haben Tests mit Insert-Plasmid-DNA gespickten Myokardlysaten gezeigt, dass die DNA bzw. RNA direkt nach der Extraktion aus dem Gewebe getestet werden kann, da kein inhibitorischer Effekt für die real-time RT-PCR, ähnlich wie bei der Methode für PVB19 [siehe Kap. 3.3.4], durch gewebeeigene Substanzen nachgewiesen wurde.

Die Verwendbarkeit insbesondere der real-time RT-PCR wurde mit unterschiedlichen Verdachtsproben (sowohl von infizierten Labortieren als auch von hospitalisierten Patienten) aus Schweden überprüft. 33 von 36 (92 %) Gewebeproben unterschiedlicher Organe aus sechs infizierten Labormäusen, welche intraperitoneal mit LV 145 SL infiziert und nach einer Woche zwecks Probenentnahme sezirt worden waren, sind auf LV positiv getestet worden. Die höchste Viruslast wurde hierbei jeweils im Gehirn der infizierten Tiere mit bis zu 3×10^6 Kopien/mg Gewebe (unter Berücksichtigung der Probeneinwaagen) nachgewiesen. Im Gegensatz dazu war keine der vier nicht-infizierten Kontrollmäuse in einem der getesteten Organen positiv. Außerdem waren alle Plazentaprobe von fünf infizierten Mäusen, die während ihrer Schwangerschaft Symptome von intrauterinem Fruchttod aufwiesen, ebenfalls positiv für LV-Genomsequenzen mit Viruslasten zwischen $1,3 \times 10^2$ und $1,3 \times 10^6$ Kopien/mg Gewebe (Mittelwert: $2,6 \times 10^5$ Kopien/mg Gewebe).

Zwei von sechs Plazenta- bzw. Nabelschnurproben (33 %) aus zwei von vier schwedischen Patientinnen mit Diagnose auf Präeklampsie sowie ein Schweineisolat (SMB 941), welches zuvor mittels einer semi-nested PCR auf LV positiv getestet worden ist, waren ebenfalls für LV-spezifische-Nukleinsäuresequenzen mit Hilfe der real-time RT-PCR positiv. Die Viruslasten betragen ca. 20 Kopien/mg Gewebe bei den humanen Plazentaprobe und 30 Kopien/mg Gewebe beim Schweineisolat und waren ca. 75-mal geringer als die Positivkontrolle vom LV-Prototyp 87-012. Abbildung 28 zeigt die Sequenzen dieser positiven Proben, die zu 98 % homolog zur Sequenz von LV-Prototyp 87-012 waren.

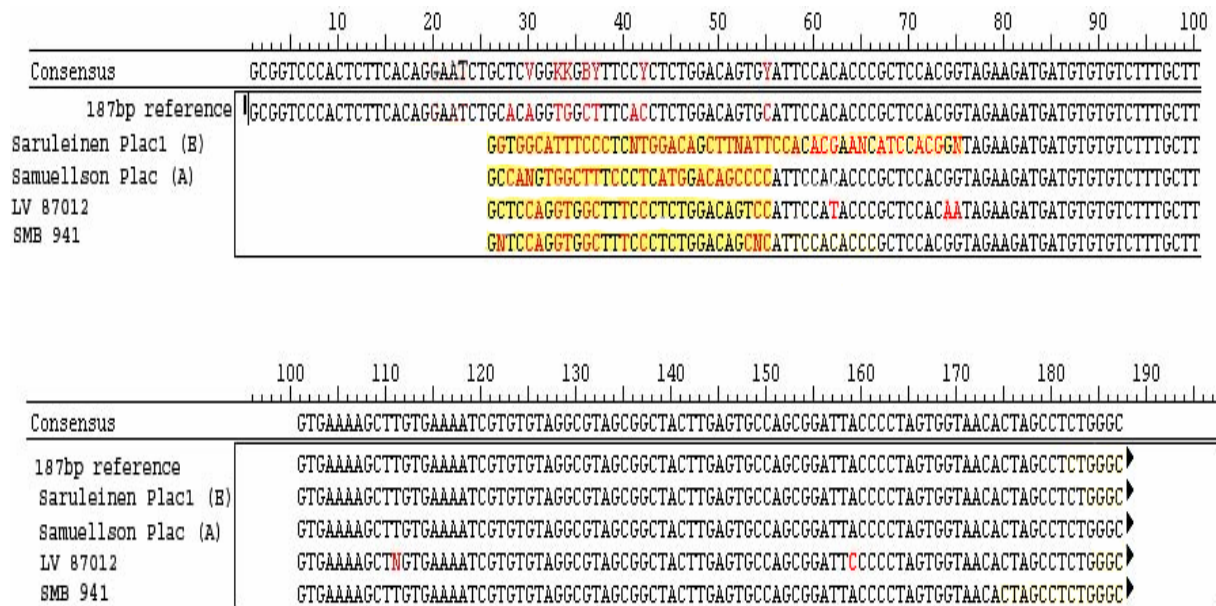


Abbildung 28: Sequenzalignment der LV-positiven Plazentaprobe (A und E) sowie des Schweineisolats (SMB 941) im Vergleich zu der Insert-Plasmid-Kontrolle und dem Prototyp LV 87-012. Rot gekennzeichnet sind Basenabweichungen von der Konsensussequenz. Gelb markiert sind fehlerhafte Sequenzfolgen bedingt durch die Primerbindung am 5'-Ende, die in Alignmentanalysen keine Berücksichtigung finden.

In den 100 untersuchten Myokardproben des DHZB wurden keine LV-spezifischen Nukleinsäuresequenzen nachgewiesen. Alle getesteten Proben waren in der Referenzgen-Analyse (für GAPDH und RP II) positiv, d.h. die Proben waren generell für die RT-PCR geeignet.

4. Diskussion

Häufig ist über eine virale Beteiligung als auslösende Ursache für kardiovaskuläre Erkrankungen wie Myokarditis, DKMP und KHK berichtet oder diskutiert worden (Lozinski et al., 1994; Martin et al., 1994; Griffin et al., 1995; Martino et al., 1995; Schönian et al., 1995; Baboonian und Treasure, 1997; Schowengerdt et al., 1997; Pauschinger et al., 1999a; Klingel, 2002; Bowles et al., 2003; Bowles und Vallejo, 2003; Maisch et al., 2003; Pankuweit et al., 2003; Lamb und Ferns, 1999; Morré et al., 2000; Shoenfeld et al., 2001; Madjid et al., 2004). Auch wurde berichtet, dass virale Infektionen möglicherweise an Komplikationen beteiligt sind, die nach einer Herztransplantation auftreten und das Überleben der Transplantatempfänger einschränken können (McNamara et al., 1996; Schowengerdt et al., 1996; Gallo et al., 1997; Schowengerdt et al., 1997; Heegaard et al., 1998; Bernabeu-Wittel et al., 1999; Koskinen et al., 1999; Lower et al., 2001; Weill, 2001; Shirali et al., 2001; Gao et al., 2003). Dennoch sind nur wenige gesicherte Daten bezüglich der Prävalenz der einzelnen in Frage kommenden kardiotropen viralen Erreger verfügbar, um Vermutungen über eine direkte Rolle dieser Erreger in der Pathogenese der jeweiligen Erkrankungen zu festigen.

In der vorliegenden Dissertationsarbeit wurden 536 Herzgewebeproben (Myokard- und Herzklappengewebe) von 73 Herztransplantatempfängern und 80 Herzspendern auf das Vorkommen von viralen Nukleinsäuresequenzen untersucht. In diese Studie eingeschlossen wurden a) kardiotope virale Erreger, für die ein ätiologischer Zusammenhang mit entzündlichen Herzerkrankungen in anderen Studien belegt worden ist (EV, ADV, HCMV, PVB19 und Influenzaviren) sowie b) virale Erreger mit bisher unbekanntem Risikopotential (LV und Hantaviren). Nach derzeitigem Kenntnisstand handelt es sich bei der vorliegenden Studie um die größte ihrer Art, bei der über 500 Gewebeproben mit einer Kantenlänge von ca. 1 cm (deutlich größer als Biopsieproben) aus explantierten Herzen von vorwiegend erwachsenen Patienten retrospektiv auf ein Virusspektrum von insgesamt neun Erregern, mit über 2500 Einzelbefunden, untersucht worden sind. Bisher gab es vergleichsweise so groß angelegte Studien vorwiegend nur bei Kindern und Jugendlichen, bei denen eher akute Herzmuskelerkrankungen auftreten (Griffin et al., 1995; Bowles et al., 2003). Die Be-

funde der vorliegenden Studie sollten mehr Klarheit bezüglich der Prävalenz der jeweiligen kardiotropen viralen Erreger schaffen, ob und welche viralen Nukleinsäuresequenzen sich in erkrankten bzw. gesunden Herzen nachweisen lassen. Die Klärung der Prävalenz dient als Grundlage für die Diskussion eines Zusammenhanges zwischen bestimmten Virusinfektionen und Herzkrankheiten und zur Abschätzung, ob möglicherweise ein gesundheitliches Risiko für die Empfänger potenziell infizierter Transplantate besteht, welches in Zukunft weitere Studien zur Einschätzung dieser Gefahr und zur Verbesserung der Qualitätssicherung von Herztransplantaten und Herzklappengewebe notwendig macht.

In der Promotionsarbeit wurden mittels eines Vergleichs zwischen konventionellen und kommerziellen Methoden zunächst die jeweils optimalen Extraktionsmethoden zur Präparation und Reinigung von Nukleinsäuren aus fibrogenem Myokardgewebe ermittelt. Ziel war es, (virale) DNA oder RNA möglichst in großen Mengen und in einem reinen Zustand isolieren zu können. Der Vergleich der Methoden hat ergeben, dass mit den konventionellen Methoden die höchsten Nukleinsäure-Ausbeuten mit guten Reinheitsgraden erzielt wurden, d.h. für die DNA-Extraktion die Phenol-Chloroform-Methode modifiziert nach Sambrook et al. (1989) und für die RNA-Extraktion die GTC-Methode nach Chirgwin et al. (1979). Über ähnlich gute Resultate für konventionelle Methoden wurde zuvor in einer Vergleichsstudie berichtet, bei der insgesamt sechs verschiedene Extraktionsmethoden für virale DNA und RNA in vier verschiedenen Nicht-Serum-Proben (genital, respiratorisch, lymphozytär oder fäkal) untersucht wurden (Kok et al., 2000). Zudem verringern die konventionellen Methoden eine mögliche, durch zelluläre Verunreinigung bedingte Inhibition der Nukleinsäureamplifikation klinischer Proben in der PCR (Khan et al., 1991; Ruano et al., 1992; Wiedbrauk et al., 1995). Es hat sich gezeigt, dass konventionelle Methoden nicht unbedingt als überholt gelten müssen, sondern damit durchaus gleich gute, wenn nicht sogar bessere Aufarbeitungen wie mit den kommerziellen Kits erzielt werden können. Konventionelle Methoden finden in molekularbiologisch arbeitenden Laboratorien zu Forschungszwecken zunehmend wieder an Bedeutung (Kochl et al., 2004; Pauschinger et al., 1999a).

Obwohl die Materialkosten im Vergleich zu den kommerziell erhältlichen Extraktionskits niedriger sind, ist der Zeitaufwand bei den konventionellen Methoden wesentlich

höher. Daher wird geraten, weiterhin die kommerziellen Methoden für die klinische Routinediagnostik zu verwenden, auch wenn die Ausbeuten hier geringer sind (Fransen et al., 1998; Kok et al., 2000). Während der Aufarbeitungen der Gewebeproben für die Untersuchungen in dieser Studie mit den konventionellen Methoden wurden Abweichungen bei der OD-Messung hinsichtlich der theoretisch optimalen OD₂₆₀/OD₂₈₀-Ratio in Höhe von 1,8-2,0 (Sambrook et al., 1989) für proteinfreie Nukleinsäurelösungen festgestellt. Häufig wurden für die Präparationen Werte gemessen, die nicht über ein Verhältnis von 1,5 kamen, obwohl für die PCR keine daraus resultierenden Beeinträchtigungen beobachtet wurden. Als Mittelwerte wurden für die DNA-Extraktion eine Ratio von 1,5 und für die RNA-Extraktion eine Ratio von 1,7 ermittelt. In einer neueren Publikation (Wilfinger et al., 1997) konnte gezeigt werden, dass abhängig vom pH-Wert und Salzgehalt des bei den Messungen verwendeten Wassers (als Lösungsmittel) ein und dieselbe Nukleinsäurepräparation OD₂₆₀/OD₂₈₀-Verhältnisse von 1,5 bis 2,2 aufweisen kann. Dieses Problem kann allgemein dadurch behoben werden, indem das verwendete Wasser für eine präzisere OD-Messung zuvor basisch gepuffert wird. Da die photometrischen Messungen in der vorliegenden Arbeit lediglich dazu dienen zu zeigen, dass die Aufarbeitungen hinsichtlich der Nukleinsäure-Ausbeuten (Quantität) erfolgreich waren, und da amplifizierbares Material (siehe Referenzgen-Nachweis für β -Aktin, GAPDH und/oder RNA-Polymerase II) für die PCR in den Präparationen nachgewiesen werden konnte, waren derartige in der Praxis häufig zu beobachtende Schwankungen für die weiteren Untersuchungen tolerabel. Eventuelle Proteinverunreinigungen konnten durch das Aufbereitungsprozedere ausgeschlossen werden.

Mittels der angewandten PCR-Diagnostik konnten in der vorliegenden Studie hohe Nachweisraten für verschiedene kardiotope virale Erreger im Myokardgewebe sowohl von HTx-Patienten als auch von Herzspendern gezeigt werden. Überraschend hierbei war, dass die Gesamtprävalenzen in beiden untersuchten Gruppen annähernd gleich groß waren: 34 von 73 HTx-Patienten (47 %) und 48 von 80 Herzspendern (60 %) waren positiv für mindestens einen der untersuchten Viren und in mindestens einer der untersuchten Herzklokalisationen (Myokardproben). Das bedeutet, dass von den sog. „normalen“ bzw. primär gesunden Spenderherzen wesentlich mehr Explantate einen positiven Virus-Befund hatten als ursprünglich erwartet. Dies könnte insbesondere für die Transplantationsmedizin und Qualitätssicherung

von Transplantaten von Bedeutung sein, da hier die Gefahr besteht, dass immunsupprimierte Empfänger infizierte Transplantate erhalten können. Virale Nukleinsäuresequenzen wurden signifikant häufiger in Spendern mit einem Spenderalter über 65 Jahren nachgewiesen als in HTx-Patienten ($P= 0,005$ für Explantate; $P= 0,003$ für alle Myokardproben) oder Spendern mit einem Spenderalter unter 65 Jahren ($P= 0,02$ für Explantate; $P= 0,009$ für alle Myokardproben). Insbesondere wurde eine hohe Prävalenz von EV (vor allem Coxsackievirus B-ähnlichen Viren) in älteren Spendern nachgewiesen, welche bisher als ätiologisches Agens entzündlicher Herzerkrankungen beim Menschen am besten beschrieben worden sind (Baboonian und Treasure, 1997; Maisch et al., 2003). Die hohe Virusprävalenz bei Älteren könnte durch eine allgemein schwächere Immunkompetenz im höheren Alter erklärt werden.

Hinsichtlich der Prävalenz bestimmter kardiotoxischer viraler Erreger in entzündlichen Herzerkrankungen stimmen die Daten dieser Studie gut überein mit anderen PCR-Ergebnissen, die zu diagnostischen Zwecken hauptsächlich anhand endomyokardialer Biopsieproben in verschiedenen Arbeiten dargestellt worden sind (vergleiche auch Tab. 3). Die Daten aus der vorliegenden Arbeit, die hinsichtlich der untersuchten Probenzahl und hinsichtlich des untersuchten Virusspektrums sehr umfangreich war, tragen zu einer weiteren Klärung der Prävalenz einzelner viraler Erreger in entzündlichen Herzerkrankungen vor allem bei Erwachsenen bei, wobei es in einigen Fällen, z.B. PVB19 (Donoso Mantke et al., 2004a), bisher kaum Daten gab. So sind EV und ADV mit jeweils 21 % bei den HTx-Patienten als die am häufigsten nachgewiesenen viralen Erreger ermittelt worden. Ähnliches berichteten Baboonian und Treasure (1997) für EV [20-25 %] sowie Pauschinger et al. (1999a) für ADV [13-19 %]. Erst kürzlich wurde der Verdacht erhärtet, dass eine Infektion mit ADV neben EV einen ebenfalls sehr häufigen Grund für Myokarditis und DKMP sowohl in Kindern als auch in Erwachsenen darstellen (Bowles et al., 2003). In der vorliegenden Studie sind für HCMV mit 19 % und für PVB19 mit 10 % höhere Prävalenzen nachgewiesen worden als zuvor in anderen Arbeiten berichtet wurde (Bowles et al., 1999; Schowengerdt et al., 1997; siehe Tab. 3). Allerdings handelte es sich bei diesen Studien, die ebenfalls mit konventionellen Extraktionsmethoden für Nukleinsäuren arbeiteten, um Untersuchungen in Kindern. Die in der vorliegenden Studie präsentierten Ergebnisse zeigen, dass HCMV und PVB19 ebenfalls eine Bedeutung

als kardiotope Erreger sowohl in Kindern als auch in Erwachsenen zukommt, auch wenn hier die pathogenetischen Mechanismen noch nicht vollständig aufgeklärt sind. Ähnlich hohe Prävalenzen wie in der vorliegenden Arbeit berichteten Schönian et al. (1995) für HCMV [5-22 %] sowie – erst kürzlich – Pankuweit et al. (2003) für PVB19 [16-23 %].

Influenza-, Ljungan- und Hantaviren sind in keiner der von uns untersuchten Proben nachgewiesen worden. Es scheint, dass diese viralen Erreger seltener im humanen Herzgewebe nachgewiesen werden als andere (geringere Prävalenz) und wahrscheinlich eher eine Rolle bei akuten Infektionen spielen, die nicht den Hauptbestandteil in unserem Patientenpool bildeten. Für Influenzaviren wird eine Prävalenz zwischen 10 % und unter 1 % geschätzt (Giles und Shuttleworth, 1957; Karjalainen et al., 1980; Ray et al., 1989; Maisch et al., 2003). Eine saisonale Variation kann für die vorliegende Arbeit ausgeschlossen werden, da kein Unterschied festzustellen war: weder bei Proben, die während der Grippesaison, noch bei Proben, die außerhalb der Grippesaison entnommen wurden. Für LV gibt es bisher nur wenige Hinweise auf eine humanpathogene Rolle bei Patienten mit akuter Myokarditis (Niklasson et al., 1999). Für Hantaviren wird bisweilen eine mögliche Rolle in kardialen Infektionen diskutiert, sowohl in Einzelfallstudien (Tennstedt et al., 1994) als auch in Tiermodellen (Botten et al., 2000; Botten et al., 2003). Die hohe Sensitivität der hierbei verwendeten Methoden schließt den Nachweis falsch-negativer Ergebnisse aufgrund geringer Viruslasten im Gewebe aus. Außerdem wurde in den untersuchten Myokardproben zelluläre RNA für GAPDH und RP II amplifiziert, was die Möglichkeit negativer Ergebnisse aufgrund von RNA-Abbau während der Aufarbeitung oder Lagerung ausschließt. Weitere Untersuchungen vor allem an Patienten mit akuten Herzmuskelerkrankungen sollten in Zukunft durchgeführt werden, um die genaue Inzidenz für Influenza-, Ljungan- und Hantaviren zu ermitteln.

In der vorliegenden Studie wurden erstmalig hohe Prävalenzen von Nukleinsäuresequenzen kardiotoxischer Viren in Myokardgewebe von Herzspendern beschrieben: 32,5 % für EV, 9 % für ADV, 24 % für HCMV und 10 % für PVB19. In der einschlägigen Literatur sind diesbezüglich keine vergleichbaren Daten zu finden. Ein Bedarf an verdichtenden Daten zur Klärung der Prävalenz und des gesundheitlichen

Risikos für Empfänger möglicher infizierter Transplantate, die im Rahmen von sog. Follow-up Studien zu ermitteln wären, zeigt sich hier an.

Da Virusinfektionen im Herzmuskelgewebe fokal auftreten, ist die Wahrscheinlichkeit mittels ISH virale Nukleinsäuresequenzen nachzuweisen umso größer, je mehr Gewebeschnitte untersucht werden. Leider musste die Anzahl der bereitzustellenden Gewebeschnitte für die vorliegende Studie sehr begrenzt werden. Dennoch konnten für 11 von 33 untersuchten Explantaten die PCR-Befunde mittels ISH bestätigt werden. Virale Nukleinsäuresequenzen (für EV, ADV, HCMV und PVB19) konnten mit Hilfe spezifischer Isotop-markierter Ribosonden in interstitiellen Zellen wie mononukleäre Entzündungszellen, Fibroblasten oder Endothelzellen von Venolen bzw. Arteriolen lokalisiert werden, nicht jedoch in Myozyten. Während Myozyten als die typischen Zielzellen kardiotroper Viren insbesondere bei akut entzündlichen Herzerkrankungen beschrieben werden und interstitielle Zellen auch bei chronisch-persistierenden Infektionen mit betroffen sind (Schönian et al., 1995; Deguchi et al., 2001; Klingel, 2002), konnten bei PVB19-induzierten Herzerkrankungen vor allem die Endothelzellen als spezifische Zielzellen ausgemacht werden (Bültmann et al., 2003; Donoso Mantke et al., 2004a). Die ISH-Befunde unterstreichen noch einmal die in der PCR bereits quantitativ ermittelte Aussage, dass es sich bei den in der vorliegenden Studie beschriebenen Fällen aufgrund der niedrigen Viruslasten hauptsächlich um chronisch-persistierende Verlaufsformen handelt, da Myozyten nicht belastet waren. Bevorzugte Herzlokalisationen für virale Infektionen konnten für die einzelnen untersuchten Erreger in dieser Studie nicht nachgewiesen werden. Demzufolge können für Biopsieuntersuchungen keine neuen Empfehlungen zum „Sampling“ gegeben werden. Eine wesentliche Einschränkung sowohl der PCR als auch der ISH liegt darin, als dass beide Methoden zunächst nicht dazu geeignet sind zu bestimmen, ob die nachgewiesenen Viren sich in einer latenten/persistierenden oder in einer produktiven/replikativen Phase befinden. Für EV sind PCR-Reaktionen zur Plus- und Minusstrang-Spezifizierung beschrieben worden, mit denen auch eine replikative Phase der Virusinfektion (durch Nachweis des RNA-Minusstranges) bestimmt werden kann (Andreoletti et al., 2000; Fujioka et al., 2000). In anderen Fällen müssten mittels immunhistochemischer Nachweisverfahren virale Proteine nachgewiesen werden, um eine Virusreplikation zu bestätigen. Die Befunde mittels PCR oder ISH müssen trotz aller Hinweise auf einen ätiologischen Zusammenhang vor-

sichtig interpretiert werden, da eine direkte pathogenetische Rolle latenter bzw. replizierender Viren insbesondere in chronischen Herzerkrankungen nicht einfach durch deren Präsenz (Vorhandensein der Nukleinsäuresequenzen) im Herzgewebe bestätigt werden kann (Weiss et al., 1992; Mason, 2003). Trotz allem weisen eine Reihe unterschiedlicher Studien auch auf einen wichtigen indirekten Zusammenhang hin, nämlich dass vor allem auch persistente Virusinfektionen im Herzen (Auto-) Immunreaktionen „triggern“ können, die zu Schädigungen des Herzgewebes führen (Latif et al., 1993; Schwimbeck et al., 1994; Gauntt et al., 1995; Caforio et al., 1996; Davies, 1997; Huber, 1997; Rose, 2000; Caforio et al., 2002; Maisch et al., 2003; Mason, 2003; Maier et al., 2004; Wessely, 2004). Dies ist von Bedeutung zur Klärung chronischer Krankheitsverläufe, die schließlich auch zur Herzinsuffizienz führen.

Während in der vorliegenden Dissertation eine hohe Korrelation (in 88 % der untersuchten Fälle) zwischen den PCR-Befunden und histopathologischen Ergebnissen gezeigt werden konnte, waren die serologischen Ergebnisse der zum Einsatz gekommenen kommerziellen ELISA-Teste weitestgehend diskordant hinsichtlich des Nachweises von IgG-Antikörpern spezifisch für EV (27 % Diskordanz) und HCMV (16 % Diskordanz). Diskordante Ergebnisse zwischen PCR und kommerziellen ELISA sind auch in anderen Arbeiten festgestellt worden. Für HCMV wurde berichtet, dass mindestens 5 % bis 10 % getesteter Blutspender zwar PCR-positiv, aber serologisch negativ waren (Prösch et al., 1992; Larsson et al., 1998). Für EV wurde – für den in dieser Studie verwendeten ELISA-Test – eine Diskordanz von 29 % bei Kindern mit Diabetes Typ 1 ermittelt (Craig et al., 2003). Ein Grund dafür ist, dass die kommerziell erhältlichen ELISA-Teste auf Antigene sog. Laborstämme basieren und dass einige Patientenisolate sich dem Nachweis entziehen, da diese sich von den Laborstämmen stark unterscheiden, so dass Antikörper gegen diese Viren nicht nachgewiesen werden können (Craig et al., 2003; Rahbar et al., 2004). Die potenziell virale Ursache chronischer Verläufe kann somit durch wenig sensitive serologische Nachweisverfahren übersehen werden, daher wird für die Diagnostik myokardiotroper Erreger mehr zum Gebrauch der PCR und Histopathologie geraten.

Die in dieser Studie beobachteten histopathologischen Veränderungen wie linksventrikuläre Dilatation und Herzwandverdünnung mit (häufig schweren) Schädigungen des Myokardgewebes weisen auf potenziell Virus-induzierte Infektionen des Herzens

hin. Derartige histologische Abnormalitäten können vorwiegend bei chronisch-persistierenden viralen Herzerkrankungen beobachtet werden (Bowles und Vallejo, 2003), was gut mit den hier bestimmten Viruslasten übereinstimmt, die ebenfalls auf chronisch-persistente Infektionen hindeuten.

Kardiovaskuläre Erkrankungen wie Myokarditis, DKMP oder KHK sind weltweit eine der häufigsten Ursachen für die Herzinsuffizienz. Bisherige Studien haben gezeigt, dass innerhalb der untersuchten Gesamtpopulationen Neuerkrankungen insbesondere mit zunehmendem Alter und häufiger bei Männern als bei Frauen auftraten (Dec und Fuster, 1994; Cowie et al., 1999; Miura et al., 2002). Die betroffenen Patienten sind meist auf eine langwierige medikamentöse Therapie zur Behandlung der chronischen Herzinsuffizienz angewiesen, und häufig sind auch chirurgische Eingriffe wie Herztransplantation oder Herzklappenersatz als lebensrettende Maßnahmen notwendig. Mit fast 60 % der Anmeldungen ist die DKMP in Deutschland die häufigste Grunderkrankung der Patienten, die für eine Herztransplantation vorgesehen werden. An zweiter Stelle steht mit 27 % die KHK (DSO, 2002). Die aufgeführten epidemiologischen Daten zur Herzinsuffizienz spiegeln sich auch in der vorliegenden Promotionsarbeit wider. So haben sich signifikant mehr Männer ($P < 0,001$) als Frauen im Untersuchungszeitraum einer Herztransplantation aufgrund einer chronischen Herzinsuffizienz unterziehen müssen. Die meisten der untersuchten HTx-Patienten waren im fortgeschrittenen Alter zwischen 41 und 65 Jahren. Die beiden häufigsten erhobenen klinischen Diagnosen (Indikationen für eine Herztransplantation) waren die DKMP mit 66 % und die KHK mit 21 %. Später wurden diese beiden Grunderkrankungen histopathologisch in 41 % und 14 % der untersuchten Fälle bestätigt (die übrigen Fälle deuteten eher auf eine Hypertrophie mit ungeklärter Ursache hin). Die Basisdaten für die Herzspender sind aufgrund mangelnder Literaturangaben nur bedingt mit epidemiologischen Daten anderer Quellen zu vergleichen. Das Durchschnittsalter von 49 Jahren stimmt aber gut mit dem mittleren Spenderalter überein, das nach eigenen erhobenen Daten des Homograflabors des DHZB über die Jahre festgehalten wurde; 1996: 48 Jahre, 2001: 44 Jahre und 2003: 47 Jahre (Jahresberichte des Homograflabors des DHZB 2001 und 2003). Die häufigste Todesursache der Spender stellten Schäden im Schädel-Hirn-Bereich dar. In den Spenderinformationsprotokollen, die für die vorliegende Studie zur Verfügung standen, wurde nicht durchgehend zwischen traumatischen oder atraumatischen Schädel-Hirn-Schä-

digungen unterschieden, weshalb ein weiterer Vergleich mit anderen erhobenen Daten nicht möglich war. Dennoch bleibt festzuhalten, dass beide untersuchten Patientengruppen (HTx-Patienten und Spender) anhand ihrer Basisdaten für die Prävalenzstudie repräsentativ waren.

Die Beobachtung, dass Herzexplantate durch verschiedene virale Erreger persistent infiziert sein können, ist sowohl für die Diagnostik und Therapie von entzündlichen Herzerkrankungen (Kühl et al., 2002) von Bedeutung als auch für die Prävention von Komplikationen, die bedingt durch die im Transplantat vorhandenen Viren nach einer Transplantation möglicherweise auftreten können. Die hohe Virusprävalenz bei den Herzspendern in der vorliegenden Promotionsarbeit bestätigt, dass ein Bedarf für weitere verdichtende Daten im Rahmen von Follow-up Studien an Transplantatempfängern besteht, um die Hypothese einer möglichen Übertragung durch das Transplantat zu belegen. Die sensitive PCR-Technik könnte hierbei in Zukunft hilfreich sein, das Risiko einer Virusübertragung vom Spender zum Empfänger weiter zu untersuchen. Bisher ist dem Aspekt der Virussicherheit hinsichtlich der Präsenz kardiotoxischer Viren in Transplantaten für Herztransplantationen bzw. Herzklappenverpflanzungen kaum Beachtung geschenkt worden (Hakim et al., 1985; Gottesdiener, 1989; Smart et al., 1996; Gallo et al., 1997; Bernabeu-Wittel et al., 1999). Die in dieser Arbeit beschriebenen Daten sind auch bezüglich der Spenderauswahl von Bedeutung, da bedingt durch das limitierte Angebot geeigneter Spenderorgane die Kriterien zur Spenderauswahl zunehmend gelockert werden. So z.B. wird auch die Altersbegrenzung der Spender immer mehr angehoben (López-Navidad und Caballero, 2003), wodurch immer häufiger Spenderorgane älterer Spender transplantiert werden, die, wie hier gezeigt werden konnte, eine signifikant höhere Prävalenz an Virusinfektionen im Herzen aufweisen als bisher vermutet wurde. Shirali et al. (2001) konnten in einer klinischen Studie zeigen, dass der Nachweis von viraler DNA insbesondere von ADV im transplantierten Myokard mit einem 6,5-fach erhöhten Risiko für koronare Vaskulopathie und Transplantatverlust verbunden ist. Mittels PCR-Untersuchungen von Myokardbiopsien herztransplantiertter Kinder konnten die Autoren einen Zusammenhang zwischen bestimmter Virus-DNA und kardialen Ereignissen, die bis zum Transplantatverlust führen, nachweisen. Die genaue Pathogenese der beobachteten Zusammenhänge ist zwar noch unklar, dass es aber neben HCMV weitere virale Trigger gibt, die an der Abstoßungsreaktion eines Herztrans-

plantats beteiligt sein können, sollte spätestens nach den in dieser Arbeit geschilderten Studienergebnissen als gesichert gelten. Die in der Dissertation präsentierten Ergebnisse unterstützen diesen Zusammenhang und weisen darauf hin, dass ein potenzielles gesundheitliches Risiko für Transplantatempfänger durch Virusinfektionen prinzipiell besteht, da die Durchseuchung primär nicht kranker Spenderherzen mit kardiotropen Viren höher ist als bisher vermutet. Dieses Risiko ist vor allem gegeben bei Empfängern von Klappenhomografts, da die zu transplantierenden menschlichen Herzklappen neben den abgelehnten Explantaten von Herzspendern auch zu einem großen Teil von HTx-Explantaten mit einem eindeutigen Befund auf DKMP und KHK stammen. In der vorliegenden Studie konnte erstmalig ein hoher Befall von Herzklappen und subvalvulärem Myokardgewebe mit unterschiedlichen kardiotropen viralen Erregern in Herzklappenspendern nachgewiesen werden (Donoso Mantke et al., 2004b). Eine weitere Studie von Li et al. (2002) mit Patienten, die an einer chronisch-rheumatischen Herzerkrankung gelitten haben, konnte mittels PCR und immunhistochemischem Nachweis erstmalig nur für EV belegen, dass Virusreplikation auch in menschlichen Herzklappengewebe möglich ist. Damit wäre bewiesen, dass im kollagenen Herzklappengewebe Virusinfektion und –replikation nachweisbar sind, was bisher nicht angenommen wurde. Aufgrund der neuen Ergebnisse kann geschlossen werden, dass hier ein medizinisches Problem vorliegt, dessen Bedeutung für das Qualitätsmanagement von Transplantaten (insbesondere Klappenhomografts) in Fachkreisen beraten werden muss. Dabei wären als sinnvolle Therapieoptionen die prophylaktische Anwendung von Impfstoffen, Immunglobulinbehandlung oder antivirale Mittel in Betracht zu ziehen, deren Entwicklung es weiterzuverfolgen gilt.

Zur Virussicherheit von Herztransplantaten und Klappenhomografts werden gegenwärtig virologische Infektionen (hauptsächlich HIV, Hepatitis B- und -C-Virus) ausschließlich durch serologische Untersuchungen erfasst (Balk et al., 1998; Bundesärztekammer, 2001; COE, 2002), so dass Viren bzw. Antikörper, die serologisch nicht nachweisbar sind, auch nicht festgestellt werden können. Darüber hinaus ist auch die Viruslast im Spenderorgan bzw. Homograft auf diese Weise nicht bestimmbar. Zur Verbesserung des Qualitätsmanagements vorwiegend in Homograftbanken (da zeitlich eher durchführbar) wird aufgrund der hier vorgetragenen Ergebnisse ein kombiniertes Verfahren aus PCR-Diagnostik (quantitativ, falls Viruslast

bestimmt werden soll) und histopathologischer Evaluierung zur Untersuchung von Biopsiematerialien bzw. chirurgischen Myokardproben auf die Präsenz viraler Erreger vorgeschlagen. Die Virusdiagnostik sollte nach unseren Erkenntnissen generell die bekannten kardiotropen viralen Erreger wie EV, ADV, HCMV und PVB19 berücksichtigen sowie virale Erreger, die im Zusammenhang von Spender-bezogenen Infektionen in Alлотransplantaten beschrieben worden sind, z.B. Hepatitis B-, Hepatitis C- und Epstein-Barr-Virus (Tilmann, 2002).

Die Hypothese, dass Ljunganviren, die möglicherweise durch wildlebende Nagetier-Arten übertragen werden, eine ätiologische Rolle für humane Erkrankungen spielen (Niklasson et al., 1998; Niklasson et al., 1999), erfordert die Etablierung von zuverlässigen und sensitiven Methoden. Damit sollte das Virus in verschiedenen Arten von Geweben und Körperflüssigkeiten (Plasma, Urin, etc.) von Tieren und Menschen nachgewiesen werden können. Außerdem ist eine Charakterisierung des neuartigen Picornavirus hinsichtlich des Infektionsverlaufs, der Virusreplikation und der Morphologie notwendig, um zukünftige Ergebnisse hinsichtlich des Vorkommens und der pathogenetischen Mechanismen einer LV-Infektion besser interpretieren zu können.

Erste Arbeiten bezüglich der Nachweisbarkeit und näheren Charakterisierung von LV sind in der vorliegenden Dissertationsarbeit durchgeführt worden. So konnte gezeigt werden, dass LV sich besonders gut in Vero-B4-Zellen anzüchten lassen. Während schwedische LV-Stämme sich auch gegebenenfalls auf verschiedenen Nagetier-Zelllinien (BHK-21, CHO, 3T3 usw.) anzüchten ließen, war dies bei den amerikanischen LV-Vertretern kaum möglich. Diese Beobachtungen sind für die Isolierung von LV von Bedeutung. In anderen Studien wurden für schwedische LV-Stämme ebenfalls BHK-21-Zellen bzw. verschiedene Affenzelllinien (Niklasson et al., 1999; Johansson et al., 2002, Johansson et al., 2004) sowie für das amerikanische Isolat M-1146 unter anderem humane Rhabdomyosarcoma-Zellen (RD-Zellen) zur Isolierung und Anzucht verwendet (Johansson et al., 2003). Die unterschiedliche Infektionseffizienz der verschiedenen Isolate für die unterschiedlichen Zelllinien kann zum Beispiel im Zusammenhang mit der Präsenz bzw. Abwesenheit spezifischer Rezeptoren als wichtige Pathogenitätsdeterminanten begründet werden. Diese bestimmen unter anderem den Mechanismus der Virusinternalisierung. Häufig interagieren Viren mit mehr als einem Rezeptorprotein (Modrow et al., 2003). Spezi-

fische Rezeptorproteine für LV sind bisher nicht bekannt. Des Weiteren konnten in der vorliegenden Studie mittels IFT virale Oberflächenproteine im Zytoplasma infizierter Zellen lokalisiert werden, was auf das Zytoplasma als möglichen Replikationsort der LV, ähnlich wie bei anderen Picornaviren, hinweist. Ein CPE war bereits nach einem Tag (Änderung der Zellform) während der Infektion von Vero-B4-Zellen zu erkennen und erreichte nach drei bis vier Tagen sein Maximum (Auflösung des Zellrasens). Der höchste Virustiter, der hierbei bestimmt wurde, betrug bei LV 87-012 10^6 TCID₅₀/ml und war annähernd so hoch wie der Titer (10^7 TCID₅₀/ml), der kürzlich von Johansson et al. (2004) für LV 87-012 auf GMK-G-Zellen (Affennierenzellen) veröffentlicht wurde. Unsere Ergebnisse und die von Johansson und Kollegen zusammengenommen verdeutlichen, dass Affennierenzellen sich im Allgemeinen gut für Anzuchtzwecke und *in vitro*-Zellkulturstudien verwenden lassen.

Zur Zeit existieren keine ausreichenden Daten, die eine mögliche pathogene Rolle von LV in der Ätiologie humaner Erkrankungen wie z.B. Diabetes Typ 1 oder Myokarditis untermauern. Im Rahmen der Kooperation mit den schwedischen Partnern konnte anhand von Labormäusen und eingefangenen Wildmäusen (*C. glareolus*), die typische Anzeichen für Diabetes aufwiesen, erstmalig ein möglicher Zusammenhang mit LV dargestellt werden (Niklasson et al., 2003). Unter anderem unterstreichen die in der vorliegenden Studie dargestellten elektronenmikroskopischen Aufnahmen im Pankreasgewebe infizierter Mäuse diese Hypothese. In den teilweise lysierten Pankreaszellen konnten Picornavirus-ähnliche Partikel nachgewiesen werden, die 27 nm im Durchmesser groß sind und eine kugelförmige nicht-strukturierte Oberfläche aufweisen. Die LV-Partikel kamen meist als kleine Aggregate im Zytoplasma der infizierten Inselzellen vor. Des Weiteren wurden in Seren schwedischer Myokarditispatienten mittels IFT Antikörper gegen LV nachgewiesen (Niklasson et al., 1999). Dass LV eine pathogene Rolle spielen können, wird auch durch weitere Studien unterstützt, in denen gezeigt wird, dass auch andere Picornaviren (z.B. Enteroviren) an der Entstehung von Diabetes oder Myokarditis als mögliche virale Ursache mitwirken können (Klingel et al., 1998; Ylipaasto et al., 2004).

Auf der Grundlage einer begrenzten Anzahl veröffentlichter LV-Sequenzdaten wurden eine RT-PCR sowie eine quantitative real-time RT-PCR zum Nachweis von LV-spezifischen Nukleinsäuresequenzen etabliert. Bei dem real-time Verfahren wurden

zwei sog. TaqMan[®]-*minor-groove-binder*-Sonden eingesetzt, mit denen durch die Berücksichtigung eines Polymorphismus bei nt-Position 302 im LV-Genom sowohl alle schwedischen LV-Stämme (mit der Guanosin-tragenden Sonde) als auch alle amerikanischen Stämme (mit der Cytosin-tragenden Sonde) nachgewiesen werden können. Nach unserem Kenntnisstand ist der gleichzeitige Einsatz von zwei verschiedenen MGB-Sonden, die für einen Einzelbase-Polymorphismus spezifisch und mit demselben Reporterfarbstoff konjugiert sind, zuvor nicht veröffentlicht worden. Die hier entwickelte Methode ist sehr sensitiv bis zu einer Nachweisgrenze von 10 ge/Ansatz und ermöglicht einen zuverlässigen Nachweis in einem Bereich von sechs 10er-Potenzen. Die hohe Spezifität der Methode ist einerseits durch die ausgewählten Primer und Sonden, andererseits durch die Verwendung eines spezifischen Primers in der cDNA-Synthese gewährleistet. Die Ergebnisse im Intra-Assay- bzw. Inter-Assay-spezifischen Test belegen, dass diese neuartige Methode reproduzierbare Ergebnisse liefert. Im Rahmen der Etablierung wurde ein Großteil der verwendeten LV-positiven-Verdachtsproben (Sample-Kontrollen) bestätigt. 33 von 36 Gewebeproben sechs infizierter Labormäuse, die eine Woche nach Infektion sezert wurden, waren positiv für LV mit jeweils hohen Viruslasten im Gehirn. Auch waren alle Plazentaproben von fünf infizierten Mäusen mit Symptomen von intrauterinem Fruchttod als LV-positiv bestätigt worden. Außerdem wurden zwei Plazentaproben von zwei schwedischen Patientinnen mit Diagnose auf Präeklampsie und ein Schweineisolat, welches zuvor durch eine semi-nested PCR positiv befunden worden ist, positiv für LV-spezifische Nukleinsäuresequenzen getestet. Die positiven humanen Plazentaproben werfen die Frage nach einem möglichen Zusammenhang zwischen LV-Infektion und Präeklampsie als weitere mögliche Erkrankung auf. Nach einer persönlichen Auskunft von Dr. B. Niklasson gibt es Hinweise, wonach der drei- bis vierjährige Populationszyklus der schwedischen Rötelmäuse (*C. glareolus*) mit einem Anstieg der Inzidenz der Präeklampsie in der schwedischen Bevölkerung korreliert. Ähnliches wurde zuvor für Myokarditis, Diabetes Typ 1 und Guillain-Barré-Syndrom berichtet (Niklasson et al., 1998). Weitere Untersuchungen in entsprechenden Patientenkollektiven sind in Zukunft notwendig, um derartige Hypothesen zu verifizieren. Auch sollten trotz unserer negativen Daten bei den Herztransplantempfängern und Herzspendern aus dem DHZB weitere Untersuchungen vor allem an Patienten mit akuter Myokarditis in Zukunft durchgeführt werden, um vergleichbare Daten zu schwedischen Patienten zu erhalten. Des Weiteren sollten, ähnlich

wie in Schweden, einheimische Nagetierpopulationen im Rahmen eines Surveys auf das Vorhandensein von LV getestet werden, um die mögliche Verbreitung von LV innerhalb von wildlebenden Mäusepopulationen in Deutschland zu untersuchen.

5. Zusammenfassung in Deutsch und Englisch

Zusammenfassung:

Virusinfektionen sind eine häufige Ursache von entzündlichen Erkrankungen am menschlichen Herzen, wie z.B. der akuten und chronischen Myokarditis, dilatativen Kardiomyopathie oder der koronaren Herzkrankheit, und gelten daher weltweit als eine der Hauptursachen für Morbidität und Mortalität bei kardiovaskulären Erkrankungen. Des Weiteren sind Virusinfektionen im transplantierten Myokard an kardialen Ereignissen beteiligt, die bis zum Transplantatverlust führen können. In der vorliegenden, derzeitig umfangreichsten Prävalenzstudie für kardiotope Viren wurden mit Hilfe der PCR Herzgewebeproben (sowohl Myokard- als auch Herzklappengewebe) aus Herztransplantatempfängern (HTx-Patienten) und Herzspendern untersucht, um die Häufigkeit einzelner in Frage kommender viralen Erreger in erkrankten bzw. gesunden Herzen zu klären. In der Studie eingeschlossen wurden a) kardiotope virale Erreger, für die ein ätiologischer Zusammenhang mit entzündlichen Herzerkrankungen belegt worden ist wie Enteroviren (EV), Adenoviren (ADV), humanes Zytomegalievirus (HCMV), Parvovirus B19 (PVB19) und Influenzavirus (Typ A und B) sowie b) virale Erreger mit bisher unbekanntem Risiko wie die – erst kürzlich in schwedischen Mäusepopulationen beschriebenen – Ljunganviren (LV) und Hantaviren (Typ Puumala und Dobrava).

Die Untersuchung von insgesamt 449 Myokardproben hat hierbei ergeben, dass 34 von 73 HTx-Patienten (47 %) und 48 von 80 Herzspendern (60 %) positiv für mindestens einen der untersuchten Viren waren. Virale Nukleinsäuresequenzen wurden signifikant häufiger in Spendern mit einem Spenderalter über 65 Jahren nachgewiesen als in HTx-Patienten ($P= 0,005$) oder Spendern mit einem Spenderalter unter 65 Jahren ($P= 0,02$). Des Weiteren konnte erstmalig auch ein hoher Befall von subvalvulärem Myokardgewebe (64 %) und Herzklappen (53 %) in 30 Herzklappenspendern nachgewiesen werden. Insgesamt wurde eine hohe Prävalenz von EV (vor allem Coxsackievirus B-ähnlichen Viren) und ADV festgestellt. Weniger häufig wurden HCMV und PVB19 nachgewiesen, denen jedoch ebenfalls eine Bedeutung als kardiotope Erreger zugeschrieben wird. Keine der hier untersuchten Proben war positiv für Influenza-, Ljungan- oder Hantaviren, was eher darauf hinweist, dass die Prävalenz dieser Erreger in humanen Herzgewebe deutlich geringer ist als die an-

derer Viren und dass diese Erreger wahrscheinlich eher eine Rolle bei akuten Infektionen spielen, die nicht den Hauptbestandteil in unserem Patientenkollektiv bildeten. In 88 % der untersuchten Fälle wurde eine hohe Korrelation zwischen den PCR-Befunden und histopathologischen Ergebnissen gezeigt. Im Gegensatz dazu waren die serologischen Ergebnisse der zum Einsatz gekommenen kommerziellen ELISA-Teste weitgehend diskordant (zwischen 4 % und 27 %) hinsichtlich des Nachweises von IgG-Antikörpern, wodurch die potenziell virale Ursache chronischer Krankheitsverläufe übersehen werden kann.

Die Beobachtung, dass Herzexplantate durch verschiedene virale Erreger persistent infiziert sein können, ist sowohl für die Diagnostik und Therapie von entzündlichen Herzerkrankungen von Bedeutung als auch für die Prävention von Komplikationen, die, bedingt durch die im Transplantat vorhandenen Viren, nach einer Transplantation möglicherweise auftreten können. Die sensitive PCR-Technik könnte in Zukunft hilfreich sein, das Risiko einer Virusübertragung vom Spender auf den Empfänger näher zu untersuchen. Die hier beschriebenen Daten sind auch bezüglich der Spenderauswahl von Bedeutung, da bedingt durch das limitierte Angebot geeigneter Spenderorgane die Kriterien zur Spenderauswahl zunehmend gelockert werden. So wird z.B. die Altersbegrenzung der Spender immer mehr angehoben, wodurch immer häufiger Spenderorgane älterer Spender transplantiert werden, die, wie hier gezeigt werden konnte, eine signifikant höhere Prävalenz möglicher Virusinfektionen im Herzen aufweisen als bisher vermutet. Zur Verbesserung des Qualitätsmanagements bei Transplantaten wird ein kombiniertes Verfahren aus PCR-Diagnostik und histopathologischer Evaluierung zur Untersuchung von Biopsiematerialien bzw. Myokardproben auf die Präsenz viraler Erreger vorgeschlagen. Die Virusdiagnostik sollte nach den in dieser Studie belegten neueren Erkenntnissen generell die bekannten kardiotropen viralen Erreger wie EV, ADV, HCMV und PVB19 berücksichtigen sowie weitere virale Erreger, die im Zusammenhang von Spender-bezogenen Infektionen in Alлотransplantaten beschrieben worden sind, z.B. Hepatitis B-, Hepatitis C- und Epstein-Barr-Virus.

Summary:

Virus infections are implicated in the etiology of cardiovascular diseases like acute and chronic myocarditis, dilated cardiomyopathy (DCM) or coronary heart disease (CHD), which are the leading causes of heart failure with a high morbidity and mortality worldwide. Affected individuals may require long-term medical therapy for chronic heart failure with a high economic burden including cardiac transplantation costs. In Germany almost 60 percent of all indications for cardiac transplantation are due to DCM and 27 percent due to CHD. Furthermore, virus infections of the heart have been reported to be potentially implicated in atherosclerosis, coronary vasculopathy, lymphoproliferative disease and graft loss after cardiac allograft transplantation, developments which limit the survival of recipients. Although laboratory diagnosis of viral heart disease has improved in recent years due to molecular techniques such as polymerase chain reaction (PCR) and *in situ* hybridization, these techniques are not yet widely applied. Due to few or controversial data regarding the prevalence of the different possible viral agents in these heart diseases, the aim of this presently most extensive study was to examine myocardial and heart valve tissue samples from explanted hearts of heart transplant (HTx) recipients and heart donors for nucleic acids of myocardiotropic viruses.

To assess the prevalence, myocardial and heart valve tissue samples were analyzed by different PCR methods for screening of viral agents which were linked to inflammatory heart disease, like enteroviruses (EV), adenoviruses (ADV), human cytomegalovirus (HCMV), parvovirus B19 (PVB19) and influenza viruses (type A and B). Additionally, screening was also performed for the newly described Ljungan viruses and the also rodent-derived Hanta viruses (type Puumala and Dobrava) which are suspected to be involved in human heart disease. PCR analysis of 449 myocardial tissue samples from explanted hearts indicated infection in 34 of 73 HTx-recipients (47 percent) and 48 of 80 donors (60 percent). The prevalence of virus infection in donors aged over 65 years was significantly higher than that in HTx-recipients ($P= 0.005$) or donors aged under 65 years ($P= 0.02$). Furthermore, high prevalence of viral DNA could be shown for the first time in subvalvular myocardial tissue (64 percent) and non-coronary valve samples (53 percent) from 30 heart valve donors. The most frequently detected viruses were EV (group B coxsackieviruses) and ADV. HCMV and PVB19 were found less frequently but these viruses should

also be recognized as potential cardiotropic pathogens in patients of all ages. All tested samples were negative for influenza, Ljungan or hanta viruses, indicating low prevalence of these viral agents in human heart tissue compared to the other viruses. Maybe these viruses play only a role in early acute heart diseases, but the majority of the patients tested in our heart study presented diseases with chronic course like DCM and CHD. This should be taken into consideration for future study design and patient selection. While the serological findings and PCR results for different viruses were discordant in 4 to 27 percent of the cases, there was a high correlation (88 percent) between PCR and histopathological findings. The serological results indicated a risk of overlooking the potential viral cause of chronic inflammatory heart disease by using commercial ELISA tests.

The observation that heart explants may be persistently infected by different viral agents is of importance not only for the diagnosis of inflammatory cardiac disease, but also for the prevention of post-transplantation complications. The highly sensitive PCR technique as shown here seems helpful in estimating the risk of virus transmission from donor to recipient. The obtained data are important for virological safety aspects in donor selection, because the criteria for donor selection have become looser, e.g. the age limit of donors was reduced, allowing transplantation of donor organs from older people which, as shown here, demonstrated a significantly higher prevalence of virus infection in the heart. For improvement of virus safety in cardiac transplantation and homograft banking it should be recommended to screen the donor organs and tissues with a multi-technology approach, using PCR in addition to or instead of serological analysis together with histological evaluation. Viral diagnostics should include the known cardiotropic viruses like EV, ADV, HCMV, PVB19, as done in this study, and viral agents of general importance for donor-associated infection in allograft transplantation (e.g. HBV, HCV, and EBV).

6. Anhang

6.1 Abkürzungsverzeichnis

Viren

ADV	Adenoviren
EV	Enteroviren
HCMV	<i>human cytomegalovirus</i> (humanes Zytomegalievirus, HHV-5)
LV	Ljunganvirus
PVB19	Parvovirus B19

Sonstige Abkürzungen, Zeichen oder Einheiten

A	Adenin (eine der vier Basen der DNA)
Abb.	Abbildung
ad	bis zu
AG	Arbeitsgruppe
AMLA	anti-Myolemma-Antikörper
ANT	Adenin-Nukleotid-Translokator (Autoantigen in der Herzmuskelerkrankung)
aq	<i>aqua</i> (Wasser)
as	<i>antisense</i>
ASA	anti-Sarkolemma-Antikörper
bidest.	doppelt destilliert
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin (eine der vier Basen der DNA)
ca.	circa (zirka, ungefähr, etwa)
CAR	Coxsackie- und Adenovirusrezeptor
CD	<i>chain domain</i> (Oberflächenmolekül auf einer Reihe von Immuneffektorzellen)
cDNA	<i>complementary DNA</i> (komplementäre DNA)
CPE	<i>cytopathogenic effect</i> (zytopathischer Effekt)
CRP	C-reaktives-Protein (Entzündungsparameter)
CsCl	Cäsiumchlorid
DAF	Decay-accelerating-factor (CD55-Rezeptor auf Myozyten und Endothelzellen)
DEPC	Diethylpyrocarbonat (wird benötigt, um Wasser RNase-frei zu machen)
dest.	destilliert
d.h.	das heißt
DHZB	Deutsches Herzzentrum Berlin

DIfE	Deutsches Institut für Ernährungsforschung
DKMP	dilatative Kardiomyopathie
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTPs	2'-Desoxynukleosid-5'-Triphosphate (umfasst dATP, dCTP, dGTP und dTTP)
dNUTPs	Desoxyribonukleotidtriphosphate (mit Uridintriphosphat statt Thymidintriphosphat)
DSO	Deutsche Stiftung Organspende
DTT	Dithiothreitol (ein Reduktionsmittel)
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i> (Enzym-gekoppelter Antikörpernachweis)
et al.	<i>et alteri</i> (und andere)
FAM (F)	6-Carboxy-Fluoreszein (TM-Sondenfluoreszenzfarbstoff)
FISH	Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat (Fluoreszenzfarbstoff)
FKS	fötale Kälberserum
G	Guanin (eine der vier Basen der DNA)
GAPDH	Glyzeryl-3-Phosphat-Dehydrogenase (Referenzgen)
GTC	Guanidinisothiocyanat
HE	Hämatoxilin-Eosin (Schnitffärbung in der Lichtmikroskopie)
Hrsg.	Herausgeber
HTx	Herztransplantation
i.d.R.	in der Regel
IFN	Interferon (wichtige Zytokingruppe innerhalb der natürlichen Immunabwehr)
IFT	Immunofluoreszenztest
IgG	Immunglobulin G (Antikörper-Klassifizierung, Klasse G)
IgM	Immunglobulin M (Antikörper-Klassifizierung, Klasse M)
IKMP	ischämische Kardiomyopathie
ISH	<i>in situ</i> -Hybridisierung
IVIG	intravenöses Immunglobulin
Kap.	Kapitel
KHK	koronare Herzkrankheit
LVHW	Linker Ventrikel Hinterwand
LVVW	Linker Ventrikel Vorderwand
MGB	<i>minor groove binder</i> (organische Ringstruktur)
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
M-MLV-RT	Moloney-Maus-Leukämie-Virus Reverse Transkriptase
n	Anzahl
NCR	nicht-codierende Region eines Genoms
NRZ	Nationales Referenzzentrum
p	3'-Phosphat
PA	Polyallomer

PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PP	Polypropylen
RKI	Robert Koch-Institut
RKMP	restriktive Kardiomyopathie
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RNase	Ribonuklease
ROX	6-Carboxy-X-Rhodamin (Referenzfarbstoff in der TaqMan [®] -PCR)
RPII	RNA-Polymerase II (Referenzgen)
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR
RV	Rechter Ventrikel
s	<i>sense</i>
SMB	<i>suckling mouse brain</i> (Jungmäusehirn-Kultur zur Virusanzucht)
sog.	so genannten
T	Thymin (eine der vier Basen der DNA)
Tab.	Tabelle
TAMRA (T)	6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin (TM-Sondenfluoreszenzfarbstoff)
TAE	Tris-Acetat-EDTA (Elektrophoresepuffer)
TBE	Tris-Borat-EDTA (Elektrophoresepuffer)
T _m	<i>melting temperature</i> (Schmelztemperatur)
TM	TaqMan [®] -Sonde
TMB	Tetramethylbenzidin
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
U	Uracil
UDG	Uracil-DNA-Glykosylase
usw.	und so weiter
UV	Ultraviolett
UZF	Ultrazentrifugation
v/v	<i>volume/volume</i> (Volumen pro Volumen)
v/w	<i>volume/weight</i> (Volumen pro Gewicht)
w/v	<i>weight/volume</i> (Gewicht pro Volumen)
z.B.	zum Beispiel
ZBS	Zentrum für Biologische Sicherheit am RKI
%	Prozent
®	registrierter Produktname

bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
cm ³	Kubikzentimeter
C _T	<i>threshold cycle</i> (Fluoreszenz-Schwellenwert)
g	Gramm
ge	<i>genome equivalent</i> (Genomäquivalent)
h	Stunde(n)
IU	<i>International Unit</i> (Mengenangabe für biologisch aktive Substanzen)
J.	Jahr(e)
kD	Kilodalton
kV	Kilovolt
L	Liter
M	Molar
mesh	Maschen pro Inch (Anzahl von Löchern in einem Grid)
mg	Milligramm (10 ⁻³ g)
µg	Mikrogramm (10 ⁻⁶ g)
ml	Milliliter (10 ⁻³ L)
µl	Mikroliter (10 ⁻⁶ L)
mM	Millimolar (10 ⁻³ M)
µM	Mikromolar (10 ⁻⁶ M)
mm	Millimeter (10 ⁻³ Meter)
µm	Mikrometer (10 ⁻⁶ Meter)
min	Minute(n)
MOI	<i>Multiplicity of Infection</i> (Angabe für ein Virusinokulum)
ng	Nanogramm (10 ⁻⁹ g)
nm	Nanometer (10 ⁻⁹ Meter)
nt	Nukleotide (Nukleotidzahl)
NYHA	Klassifikation der Herzinsuffizienz nach <u>N</u> ew <u>Y</u> ork <u>H</u> eart <u>A</u> ssociation (I-IV)
OD	<i>optical density</i> (optische Dichte/ Absorption)
P	Wahrscheinlichkeitswert (Index für statistische Signifikanz)
pg	Pikogramm (10 ⁻¹² g)
pH	<i>pondus hydrogenii</i> (Maß für den Säuregehalt)
pmol	Pikomol (10 ⁻¹² mol)
sec	Sekunden
TCID ₅₀	<i>median Tissue Culture Infectious Dose</i> (Virustiterangabe)
U	<i>Unit</i> (Mengenangabe bei Enzymen)
UpM	Umdrehung pro Minute
V	Volt

6.2 Abbildungsverzeichnis (Bildquellennachweis)

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Herz-Lungen-Kreislaufes. (www.medicine-world-wide.de/krankheiten/herz_kreislauf_erkrankungen/allgemeines.html).....	4
Abbildung 2: Schema der Unterteilung des Herzens. (www.medizinus.de/herz.php; weiter bearbeitet).....	5
Abbildung 3: Plastinat der Herzkammern als Schnittmodell. (Institut für Plastination, Heidelberg; weiter bearbeitet).....	6
Abbildung 4: Mögliche Mechanismen der viralen Herzmuskelerkrankung. (nach: P. Muir, Symposium „Viruses and cardiovascular disease“, IUMS-Paris 2002).....	16
Abbildung 5: Homograft nach der Präparation. (Foto: M. Niedrig und O. Donoso Mantke, RKI, ZBS-1).....	32
Abbildung 6: Die Rötelmaus <i>C. glareolus</i>. (Foto: B. Niklasson, Apodemus AB, Stockholm, Schweden).....	33
Abbildung 7: Entnahme von Myokardproben im Homograftlabor. (Foto: M. Niedrig und O. Donoso Mantke, RKI, ZBS-1).....	50
Abbildung 8: Fünf-Punkte-Standardkurven für das PicoGreen® dsDNA Quantitation Reagens (Molecular Probes).....	58
Abbildung 9: Reaktionsprinzip der TaqMan®-PCR (modifiziert nach Lottspeich und Zorbas, 1998).....	62
Abbildung 10: Exemplarische Darstellungen pathologischer Veränderungen, die zur Ablehnung eines Spenderorgans führen würden. (R. Meyer, Homograftbank, DHZB, Berlin).....	80
Abbildung 11: Klinische Diagnosen der HTx-Patienten.....	101
Abbildung 12: Todesursachen der Herzspender.....	102
Abbildung 13: Ablehnungsgründe der Donor-Herzen.....	102

Abbildung 14: Gelelektrophoretische Darstellung von unterschiedlich präparierten RNA-Proben aus gefrorenem Herzmuskelgewebe. (O. Donoso Mantke).....	106
Abbildung 15: RNA aus unterschiedlichen Gewebeproben (Beispiele). (O. Donoso Mantke).....	107
Abbildung 16: Nachweis von PCR-Produkten mittels Agarose-Gelelektrophorese. (Bild A: O. Donoso Mantke; Bild B und C: S. Prösch, Institut für Virologie, Charité, Berlin).....	110
Abbildung 17: Sequenzanalysen der EV-spezifischen Amplifikate.	112
Abbildung 18: Standardkurve für die quantitative real-time PCR zum Nachweis von PVB19.	113
Abbildung 19: Tests zur Etablierung der quantitativen real-time PCR zum Nachweis von PVB19.	115
Abbildung 20: Nachweis von Nukleinsäuresequenzen kardiotoxischer Viren mittels ISH. (R. Kandolf und K. Klingel, Institut für Pathologie, Universität Tübingen).....	116
Abbildung 21: Histopathologische Befunde der HTx-Explantate.	119
Abbildung 22: Darstellung der Beziehung zwischen der Anzahl der nachgewiesenen verschiedenen Erregertypen pro Explantat und dem Grad der Gewebsschädigung.	121
Abbildung 23: Infektionsverlauf unterschiedlicher LV-Stämme in Vero-B4-Zellen.	124
Abbildung 24: Immunzytochemischer Nachweis von LV in Vero-B4-Zellen. (O. Donoso Mantke).....	125
Abbildung 25: Elektronenmikroskopischer Nachweis von Ljunganviren. (O. Donoso Mantke; mit freundlicher Genehmigung von Annals of the New York Academy of Sciences).....	126
Abbildung 26: Spezifitätstest zur Etablierung der quantitativen real-time RT-PCR für LV....	128
Abbildung 27: Standardkurve für die quantitative real-time RT-PCR zum Nachweis von LV.	129

Abbildung 28: Sequenzalignment der LV-positiven Plazentaprobe (A und E) sowie des Schweineisolats (SMB 941) im Vergleich zu der Insert-Plasmid-Kontrolle und dem Prototyp LV 87-012..... 132

6.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ursachen einer Myokarditis.....	8
Tabelle 2: Ursachen einer DKMP.....	10
Tabelle 3: Nachweis viraler Nukleinsäuren mittels PCR in verschiedenen Studien.....	15
Tabelle 4: An der Atherogenese beteiligte Erreger.....	23
Tabelle 5: Charakteristika der Primer und Sonden in den unterschiedlichen PCR-Ansätzen zum Virusnachweis.....	65
Tabelle 6: Daten zu den Patienten und Proben.....	100
Tabelle 7: Altersverteilung der HTx-Patienten und Herzspender.....	101
Tabelle 8: Vergleich der Parameter zur DNA-Isolierung von drei verschiedenen DNA-Extraktionsmethoden.....	104
Tabelle 9: Vergleich der Parameter zur RNA-Isolierung von sechs verschiedenen RNA-Extraktionsmethoden.....	105
Tabelle 10: Daten der Nukleinsäurepräparation aller untersuchten Gewebeproben.....	107
Tabelle 11: Positive PCR-Ergebnisse der untersuchten Explantate und Myokardproben.....	109
Tabelle 12: Positive PCR-Ergebnisse der Herzklappen-Gewebeproben.....	111
Tabelle 13: Intra-Assay-spezifischer und Inter-Assay-spezifischer Test für die quantitative real-time PCR zum Nachweis von PVB19.....	114
Tabelle 14: Vergleich zwischen den histopathologischen Befunden und den PCR-Ergebnissen.....	118
Tabelle 15: Überprüfung der Infektionseffizienz verschiedener LV-Isolate für unterschiedliche adhärente Zelllinien.....	123

Tabelle 16: Intra-Assay-spezifischer und Inter-Assay-spezifischer Test für die quantitative real-time PCR zum Nachweis von LV..... 130

Literaturverzeichnis

Anderson JL, Carlquist JF, Muhlestein JB, Horne BD, Elmer SP. Evaluation of C-reactive protein, an inflammatory marker, and infectious serology as risk factors for coronary artery disease and myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 1998; 32:35-41.

Andreoletti L, Hober D, Decoene C, et al. Detection of enteroviral RNA by polymerase chain reaction in endomyocardial tissue of patients with chronic cardiac diseases. *J Med Virol* 1996; 48:53-9.

Andreoletti L, Bourlet T, Moukassa D, et al. Enteroviruses can persist with or without active viral replication in cardiac tissue of patients with end-stage ischemic or dilated cardiomyopathy. *J Infect Dis* 2000; 182:1222-7.

Archard LC, Khan MA, Soteriou BA, Zhang H, Why HJ, Robinson NM, Richardson PJ. Characterization of Coxsackie B virus RNA in myocardium from patients with dilated cardiomyopathy by nucleotide sequencing of reverse transcription-nested polymerase chain reaction products. *Hum Pathol* 1998; 29:578-84.

Aretz HT, Billingham ME, Edwards WD, et al. A histopathologic definition and classification. *Am J Cardiovasc Pathol* 1986; 1:3-14.

AWMF-Leitlinien. Elektronische Publikationen der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, Herz- und Kreislaufforschung: awmf@uni-duesseldorf.de

Baboonian C, Treasure T. Meta-analysis of the association of enteroviruses with human heart disease. *Heart* 1997; 78:539-43.

Balk AHMM, Maat APWM, Weimar W, et al. Heart transplantation: Guidelines for the referring cardiologist. *Cardiologie* 1998; 5:702-15.

Barbaro G, Di Lorenzo G, Grisorio B, Barbarini G. Incidence of dilated cardiomyopathy and detection of HIV in myocardial cells of HIV-positive patients. *N Engl J Med* 1998; 339:1093-9.

Bauer HM, Ting Y, Greer CE, et al. Genital human papillomavirus infection in female university students as determined by a PCR-based method. *JAMA* 1991; 265:472-7.

Bauer S, Gottesman G, Sirota L, Litmanovitz I, Ashkenazi S, Levi I. Severe Coxsackie virus B infection in preterm newborns treated with pleconaril. *Eur J Pediatr* 2002; 161:491-3.

- Berensci K**, Endresz V, Klurfeld D, et al. Early atherosclerotic plaques in the aorta following cytomegalovirus infection of mice. *Cell Adhes Commun* 1998; 5:39-47.
- Bergelson JM**, Mohanty JG, Crowell RL, St. John NF, Lublin DF, Finberg RW. Coxsackievirus B3 adapted to growth in RD cells binds to decay-accelerating factor (CD55). *J Virol* 1995; 69:1903-6.
- Bergelson JM**, Cunningham JA, Droguett G, et al. Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* 1997a; 275:1320-3.
- Bergelson JM**, Modlin JF, Wieland-Alter W, Cunningham JA, Crowell RL, Finberg RW. Clinical coxsackievirus B isolates differ from laboratory strains in their interaction with two cell surface receptors. *J Infect Dis* 1997b; 175:697-700.
- Bernabeu-Wittel M**, Canas Garcia-Otero E, Herrero Romero M, et al. Infectious complications of heart transplantation. A prospective study for the first 6 years of a transplantation program. *Rev Clin Esp* 1999; 199:489-95.
- Binah O**. Cytotoxic lymphocytes and cardiac electrophysiology. *J Mol Cell Cardiol* 2002; 34:1147-61.
- Blankenberg S**, Rupprecht HJ, Bickel C, et al. Cytomegalovirus infection with interleukin-6 response predicts cardiac mortality in patients with coronary artery disease. *Circulation* 2001; 103:2915-21.
- Botten J**, Mirowsky K, Kusewitt D, et al. Experimental infection model for Sin Nombre hantavirus in the deer mouse (*Peromyscus maniculatus*). *PNAS* 2000; 97:10578-83.
- Botten J**, Mirowsky K, Kusewitt D, et al. Persistent Sin Nombre virus infection in the deer mouse (*Peromyscus maniculatus*) model: Sites of replication and strand-specific expression. *J Virol* 2003; 77:1540-50.
- Bowles NE**, Vallejo J. Viral causes of cardiac inflammation. *Curr Opin Cardiol* 2003; 18:182-8.
- Bowles NE**, Kearney DL, Ni J et al. The detection of viral genomes by polymerase chain reaction in the myocardium of pediatric patients with advanced HIV. *J Am Coll Cardiol* 1999; 34:857-65.
- Bowles NE**, Ni J, Kearney DL et al. Detection of viruses in myocardial tissues by polymerase chain reaction. Evidence of adenovirus as a common cause of myocarditis in children and adults. *J Am Coll Cardiol* 2003; 42:466-72.
- Brown KE**, Anderson SM, Young NS. Erythrocyte P antigen: cellular receptor for B19 parvovirus. *Science* 1993; 262:114-7.

Bruggeman CA. Does cytomegalovirus play a role in atherosclerosis? *Herpes* 2000; 7:51-4.

Bruggeman CA, Marjorie HJ, Nelissen-Vrancken G. Cytomegalovirus and atherogenesis. *Antiviral Res* 1999; 43:135-44.

Bültmann BD, Klingel K, Sotlar K, et al. Fatal Parvovirus B19-associated myocarditis clinically mimicking ischemic heart disease: An endothelial cell-mediated disease. *Human Pathol* 2003; 34:92-5.

Bundesärztekammer. Richtlinien zur Organtransplantation gemäß §16 Transplantationsgesetz. Anforderungen an die im Zusammenhang mit einer Organentnahme und –übertragung erforderlichen Maßnahmen zur Qualitätssicherung. *Deutsches Ärzteblatt* 98, Heft 34-35, 27. August 2001.

Burkhardt F. Mikrobiologische Diagnostik. Stuttgart: Thieme Verlag, 1992.

Caforio AL, Goldman JH, Haven AJ, Baig KM, McKenna WJ. Evidence for autoimmunity to myosin and other heart-specific autoantigens in patients with dilated cardiomyopathy and their relatives. *Int J Cardiol* 1996; 54:157-63.

Caforio AL, Mahon NJ, Tona F, McKenna WJ. Circulating cardiac antibodies in dilated cardiomyopathy and myocarditis: Pathogenetic and clinical significance. *Eur J Heart Fail* 2002; 4:411-7.

Cardullo RA, Agrawal S, Flores C, Zamecnik PC, Wolf DE. Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer. *PNAS* 1988; 85:8790-4.

Carson S, Chapman NM, Tracy S. Purification of the putative coxsackievirus B receptor from HeLa cells. *Biochem Biophys Res Comm* 1997; 233:325-8.

Chen R, Xiong S, Yang Y, Fu W, Wang Y, Ge J. The relationship between human cytomegalovirus infection and atherosclerosis development. *Mol Cell Biochem* 2003; 249:91-6.

Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ, Rutter WJ. Isolation of biological active ribonucleic acid isolated from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 1979; 18:5294-9.

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162:156-9.

Chow LH, Beisel KW, McManus. Enteroviral infection of mice with severe combined immunodeficiency. Evidence for direct viral pathogenesis of myocardial injury. *Lab Invest* 1992; 66:24-31.

COE. Guide to safety and quality assurance for organs, tissues and cells. Strasbourg: Council of Europe, 2002.

Cowie MR, Wood DA, Coats AJS, Thompson SG, Poole-Wilson PA, Suresh V, Sutton GC. Incidence and aetiology of heart failure: A population-based study. *Eur Heart J* 1999; 20:421-8.

Craig ME, Robertson P, Howard NJ, Silink M, Rawlinson WD. Diagnosis of enterovirus infection by genus-specific PCR and enzyme-linked immunosorbent assays. *J Clin Microbiol* 2003; 41:841-4.

Cunnion RE, Parrillo JE. Immunosuppressive therapy for myocarditis [letter; comment]. *N Engl J Med* 1995; 333: 1713-4.

Danesh J. Coronary heart disease, *Helicobacter pylori*, dental disease, *Chlamydia pneumoniae*, and cytomegalovirus: meta-analyses of prospective studies. *Am Heart J* 1999; 138:S434-7.

Danesh J, Collins R, Peto R. Chronic infections and coronary heart disease: Is there a link? *Lancet* 1997; 9:430-6.

Danesh J, Whincup P, Walker M, et al. *Chlamydia pneumoniae* IgG titres and coronary heart disease: prospective study and meta-analysis. *Br Med J* 2000; 321:208-13.

Davies JM. Molecular mimicry: Can epitope mimicry induce autoimmune disease? *Immunol Cell Biol* 1997; 75:113-26.

Dec GW, Fuster V. Idiopathic dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med* 1994; 331:1564-75.

Deguchi H, Fujioka S, Terasaki F, et al. Enterovirus RNA replication in cases of dilated cardiomyopathy: light microscopic in situ hybridization and virological analyses of myocardial specimens obtained at partial left ventriculectomy. *J Card Surg* 2001; 16:64-71.

Dettmeyer R, Kandolf R, Baasner A, Banaschak S, Eis-Hübinger AM, Madea B. Fatal parvovirus B19 myocarditis in an 8-year-old boy. *J Forensic Sci* 2003; 48:183-6.

DHZB. Jahresbericht 2001 des Homograflabors des DHZB. Berlin: DHZB, 2002. (www.dhzb.de/hgl/)

DHZB. Jahresbericht 2003 des Homograflabors des DHZB. Berlin: DHZB, 2004. (www.dhzb.de/hgl/)

Donoso Mantke O, Meyer R, Prösch S, Pregla R, Niedrig M. Nachweis viraler Genomstrukturen im Myokardgewebe von Herzklappenspendern. *Z Herz-, Thorax-, Gefäßschir* 2003; 17:9-16
(www.springerlink.com)

Donoso Mantke O, Nitsche A, Meyer R, Klingel K, Niedrig M. Analysing myocardial tissue from explanted hearts of heart transplant recipients and multi-organ donors for the presence of parvovirus B19 DNA. *J Clin Virol* 2004a; 31:32-9.

Donoso Mantke O, Meyer R, Prösch S, Niedrig M. Frequent detection of viral nucleic acids in heart valve tissue. *J Clin Microbiol* 2004b; 42:2298-300.

Dorfell WV, Wallukat G, Baumann G, et al. Immunoabsorption in dilated cardiomyopathy. *Ther Apher* 2000; 4:235-8.

DSO. Organspende und Transplantation in Deutschland. Jahresbericht 2001 der Deutschen Stiftung Organtransplantation (DSO). Neu-Isenburg: DSO, 2002.

Dunn J, Chapman NM, Tracy S, Romero J. Genomic determinants of cardiovirulence in Coxsackievirus B3 clinical isolates: Localization to the 5' nontranslated region. *J Virol* 2000; 74:4787-94.

Einsele H, Vallbracht A, Jahn G, Kandolf R, Muller CA. Hybridization techniques provide improved sensitivity for HCMV detection and allow quantitation of the virus in clinic samples. *J Virol Methods* 1989; 26:91-104.

Ellis RW. Infection and coronary heart disease. *J Med Microbiol* 1997; 46:535-9.

Enders G, Dotsch J, Bauer J, et al. Life-threatening parvovirus B19-associated myocarditis and cardiac transplantation as possible therapy: Two case reports. *Clin Infect Dis* 1998; 26:355-8.

Epstein SE, Zhu J, Burnet MS, Zhou YF, Vercellotti G, Hajjar D. Infection and atherosclerosis. Potential roles of pathogen burden and molecular mimicry. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20:1417-20.

Fabricant CG, Fabricant J. Atherosclerosis induced by infection with Marek's disease virus in chickens. *Am Heart J* 1999; 138:S465-8.

Feuer R, Mena I, Pagarigan RR, Slifka MK, Whitton JL. Cell cyclic status affects coxsackievirus replication, persistence, and reactivation in vitro. *J Virol* 2002; 76:4430-40.

Feuer R, Mena I, Pagarigan RR, Hassett DE, Whitton JL. Coxsackievirus replication and the cell cycle: a potential regulatory mechanism for viral persistence/latency. *Med Microbiol Immunol* 2004; 193:83-90.

Fransen K, Mortier D, Heyndrickx L, Verhofstede C, Janssens W, van der Groen G. Isolation of HIV-1 RNA from plasma: Evaluation of seven different methods for extraction (part two). *J Virol Methods* 1998; 76:153-7.

Fujioka S, Kitaura Y, Ukimura A, et al. Evaluation of viral infection in the myocardium of patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2000; 36:1920-6.

Fukae S, Ashiwaza N, Morikawa S, Yano K. A fatal case of fulminant myocarditis with human herpesvirus-6 infection. *Intern Med* 2000; 39:632-6.

Gallo P, Agozzino L, Angelini A, et al. Causes of late failure after heart transplantation: A ten-year survey. *J Heart Lung Transplant* 1997; 16:1113-21.

Gao SZ, Chaparro SV, Perlroth M, et al. Post-transplantation lymphoproliferative disease in heart and heart-lung transplant recipients: 30-year experience at Stanford University. *J Heart Lung Transplant* 2003; 22:505-14.

Gauntt CJ, Arizpe HM, Higdon, et al. Molecular mimicry, anti-coxsackievirus B3 neutralizing monoclonal antibodies, and myocarditis. *J Immunol* 1995; 154:2983-95.

Giacca M, Severini GM, Mestroni L, Salvi A, Lardieri G, Falaschi A, Camerini F. Low frequency of detection by nested polymerase chain reaction of enterovirus ribonucleic acid in endomyocardial tissue of patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 1994; 24:1033-40.

Giles C, Shuttleworth EM. Postmortem findings in 46 influenza deaths. *Lancet* 1957; 273: 1224-5.

Gottesdiener KM. Transplanted infections: donor-to-host transmission with the allograft. *Ann Intern Med* 1989; 110:1001-16.

Griffin LD, Kearney D, Ni J, et al. Analysis of formalin-fixed and frozen myocardial autopsy samples for viral genome in childhood myocarditis and dilated cardiomyopathy with endocardial fibroelastosis using polymerase chain reaction (PCR). *Cardiovasc Pathol* 1995; 4:3-11.

Gulizia JM, Kandolf R, Kendall TJ, et al. Infrequency of cytomegalovirus genome in coronary arteriopathy of human heart allografts. *Am J Pathol* 1995; 147:461-75.

Gullestad L, Aass H, Fjeld JG, et al. Immunomodulating therapy with intravenous immunoglobulin in patients with chronic heart failure. *Circulation* 2001; 103:220-5.

Gupta S, Camm AJ. Is there an infective aetiology to atherosclerosis? *Drugs Aging* 1998a; 13:1-7.

Gupta S, Camm AJ. *Chlamydia pneumoniae*, antimicrobial therapy and coronary disease: A critical overview. *Coron Artery Dis* 1998b; 9:339-43.

Hahn EA, Hartz VL, Moon TE, et al. The Myocarditis Treatment Trial: Design, methods and patients enrolment. *Eur Heart J* 1995; 16 (Suppl O):162-7.

Hakim M, Wreghitt TG, English TA, Stovin PG, Cory-Pearce R, Wallwork J. Significance of donor transmitted disease in cardiac transplantation. *J Heart Transplant* 1985; 4:302-6.

Hayakawa F, Imada K, Towatari M, Saito H. Life-threatening human parvovirus B19 infection transmitted by intravenous immune globulin. *Br J Haematol* 2002; 118:1187-9.

Hebert MM, Yu C, Towbin JA, Rogers BB. Fatal Epstein-Barr virus myocarditis in a child with repetitive myocarditis. *Pediatr Pathol Lab Med* 1995; 15:805-12.

Heegaard ED, Eiskjaer H, Baandrup U, Hornsleth A. Parvovirus B19 infection associated with myocarditis following adult cardiac transplantation. *Scand J Infect Dis* 1998; 30:607-10.

Hendrix MG, Salimans MM, van Broven CP, Bruggeman CA. High prevalence of latently present cytomegalovirus in arterial walls of patients suffering from grade III atherosclerosis. *Am J Pathol* 1990; 136:23-8.

Henke A, Launhardt H, Klement K, Stelzner A, Zell R, Munder T. Apoptosis in Coxsackievirus B3-caused diseases: Interaction between the capsid protein VP2 and the proapoptotic protein Siva. *J Virol* 2000; 74:4284-90.

Henke A, Nestler M, Strunze S, et al. The apoptotic capability of Coxsackievirus B3 influenced by the efficient interaction between the capsid protein VP2 and the proapoptotic host protein Siva. *Virology* 2001; 289:15-22.

Hershkowitz A, Wu TC, Willoughby SB, Vlahov D, Ansari AA, Beschorner WE, Baughman KL. Myocarditis and cardiotropic viral infection associated with severe left ventricular dysfunction in late-stage infection with human immunodeficiency virus. *J Am Coll Cardiol* 1994; 24:1025-32.

Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology* 1992; 10:413-7.

Hilton DA, Variend S, Pringle JH. Demonstration of Coxsackie virus RNA in formalin-fixed tissue sections from childhood myocarditis cases by in situ hybridization and the polymerase chain reaction. *J Pathol* 1993; 170:45-51.

Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' to 3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *PNAS* 1991; 88:7276-80.

Huber SA. Autoimmunity in myocarditis: Relevance of animal models. *Clin Immunol Immunopathol* 1997; 83:93-102.

Huber SA, Gauntt CJ, Sakkinen P. Enteroviruses and myocarditis: Viral pathogenesis through replication, cytokine induction and immunopathogenicity. *Adv Virus Res* 1999; 51:35-80.

Hufnagel G, Pankuweit S, Richter A, Schönian U, Maisch B. The European study of epidemiology and treatment of cardiac inflammatory diseases (ESETCID). *Herz* 2000; 25:279-85.

Ito M, Kodama M, Masuko F, et al. Expression of coxsackievirus and adenovirus receptor in hearts of rats with experimental autoimmune myocarditis. *Circ Res* 2000; 86:275-80.

Johansson ES, Niklasson B, Maizel J, Gorbalenya AE, Lindberg AM. Molecular analysis of three Ljungan virus isolates reveals a new, close-to-root lineage of the *Picornaviridae* with a cluster of two unrelated 2A proteins. *J Virol* 2002; 76:8920-30.

Johansson ES, Niklasson B, Tesh RB, Shafren DR, Travassos da Rosa APA, Lindberg AM. Molecular characterization of M1146, an American isolate of Ljungan virus (LV) reveals the presence of a new LV genotype. *J Gen Virol* 2003; 84:837-44.

Johansson ES, Ekström JO, Shafren DR, Frisk G, Hyypiä T, Edman K, Lindberg AM. Cell culture propagation and biochemical analysis of the Ljungan virus prototype strain. *Biochem Biophys Res Comm* 2004; 317:1023-9.

Kannel WB, Dawber TR, Kagan A, Revotskie N, Stokes J 3rd. Factors of risk in the development of coronary heart disease – six years follow-up experience. The Framingham Study. *Ann Intern Med* 1961; 55:33-50.

Karjalainen J, Nieminen MS, Heikkila J. Influenza A 1 myocarditis in conscripts. *Acta Med Scand* 1980; 20:27-30.

Keeling PJ, Jeffrey S, Caforio AL, Taylor R, Bottazzo GF, Davies MJ, McKenna WJ. Similar prevalence of enteroviral genome within the myocardium from patients with idiopathic dilated cardiomyopathy and controls by the polymerase chain reaction. *Br Heart J* 1992; 68:554-9.

Khan G, Kangro HO, Coates PJ, Heath RB. Inhibitory effects of urine on the polymerase chain reaction for cytomegalovirus DNA. *J Clin Pathol* 1991; 44:360-5.

Klein RM, Jiang H, Niederacher D, et al. Frequency and quantity of the parvovirus B19 genome in endomyocardial biopsies from patients with suspected myocarditis or idiopathic left ventricular dysfunction. *Z Kardiol* 2004; 93:300-9.

Klingel K. Molecular biologic detection of virus infection in myocarditis and dilated cardiomyopathy. In: Cooper Jr, Leslie T (Hrsg.). *Myocarditis: From bench to bedside*. Totowa, NJ: Humana Press, 2002:295-324.

Klingel K, Hohenadl C, Canu A, et al. Ongoing enterovirus-induced myocarditis is associated with persistent heart muscle infection: Quantitative analysis of virus replication, tissue damage, and inflammation. *PNAS* 1992; 89:314-8.

Klingel K, Rieger P, Mall G, Selinka HC, Huber M, Kandolf R. Visualization of enteroviral replication in myocardial tissue by ultrastructural in situ hybridization: identification of target cells and cytopathic effects. *Lab Invest* 1998; 78:1227-37.

Kloover JS, Soots AP, Krogerus LA, et al. Rat cytomegalovirus infection in kidney allograft recipients is associated with increased expression of intracellular adhesion molecule-1 vascular adhesion molecule-1, and their ligands leukocyte function antigen-1 and very late antigen-4 in the graft. *Transplantation* 2000; 69:2641-7.

Kochl S, Niederstatter H, Parson W. DNA extraction and quantitation of forensic samples using the phenol-chloroform method and real-time PCR. *Methods Mol Biol* 2004; 297:13-30.

Kok T, Wati S, Bayly B, Devonshire-Gill D, Higgins G. Comparison of six nucleic acid extraction methods for detection of viral DNA or RNA sequences in four different non-serum specimen types. *J Clin Virol* 2000; 16:59-63.

Koskinen PK, Kallio EA, Tikkanen JM, Sihvola RK, Häyry PJ, Lemström KB. Cytomegalovirus infection and cardiac allograft vasculopathy. *Transpl Infect Dis* 1999; 1:115-26.

Kühl U, Strauer BE, Schultheiss HP. Methylprednisolone in chronic myocarditis. Postgrad Med J 1994; 70:734-5.

Kühl U, Pauschinger M, Noutsias M, Kapp JF, Schultheiss HP. Diagnosis and treatment of patients with virus induced inflammatory cardiomyopathy. Eur Heart J Supplements 2002; 4 (Suppl1):173-80.

Kühl U, Pauschinger M, Bock T, et al. Parvovirus B19 infection mimicking acute myocardial infarction. Circulation 2003; 108:945-50.

Kutyavin IG, Afonina IA, Mills A, et al. 3'-Minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. Nucl Acids Res 2000; 28:655-61.

Kwok S, Higuchi R. Avoiding false positives with PCR. Nature 1989; 399:237-8.

Lamb DJ, Ferns GA. Infection, immunisation and atherosclerosis: Is there a link? Vaccine 1999; 17:559-64.

Lane JR, Neumann DA, Lafond-Walker A, Rose NR. Interleukin 1 or tumor necrosis factor can promote Coxsackie B3-induced myocarditis in resistant B10 A mice. J Exp Med 1992; 175:1123-9.

Larsson S, Söderberg-Naucler C, Wang FZ, Moller E. Cytomegalovirus DNA can be detected in peripheral blood mononuclear cells from all seropositive and most seronegative healthy blood donors over time. Transfusion 1998; 38:271-8.

Latif N, Baker CS, Dunn MJ, et al. Frequency and specificity of antiheart antibodies in patients with dilated cardiomyopathy detected using SDS-PAGE and Western blotting. J Am Coll Cardiol 1993; 22:1378-84.

Lee C, Maull E, Chapman NM, Tracy S, Gauntt C. Genomic regions of Coxsackievirus B3 associated with cardiovirulence. J Med Virol 1997; 52:341-7.

Lee LG, Connell CR, Bloch W. Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. Nucl Acids Res 1993; 21:3761-6.

Leinonen M, Saikku P. Infections and atherosclerosis. Scand Cardiovasc J 2000; 34:12-20.

Leitch AR, Schwarzacher T, Jackson D, Leitch IJ. *In situ*-Hybridisierung. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 1994.

- Lenzo JC**, Fairweather D, Cull V, Shellam GR, James Lawson CM. Characterisation of murine cytomegalovirus myocarditis: cellular infiltration of the heart and virus persistence. *J Mol Cell Cardiol* 2002; 34:629-40.
- Li Y**, Peng T, Yang Y, Niu C, Archard LC, Zhang H. High prevalence of enteroviral genomic sequences in myocardium from cases of endemic cardiomyopathy (Keshan disease) in China. *Heart* 2000; 83:696-701.
- Li Y**, Pan Z, Ji Y, Peng T, Archard LC, Zhang H. Enterovirus replication in valvular tissue from patients with chronic rheumatic heart disease. *Eur Heart J* 2002; 23:567-73.
- Lindberg AM**, Johansson S. Phylogenetic analysis of Ljungan virus and A-2 plaque virus, new members of the *Picornaviridae*. *Virus Res* 2002; 85:61-70.
- Liu P**, Aitken K, Kong YY, et al. The tyrosine kinase p56lck is essential in coxsackievirus B3-mediated heart disease. *Nat Med* 2000; 6:429-34.
- Liuzzo G**, Biasucci LM, Gallimore JR, et al. The prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid a protein in severe unstable angina. *N Engl J Med* 1994; 331:417-24.
- Livak KJ**, Flood JA, Marmaro J, Giusti W, Deetz K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl* 1995; 4:357-62.
- Ljungman P**, Ribaud P, Eyrich M, et al. Cidofovir for adenovirus infections after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: A survey by the Infectious Diseases Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2003; 31:481-6.
- López-Navidad A**, Caballero F. Extended criteria for organ acceptance. Strategies for achieving organ safety and for increasing organ pool. *Clin Transplant* 2003; 17:308-24.
- Lottspeich F**, Zorbas H. *Bioanalytik*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 1998.
- Lower FE**, Menon S, Sanchez JA. Association of parvovirus B19 with plasma cell-rich myocardial infiltrates after heart transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2001; 20:755-8.
- Lozinski G**, Davis G, Krous H, Billman G, Shimizu H, Burns J. Adenovirus myocarditis: Retrospective diagnosis by gene amplification from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Hum Pathol* 1994; 25:831-4.

Luo H, Yanagawa B, Zhang J, et al. Coxsackievirus B3 replication is reduced by inhibition of the extracellular signal-regulated kinase (ERK) signalling pathway. *J Virol* 2002; 76:3365-73.

Madjid M, Aboshady I, Awan I, Litovsky S, Casscells SW. Influenza and cardiovascular disease. Is there a causal relationship? *Tex Heart Inst J* 2004; 31:4-13.

Maier R, Krebs P, Ludewig B. Immunopathological basis of virus-induced myocarditis. *Clin Dev Immunol* 2004; 11:1-5.

Maisch B, Bauer E, Cirsic M, Kochsiek K. Cytolytic cross-reactive antibodies directed against the cardiac membrane and viral proteins in coxsackievirus B3 and B4 myocarditis. Characterization and pathogenetic relevance. *Circulation* 1993; 87 (Suppl 5):IV 49-65.

Maisch B, Camerini F, Schultheiss HP. Immunosuppressive therapy for myocarditis [letter; comment]. *N Engl J Med* 1995; 333: 1713-4.

Maisch B, Portig I, Ristic A, Hufnagel G, Pankuweit S. Definition of inflammatory cardiomyopathy (myocarditis): On the way to consensus. *Herz* 2000; 25:200-9.

Maisch B, Ristic AD, Portig I, Pankuweit S. Human viral cardiomyopathy. *Front Biosci* 2003; 1:39-67.

Martelius T, Salmi M, Wu H, et al. Induction of vascular adhesion protein-1 during liver allograft rejection and concomitant cytomegalovirus infection in rats. *Am J Pathol* 2000; 157: 1229-37.

Martin AB, Webber S, Fricker FJ, et al. Acute myocarditis. Rapid diagnosis by PCR in children. *Circulation* 1994; 90:330-9.

Martino T, Liu P, Petric M, Sole MJ. Enteroviral myocarditis and dilated cardiomyopathy: A review of clinical and experimental studies. In: Rotbart H (Hrsg.) *Human enterovirus infections*. Washington, DC: ASM, 1995:291-352.

Martino T, Petric AM, Brown M, et al. Cardiovirulent coxsackieviruses and the decay-accelerating factor (CD55) receptor. *Virology* 1998; 244:302-14.

Mason JW. Myocarditis and dilated cardiomyopathy: An inflammatory link. *Cardiovasc Res* 2003; 60:5-10.

Mason JW, O'Donnell JB, Hershkowitz A, et al. A clinical trial of immunosuppressive therapy for myocarditis. The Myocarditis Treatment Trial Investigators. *N Engl J Med* 1995; 333:269-75.

- Matsumori A**, Yamada T, Suzuki H, Matoba Y, Sasayama S. Increased circulating cytokines in patients with myocarditis and cardiomyopathy. *Br Heart J* 1994; 72:561-6.
- Matsumori A**, Yutani C, Ikeda Y, Kawai S, Sasayama S. Hepatitis C virus from hearts of patients with myocarditis and cardiomyopathy. *Lab Invest* 2000; 80:1137-42.
- McCarthy 3rd RE**, Boehmer JP, Hruban RH, et al. Long-term outcome of fulminant myocarditis as compared with acute (non fulminant) myocarditis. *N Engl J Med* 2000; 342:690-5.
- McMurray JJ**, Stewart S. Epidemiology, aetiology and prognosis of heart failure. *Heart* 2000; 83:596-602.
- McNamara DM**, Di Salvo T, Mathier M, Keck S, Semigran M, Dec GW. Left ventricular dysfunction after heart transplantation: incidence and role of enhanced immunosuppression. *Heart Lung Transplant* 1996;15:506-15.
- McNamara DM**, Rosenblum WD, Janosko KM, et al. Intravenous immune globulin in the therapy of myocarditis and acute cardiomyopathy. *Circulation* 1997; 95:2476-8.
- McNamara DM**, Holubkov R, Starling RC, et al. Controlled trial of intravenous immune globulin in recent-onset dilated cardiomyopathy. *Circulation* 2001; 103:2254-9.
- McNearney T**, Ballard L, Seya T, Atkinson JP. Membrane cofactor protein of complement is present on human fibroblast, epithelial, and endothelial cells. *J Clin Invest* 1989; 84:538-45.
- Meier CR**. The possible role of infections in acute myocardial infarction. *Biomed Pharmacother* 1999; 53:397-404.
- Miura K**, Nakagawa H, Morikawa Y, et al. Epidemiology of idiopathic cardiomyopathy in Japan: Results from a nationwide survey. *Heart* 2002; 87:126-30.
- Modrow S**, Falke D, Truyen U. *Molekulare Virologie*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 2003.
- Morgan-Capner P**, Richardson PJ, McSorley C, Daley K, Pattison JR. Virus investigation in heart muscle disease. In: Bolte HD (Hrsg.). *Viral heart disease*. Berlin: Springer, 1984: 291-352.
- Morré SA**, Stoker W, Lagrand WK, van den Brule AJC, Niessen HWM. Microorganisms in the aetiology of atherosclerosis. *J Clin Pathol* 2000; 53:647-54.

Muhlestein JB, Horne BD, Carlquist JF, et al. Cytomegalovirus seropositivity and C-reactive protein have independent and combined predictive value for mortality in patients with angiographically demonstrated coronary artery disease. *Circulation* 2000; 102:1917-23.

Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987; 155:335-50.

Naides SJ. Infection with parvovirus B19. *Curr Infect Dis Rep* 1999; 1:273-8.

Newton CR, Graham A. PCR. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 1997.

Ni J, Bowles NE, Kim YH et al. Viral infection of the myocardium in endocardial fibroelastosis. Molecular evidence for the role of mumps virus as an etiologic agent. *Circulation* 1997; 95:133-9.

Nichols WG, Guthrie KA, Corey L, Boeckh M. Influenza infections after hematopoietic stem cell transplantation: risk factors, mortality, and the effect of antiviral therapy. *Clin Infect Dis* 2004;39:1300-6.

Nicholson F, Ajetunmobi JF, Li M, et al. Molecular detection and serotypic analysis of enterovirus RNA in archival specimens from patients with acute myocarditis. *Br Heart J* 1995; 74:522-7.

Nieto FJ. Viruses and atherosclerosis: A critical review of the epidemiologic evidence. *Am Heart J* 1999; 138:S453-60.

Nigro G, Bastiano V, Colloridi V, et al. Human parvovirus B19 infection in infancy associated with acute and chronic lymphocytic myocarditis and high cytokine levels: Report of 3 cases and review. *Clin Infect Dis* 2000; 31:65-9.

Niklasson B, Hörnfeldt B, Lundman B. Could myocarditis, insulin-dependent diabetes mellitus and Guillain-Barré syndrome be caused by one or more infectious agents carried by rodents? *Emerg Infect Dis* 1998; 4:187-93.

Niklasson B, Kinnunen L, Hörnfeldt B, et al. A new picornavirus isolated from Bank voles (*Clethrionomys glareolus*). *Virology* 1999; 255:86-93.

Niklasson B, Hörnfeldt B, Nyholm E, Niedrig M, Donoso Mantke O, Gelderblom HR, Lernmark A. Type 1 diabetes in Swedish bank voles (*Clethrionomys glareolus*): Signs of disease in both colonized and wild cyclic populations at peak density. *Ann NY Acad Sci* 2003; 1005:170-5.

Noutsias M, Fechner H, de Jonge H, et al. Human coxsackievirus-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.

Olive DM, Simsek M, Al-Mufti S. Polymerase chain reaction assay for detection of human cytomegalovirus. *J Clin Microbiol* 1989; 27:1238-42.

Opavsky MA, Martino T, Rabinovitch M, et al. Enhanced ERK-1/2 activation in mice susceptible to coxsackievirus-induced myocarditis. *J Clin Invest* 2002; 109:1561-9.

Orth T, Herr W, Spahn T, et al. Human parvovirus B19 infection associated with severe acute perimyocarditis in a 34-year-old man. *Eur Heart J* 1997; 18:524-5.

Osterziel KJ, Scheffold T, Perrot A, Dietz R. Genetik der dilatativen Kardiomyopathie. *Z Kardiol* 2001; 90:461-9.

Osler W. Lectures on angina pectoris and allied states (1897). In: Fye BF (Hrsg.) William Osler's collected papers on the cardiovascular system. New York: Adams, LB, 1985:239-57.

Pankuweit S, Moll R, Baandrup U, Portig I, Hufnagel G, Maisch B. Prevalence of the parvovirus B19 genome in endomyocardial biopsy specimens. *Hum Pathol* 2003; 34:497-500.

Papadogiannakis N, Tolvenstam T, Fischer B, Norbeck O, Broliden K. Active, fulminant, lethal myocarditis associated with parvovirus B19 infection in an infant. *Clin Infect Dis* 2002; 35:1027-31.

Parrillo JE, Cunnion RE, Epstein SE. A prospective, randomized, controlled trial of prednisolon for dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med* 1989; 321:1061-8.

Pasch A, Kuepper JH, Wolde A, Kandolf R, Selinka HC. Comparative analysis of virus-host cell interaction of haemagglutinating and non-haemagglutinating strains of coxsackievirus B3. *J Gen Virol* 1999; 80:3153-8.

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* 1999a; 99:1348-54.

Pauschinger M, Dörner A, Kühl U, Schwimmbeck PL, Poller W, Kandolf R, Schultheiss HP. Enteroviral RNA replication in the myocardium of patients with left ventricular dysfunction and clinically suspected myocarditis. *Circulation* 1999b; 99:889-95.

Pellicano R, Oliaro E, Gandolfo N, et al. Ischemic cardiovascular disease and Helicobacter pylori. Where is the link? *Cardiovasc Surg* 2000; 41:829-33.

Pereyra F, Rubin RH. Prevention and treatment of cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients. *Curr Opin Infect Dis* 2004;17:357-61.

Petitjean J, Kopecka H, Freymuth F, et al. Detection of enteroviruses in endomyocardial biopsy by molecular approach. *J Med Virol* 1992; 37:76-82.

Poddar SK. Detection of adenovirus using PCR and molecular beacon. *J Virol Methods* 1999; 82:19-26.

Prösch S, Kimel V, Dawydowa I, Krüger DH. Monitoring of patients for cytomegalovirus after organ transplantation by centrifugation culture and PCR. *J Med Virol* 1992; 38:246-51.

Prösch S, Lienicke U, Priemer C, Flunker G, Seidel WF, Krüger DH, Wauer RR. Human adenovirus and human cytomegalovirus infections in preterm newborns: No association with bronchopulmonary dysplasia. *Pediat Res* 2002; 52:219-24.

Pryzdial EL, Wright JF. Prothrombiasis assembly on an enveloped virus: Evidence that the cytomegalovirus surface contains procoagulant phospholipid. *Blood* 1994; 84:3749-57.

Pusch D, Oh DY, Wolf S, et al. Detection of enteric viruses and bacterial indicators in German environmental waters. *Arch Virol* 2005 Jan 13; [Epub ahead of print] (www.springerlink.com)

Radonić A, Thulke S, Mackay IA, Landt O, Siegert W, Nitsche A. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 313:856-62.

Rahbar AS, Sundqvist VAS, Zweyberg-Wigart B, Grillner L, Söderberg-Naucler C. Recognition of cytomegalovirus clinical isolate antigens by sera from cytomegalovirus-negative blood donors. *Transfusion* 2004; 44:1059-66.

Ray CG, Icenogle TB, Minnich LL, Copeland JG, Grogan TM. The use of intravenous ribavirin to treat influenza virus-associated acute myocarditis. *J Infect Dis* 1989; 159:829-36.

Reetoo KN, Osman SA, Illavia SJ, Cameron-Wilson CL, Banatvala JE, Muir P. Quantitative analysis of viral RNA kinetics in Coxsackievirus-B3-induced murine myocarditis: biphasic pattern of clearance following acute infection, with persistence of residual viral RNA throughout and beyond the inflammatory phase of disease. *J Gen Virol* 2000; 81:2755-62.

Rey L, Lambert V, Wattré P, Andreoletti L. Detection of enteroviruses ribonucleic acid sequences in endomyocardial tissue from adult patients with chronic dilated cardiomyopathy by a rapid RT-PCR and hybridization assay. *J Med Virol* 2001; 64:133-40.

Rich W. *Klinische Chemie und Mikroskopie*. Berlin: Springer Verlag, 1977.

Richardson P, McKenna W, Bristow M, et al. Report of the 1995 World Health Organization/ International Society and Federation of Cardiology Task Force on the definition and classification of cardiomyopathies. *Circulation* 1996; 93:841-2.

Roelvink PW, Lizonova A, Lee JG, et al. The coxsackievirus-adenovirus receptor protein can function as a cellular attachment protein for adenovirus serotypes from subgroups A, C, D, E, and F. *J Virol* 1998; 72:7909-15.

Rose NR. Viral damage or 'molecular mimicry' – placing the blame in myocarditis. *Nat Med* 2000; 6: 631-2.

Ross R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J* 1999; 138:S419-20.

Rotbart HA, Webster AD, et al. Treatment of potentially life-threatening enterovirus infections with pleconaril. *Clin Infect Dis* 2001; 15:228-35.

Ruano G, Pagliaro EM, Schwartz TR, et al. Heat-soaked PCR: An efficient method for DNA amplification with application to forensic analysis. *Biotechniques* 1992; 13:266-74.

Rupprecht HJ, Blankenberg S, Bickel C, et al. Impact of viral and bacterial infectious burden on long-term prognosis in patients with coronary artery disease. *Circulation* 2001; 104:25-31.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

Sanger F, Nickeln S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *PNAS* 1977; 74:5463-7.

Savoia M, Oxman M. Myocarditis, pericarditis and mediastinitis. In: Mandell GL, Douglas RG, Bennett JE (Hrsg.). *Principles and practice of infectious diseases*. New York: Churchill Livingstone, 1990:721-31.

Schettler G, Greten H. *Innere Medizin: Verstehen – Lernen – Anwenden*. Stuttgart: Thieme Verlag, 1998.

- Schmaltz AA**, Demel KP, Kallenberg R, Neudorf U, Kandolf R, Klingel K, Bültmann B. Immunosuppressive therapy of chronic myocarditis in children: Three cases and the design of a randomized prospective trial of therapy. *Pediatr Cardiol* 1998; 19:235-9.
- Schmidtke M**, Selinka HC, Heim A, et al. Attachment of coxsackievirus B3 variants to various cell lines: mapping of phenotypic differences to capsid protein VP1. *Virology* 2000; 275:77-88.
- Schönian U**, Crombach M, Maser S, Maisch B. Cytomegalovirus-associated heart muscle disease. *Eur Heart J* 1995; 16 (Suppl O):46-9.
- Schowengerdt KO**, Ni J, Denfield SW, et al. Diagnosis, surveillance, and epidemiologic evaluation of viral infections in pediatric cardiac transplant recipients with the use of the polymerase chain reaction. *J Heart Lung Transplant* 1996; 15:111-23.
- Schowengerdt KO**, Ni J, Denfield SW, et al. Association of parvovirus B19 genome in children with myocarditis and cardiac allograft rejection: Diagnosis using the polymerase chain reaction. *Circulation* 1997; 96:3549-54.
- Schulze K**, Schultheiss HP. The role of the ADP/ATP carrier in the pathogenesis of viral heart disease. *Eur Heart J* 1995; 16 (Suppl O):64-7.
- Schwaiger A**, Umlauf F, Weyrer K, et al. Detection of enteroviral ribonucleic acid in myocardial biopsies from patients with idiopathic dilated cardiomyopathy by polymerase chain reaction. *Am Heart J* 1993; 126:406-10.
- Schweiger B**, Zadow I, Heckler R, Timm H, Pauli G. Application of a fluorogenic PCR assay for typing and subtyping of Influenza viruses in respiratory samples. *J Clin Microbiol* 2000; 38:1552-8.
- Schwimmbeck PL**, Badorff C, Schultheiss HP, Strauer BE. Transfer of human myocarditis in the severe combined immunodeficiency mice. *Circ Res* 1994; 75:156-64.
- Selinka HC**, Wolde A, Pasch A, et al. Comparative analysis of two coxsackievirus B3 strains: Putative influence of virus-receptor interactions on pathogenesis. *J Med Virol* 2002; 67:224-33.
- 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; 193:127-31.
- Shafren D**, Bates R, Agrez M, Herd RL, Burns G, Barry R. Coxsackievirus B1, B3 and B5 use decay accelerating factor as a receptor for cell attachment. *J Virol* 1995; 69:3873-7.

- Shafren D**, Williams DT, Barry R. A decay-accelerating factor-binding strain of coxsackievirus B3 requires the coxsackievirus-adenovirus receptor protein for mediate lytic infection in rhabdomyosarcoma cells. *J Virol* 1997; 71:9844-8.
- Shirali GS**, Ni J, Chinnock RE, et al. Association of viral genome with graft loss in children after cardiac transplantation. *N Engl J Med* 2001; 344:1498-503.
- Shoenfeld Y**, Sherer Y, George J, Harats D. Autoantibodies associated with atherosclerosis. *Ann Med* 2000; 32 (Suppl 1):37-40.
- Shoenfeld Y**, Sherer Y, Harats D. Atherosclerosis as an infectious, inflammatory and autoimmune disease. *Trends Immunol* 2001; 22:293-5.
- Smart FW**, Naftel DC, Costanzo MR, et al. Risk factors for early, cumulative, and fatal infections after heart transplantation: A multiinstitutional study. *J Heart Lung Transplant* 1996; 15:329-41.
- Smith D**, Gupta S, Kaski JC. Chronic infections and coronary heart disease. *Int J Clin Pract* 1999; 53:460-6.
- Smieja M**, Gnarpe J, Lonn E, et al. Multiple infections and subsequent cardiovascular events in the Heart Outcomes Prevention Evaluation (HOPE) Study. *Circulation* 2003; 107:251-7.
- Sommer K**. *Der Mensch: Anatomie – Physiologie – Ontologie*. Berlin: Volk und Wissen, 1986.
- Speir E**, Modali R, Huang ES, et al. Potential role of human cytomegalovirus and p53 interaction in coronary restenosis. *Science* 1994; 265:391-4.
- Speir E**, Yu ZX, Ferrans VJ, Huang ES, Epstein SE. Aspirin attenuates cytomegalovirus infectivity and gene expression mediated by cyclooxygenase-2 in coronary artery smooth muscle cells. *Circ Res* 1998; 83:210-6.
- Staudt A**, Schaper F, Stangl V, et al. Immunohistological changes in dilated cardiomyopathy induced by immunoabsorption therapy and subsequent immunoglobulin substitution. *Circulation* 2001; 103:2681-6.
- Stouffer GA**, Sheahan RG, Lenihan DJ, Patel P. The current status of immune modulating therapy for myocarditis: A case of acute parvovirus myocarditis treated with intravenous immunoglobulin. *Am J Med Sci* 2003; 326:369-74.

Strauer BE, Kandolf R, Mall G, et al. Update 2001: Myocarditis-cardiomyopathy. *Med Klin (Munich)* 2001; 96:608-25.

Streblow DN, Orloff SL, Nelson JA. The HCMV chemokine receptor US28 is a potential target in vascular disease. *Curr Drug Targets Infect Disord* 2001; 1:151-8.

Tam PE, Messner RP. Molecular mechanisms of coxsackievirus persistence in chronic inflammatory myopathy: Viral RNA persists through formation of a double-stranded complex without associated genomic mutations or evolution. *J Virol* 1999; 73:10113-121.

Tanaka K, Zou JP, Takeda K, et al. Effects of human cytomegalovirus immediate-early proteins on p53-mediated apoptosis in coronary artery smooth muscle cells. *Circulation* 1999; 99:1656-9.

Tennstedt C, Wunschmann S, Schmitz H, Schreiber M. Pathological-anatomical findings after serologic and molecular biologic evidence of Hantaan virus infection. *Zentralbl Pathol* 1994; 140:173-80.

Thanopoulos BD, Rokas S, Frimas CA, Mantagos SP, Beratis NG. Cardiac involvement in postnatal rubella. *Acta Paediatr Scand* 1989; 78:141-4.

Tilmann HL. Donor-associated infections in allotransplantation. *Tx Med* 2002; 14:159-65.

Tomko R, 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 USA* 1997; 94: 3352-6.

Tracy S, Chapman NM, Romero J, Ramsingh AI. Genetics of Coxsackievirus B cardiovirulence and inflammatory heart muscle disease. *Trends in Microbiology* 1996; 4:175-9.

Ueno H, Yokota Y, Shiotani H, et al. Significance of detection of enterovirus RNA in myocardial tissues by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Int J Cardiol* 1995; 51:157-64.

Ulrich R, Meisel H, Schütt M, et al. Verbreitung von Hantavirusinfektionen in Deutschland. *Bundesgesundheitsblatt* 2004; 47:661-70.

Valantine HA. The role of viruses in cardiac allograft vasculopathy. *Am J Transpl* 2003; 4:169-77.

van Dam-Mieras MC, Muller AD, van Hinsbergh VW, Mullers WJ, Bomans PH, Bruggeman CA. The procoagulant response of cytomegalovirus infected endothelial cells. *Thromb Haemost* 1992; 68:364-70.

van Dorp WT, Jonges E, Bruggeman CA, Daha MR, van Es LA, van Der Woude FJ. Direct induction of MHC class I, but not class II, expression on endothelial cells by cytomegalovirus infection. *Transplantation* 1989; 48:469-72.

von Kaisenberg CS, Bender G, Scheewe J, et al. A case of fetal parvovirus B19 myocarditis, terminal cardiac heart failure, and perinatal heart transplantation. *Fetal Diagn Ther* 2001; 16:427-32.

Wang X, Zhang G, Liu F, Han M, Xu D, Zang Y. Prevalence of human parvovirus B19 DNA in cardiac tissue of patients with congenital heart diseases indicated by nested PCR and in situ hybridization. *J Clin Virol* 2004; 31:20-4.

Weill D. Role of cytomegalovirus in cardiac allograft vasculopathy. *Transpl Infect Dis* 2001;3 (Suppl 2):44-8.

Weiss LM, Liu XF, Chang KL, Billingham ME. Detection of enteroviral RNA in idiopathic dilated cardiomyopathy and other human cardiac tissues. *J Clin Invest* 1992; 90:156-9.

Wesslén L, Pahlson C, Friman G, Fohlman J, Lindquist O, Johansson C. Myocarditis caused by *Chlamydia pneumoniae* (TWAR) and sudden unexpected death in Swedish elite orienteer. *Lancet* 1992; 340:427-8.

Wessely R. Coxsackieviral replication and pathogenicity: lessons from gene modified animal models. *Med Microbiol Immunol* 2004; 193:71-4.

Wessely R, Klingel K, Santana LF, et al. Transgenic expression of replication-restricted enteroviral genomes in heart muscle induces defective excitation-contraction coupling and dilated cardiomyopathy. *J Clin Invest* 1998;102:1444-53.

Wick G, Schett G, Amberger A, Kleindienst R, Xu Q. Is atherosclerosis an immunologically mediated disease? *Immunol Today* 1995; 16:27-33.

Wiedbrauk DL, Werner JC, Drevon AM. Inhibition of PCR by aqueous and vitreous fluids. *J Clin Microbiol* 1995; 33:2643-6.

Wierzbicki WB, Hagemeyer KO. *Helicobacter pylori*, *Chlamydia pneumoniae* and cytomegalovirus chronic infections and coronary heart disease. *Pharmacotherapy* 2000; 20:52-63.

Wilfonger WW, Mackey K, Chomczynski P. Effects of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *BioTechniques* 1997; 22:474-81.

Wojnicz R, Nowalany-Kozielska E, Wojciechowska C, et al. Randomized, placebo-controlled study for immunosuppressive treatment of inflammatory dilated cardiomyopathy: two-year follow-up results. *Circulation* 2001; 104:39-45.

Yamada T, Matsumori A, Sasayama S. Therapeutic effect of anti-tumor necrosis factor-alpha antibody on the murine model of viral myocarditis induced by encephalomyocarditis virus. *Circulation* 1994; 89:846-51.

Ylipaasto P, Klingel K, Lindberg AM, et al. Enterovirus infection in human pancreatic islet cells, islet tropism in vivo and receptor involvement in cultured islet beta cells. *Diabetologia* 2004; 47:225-39.

Zhou YF, Yu ZX, Wanishawad C, Shou M, Epstein SE. The immediate early gene products of human cytomegalovirus increase vascular smooth muscle cell migration, proliferation, and expression of PDGF beta-receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 256:608-13.

Zhu H, Shen Y, Shenk T. Human cytomegalovirus IE1 and IE2 proteins block apoptosis. *J Virol* 1995; 69:7960-70.

Zhu J, Quyyumi AA, Norman JE, Csako G, Epstein SE. Cytomegalovirus in the pathogenesis of atherosclerosis: the role of inflammation as reflected by elevated C-reactive protein levels. *J Am Coll Cardiol* 1999; 34:1738-43.

Zhu J, Quyyumi AA, Norman JE, Csako G, Waclawiw MA, Shearer GM, Epstein SE. Effects of total pathogen burden on coronary artery disease risk and C-reactive protein levels. *Am J Cardiol* 2000; 85:140-6.

Zhu J, Nieto FJ, Horne BD, Anderson JL, Muhlestein JB, Epstein SE. Prospective study of pathogen burden and risk of myocardial infarction or death. *Circulation* 2001; 103:45-51.

Liste der aus dieser Dissertation hervorgegangenen Vorveröffentlichungen und weitere eigene Publikationen

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Freien Universität Berlin, vertreten durch Herrn Prof. Rudolf K. Achazi, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Vorveröffentlichungen (Publikationen)

1. Donoso Mantke O, Niedrig M, Meyer R. Nachweis von DNA-haltigen Viren. Jahresbericht 2001 des Homograflabors des DHZB. Berlin: DHZB, 2002; S. 20-2.
(www.dhzb.de/hgl/)
2. Donoso Mantke O, Meyer R, Prösch S, Pregla R, Niedrig M. Nachweis viraler Genomstrukturen im Myokardgewebe von Herzklappenspendern. Z Herz-, Thorax-, Gefäßchir 2003; 17:9-16. (www.springerlink.com)
3. Niklasson B, Hörnfeldt B, Nyholm E, Niedrig M, Donoso Mantke O, Gelderblom HR, Lenmark A. Type 1 diabetes in Swedish bank voles (*Clethrionomys glareolus*): Signs of disease in both colonized and wild cyclic populations at peak density. Ann NY Acad Sci 2003;1005:170-5.
4. Donoso Mantke O, Meyer R, Prösch S, Niedrig M. Frequent detection of viral nucleic acids in heart valve tissue. J Clin Microbiol 2004; 42:2298-300.
5. Donoso Mantke O, Nitsche A, Meyer R, Klingel K, Niedrig M. Analysing myocardial tissue from explanted hearts of heart transplant recipients and multi-organ donors for presence of parvovirus B19 DNA. J Clin Virol 2004; 31:32-9.
6. Donoso Mantke O, Meyer R, Prösch S, Nitsche A, Leitmeyer K, Kallies R, Niedrig M. High prevalence of cardiotropic viruses in myocardial tissue from explanted hearts of heart transplant recipients and heart donors: A three year retrospective study from a German patients' pool. J Heart Lung Transplant 2005. *in press*

7. Donoso Mantke O, Niklasson B, Kallies R, Nitsche A, Meyer R, Niedrig M. First quantitative real-time reverse transcriptase PCR assay for detection of Ljungan virus (LV). *submitted* (2005)

Vorveröffentlichungen (Tagungsbeiträge)

1. Donoso Mantke O, Meyer R, Pregla R, Hetzer R, Prösch S, Schreier E, Niedrig M. Prevalence of cardiotropic viruses in cardiac transplant recipients and donor hearts – What does it mean for heart valve banking? [Vortrag] 1st BIS-Symposium on the Future of Heart Valve Banking, Berlin, 2001.
2. Donoso Mantke O, Meyer R, Pregla R, Prösch S, Hetzer R, Niedrig M. Prevalence of cardiotropic viruses in cardiac transplant recipients and donor hearts – Relevance for heart valve banking? [Poster] Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Erlangen, 2002: Abstracts S. 94.
3. Donoso Mantke O, Meyer R, Pregla R, Prösch S, Hetzer R, Niedrig M. Prevalence of cardiotropic viruses in cardiac transplant recipients and donor hearts – Relevance for heart valve banking? [Poster] XIIth International Congress of Virology, Paris, 2002: Abstracts 90-V-579, S. 199.
4. Niedrig M, Donoso Mantke O, Prösch S, Hetzer R, Meyer R. Detection of viral genome sequences in myocardial tissue – A risk to the health of homograft recipients? [Vortrag] 1st Hamburg PCR Symposium, Hamburg, 2002.
5. Donoso Mantke O, Meyer R, Prösch S, Hetzer R, Niedrig M. Detection of viral genome sequences in myocardial tissue of heart valve donors – A risk to the health of homograft recipients? [Poster] Winter Meeting/Joint Meeting of the Sociedade Portuguesa de Virologia and the European Society for Clinical Virology, Estoril, 2003: Abstracts #25.
6. Donoso Mantke O, Meyer R, Prösch S, Hetzer R, Niedrig M. Detection of viral genome sequences in myocardial tissue of heart valve donors – A risk to the health of homograft recipients? [Vortrag] Infection 2003; 31 (Suppl 1):69. Tagungsband der Deutschen Gesellschaft für Infektionskrankheiten und der Paul Ehrlich Gesellschaft für Chemotherapie.

7. Donoso Mantke O, Meyer R, Prösch S, Hetzer R, Niedrig M. Detection of viral genome sequences in myocardial tissue of heart valve donors – A risk to the health of homograft recipients? [Poster] Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Berlin, 2003: Abstracts CLI 07, S. 169.
8. Donoso Mantke O, Nitsche A, Meyer R, Niedrig M. A new quantitative real-time PCR assay for the detection of parvovirus B19 DNA in myocardial tissue of heart transplant recipients and multi-organ donors. [Poster] Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Berlin, 2003: Abstracts CLI 08, S. 170.
9. Niedrig M, Donoso Mantke O, Prösch S, Hetzer R, Meyer R. Detection of viral genome sequences in myocardial tissue of heart valve donors – Relevance for heart valve banking? [Vortrag] DHZB-Symposium, Mai 2003.
10. Gerlich WH. Screening of tissue donors for virus infections: which, how and when? [Round table Beitrag] 2nd Symposium on the Future of Heart Valve Banking, Barcelona, 2003.
11. Donoso Mantke O, Meyer R, Prösch S, Hetzer R, Niedrig M. Detection of viral genome sequences in myocardial tissue of heart valve donors – A risk to the health of homograft recipients? [Poster] Pathol Res Pract 2003; 199:186. Tagungsband der Deutschen Gesellschaft für Pathologie und der Deutschen Gesellschaft für Zytologie.
12. Donoso Mantke O, Meyer R, Prösch S, Niedrig M. Screening for cardiotropic viruses in myocardial tissue from explanted hearts of heart transplant recipients and multi-organ donors – Results from a three-year retrospective study. [Poster] 2nd European Congress of Virology/Eurovirology, Madrid, 2004: Abstracts P7-3, S. 171.

Weitere Publikationen im Rahmen des EU-Projektes „ENIVD-Netzwerk“ am RKI

1. Biel SS, Donoso Mantke O, Lemmer K, Vaheiri A, Lundkvist A, Emmerich P, Hukic M, Niedrig M. Quality control measures for the serological diagnosis of hantavirus infections. J Clin Virol 2003; 28:248-56.

2. Donoso Mantke O, Lemmer K, Biel SS, Groen J, Schmitz H, Durand JP, Zeller H, Niedrig M. Quality control assessment for the serological diagnosis of dengue virus infections. *J Clin Virol* 2004; 29:105-12.
3. Lemmer K, Donoso Mantke O, Bae HG, Groen J, Drosten C, Niedrig M. External quality control assessment in PCR diagnostics of dengue virus infections. *J Clin Virol* 2004; 30:291-6.
4. Hattermann K, Müller MA, Nitsche A, Wendt S, Donoso Mantke O, Niedrig M. Susceptibility of different eukaryotic cell lines to SARS-Coronavirus. *Arch Virol* 2005 Jan 13 [Epub ahead of print]. (www.springerlink.com)
5. Donoso Mantke O, Schmitz H, Zeller H, Heyman P, Papa A, Niedrig M. External quality assurance programmes for the diagnostics of imported viral diseases and potential viral agents of bioterrorism to enhance the emergency preparedness in Europe. *submitted* (2005)

Danksagung

Nach so vielen Seiten geschriebenen Textes folgt mit der Danksagung, auch für den Verfasser dieser Arbeit, ein angenehmer und entspannender Teil, den er umso lieber angefertigt hat. An dieser Stelle danke ich...

...Dr. Matthias Niedrig, dass er mich unmittelbar nach dem Diplom zunächst als Hospitant und schließlich als Doktorand in seine Arbeitsgruppe aufgenommen und mir dieses interessante Thema zur Promotion anvertraut hat. Insbesondere danke ich ihm für seine sehr gute wissenschaftliche Betreuung und großzügige Unterstützung, ohne die die Arbeit nur schwerlich zustande gekommen wäre. Ich freue mich nun darauf in den nächsten drei Jahren als Post-Doc in seiner Arbeitsgruppe arbeiten zu dürfen.

...den vielen Partnern und Koautoren für ihre wertvollen Beiträgen zum Gelingen dieser Arbeit. Als da wären:

...Prof. Dr. Rudolf Meyer vom Deutschen Herzzentrum Berlin für die Bereitstellung der Patientenproben und –daten sowie für die stets ausführliche Beratung zu medizinischen Fragestellungen.

...Dr. Susanna Prösch von der Charité Berlin für die Unterstützung hinsichtlich der Diagnostik von Adenoviren und Zytomegalievirus sowie für die stets kritische Begleitung meiner Arbeit. Ihre Vorschläge haben immer zu einer besseren Darstellung und Interpretation der Ergebnisse geführt.

...Dr. Dr. Bo Niklasson von der Apodemus AB (Stockholm/Schweden) für die Bereitstellung der Ljunganvirus-Isolate und Proben aus Schweden sowie dafür, dass wir auch weiterhin Teil seines „Battleplan“ sind hinsichtlich der Klärung der Frage, ob Ljunganviren eine humanpathogene Bedeutung haben. Die Erforschung dieser neuartigen Virusgattung und deren Pathogenitätsmechanismen bleibt in Zukunft ein spannendes Thema.

...Dr. Andreas Nitsche für seine Unterstützung bei der Etablierung der Parvovirus- und Ljunganvirus-PCR sowie für seine ständige Bereitschaft, Fragen zur quantitativen PCR-Methodik zu klären – seine kollegiale, humorvolle Art und fachliche Kompetenz sind einfach unschätzbar.

...Dr. Karin Klingel von der AG Prof. Kandolf in Tübingen für die Unterstützung hinsichtlich der *in situ* Hybridisierung zur Bestätigung der PCR-Befunde.

...Dr. Hans R. Gelderblom für seine methodischen Ratschläge und steten Aufmunterungen immer dann, wenn es mit der Elektronenmikroskopie mal wieder nicht so gut klappte.

...Dr. Katrin Leitmeyer für ihre Bereitschaft und erfrischende Art, mich in die Welt der Biostatistik einzuführen. Ich wünsche der stolzen Mama für sich und ihr Baby alles Gute!

Ich danke Prof. Dr. Rudolf K. Achazi dafür, dass er diese Arbeit vor dem Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie der Freien Universität Berlin vertritt und meine Arbeit kritisch diskutiert hat.

...Dr. Brunhilde Schweiger, Dr. Eckart Schreier und Dr. Manfred Weidmann (Universität Freiburg) für die Bereitstellung ihrer PCR-Protokolle und Primer-/Sondensequenzen (einschließlich Virus-Kontrollen) zum Nachweis von Influenzaviren, Enteroviren bzw. Hantaviren.

...Dr. Joachim Denner, Dr. Albert Zimmermann (ehemals am RKI) sowie Fr. Prof. Schürmann-Bartsch vom Deutschen Institut für Ernährungsforschung für die Bereitstellung diverser Nagetier-Zelllinien.

...Dr. Barbara Chmielewicz und Hr. Dr. Ulrich (Charité Berlin) für die Bereitstellung ihrer Virus-Kontrollen zur PCR-Diagnostik für Adenoviren bzw. Hantaviren.

...Hr. Emmel und Hr. Pociuli, der nun hoffentlich seinen verdienten Ruhestand genießt, für ihre zuverlässige und schnelle Arbeit im Sequenzierlabor.

...Freya Kaulbars und Chang-Ok Han, die mich in die Geheimnisse der Elektronenmikroskopie eingearbeitet haben und mit mir gemeinsam unermüdlich nach „kleinen schrippenförmigen Kügelchen“ in zahlreichen Proben aus Geweben und Zellkulturüberständen gesucht haben. Mann, was taten uns manchmal die Augen weh!

...Fr. Zadow (NRZ Influenza), Fr. Schmitz (Homograftlabor/DHZB) und Fr. Muske (Institut für Virologie/Charité) für ihre exzellente technische Unterstützung an diversen Stellen zur Aufgabenbewältigung.

...Dr. Stephen Norley dafür, dass er stets bereit war „mein“ Englisch in den geschriebenen Manuskripten für die Publikationen zu korrigieren und teilweise noch kritische Anmerkungen zu machen.

...Fr. Erikli, die als Lektorin meiner Arbeit nochmals alles Korrektur gelesen hat.

Ganz besonders möchte ich aber allen Kollegen meiner Arbeitsgruppe danken, die für mich in all der Zeit wie eine „kleine Familie“ waren, und ohne die die ganze Arbeit hier nur halb soviel Spaß gemacht hätte. Als da wären: Hi-Gung Bae, Marcel Müller, René Kallies, Dr. Kim Hattermann, Diba Parnianfard, Anette Teichmann, Inga Nehlmeier, Petra Kreher, Klaus Kretzschmar, Dr. Regina Schädler, Petra Baer, Dr. Gert Seybert, Dr. Jens Mehlhose, Dr. Karin Lemmer. Euch allen mein Dank, dass ihr auch immer mich und meine Launen in all der Zeit ertragen habt.

Persönlich danke ich „Higgie“ ☺, die mich damals für das RKI „angeworben“ hatte, meine Arbeit stets kritisch beäugte, zahlreiche Hilfestellungen wissenschaftlicher/methodischer Art gegeben hat und immer sehr witzige Sprüche von sich gibt (ob gewollt oder ungewollt). Anette, die für mich immer eine „Star-TA“ bleiben wird und mir tatkräftig zur Seite stand. Marcel, dafür dass er immer das „Opfer“ war und meine schriftlichen Ergüsse als Erster lesen durfte. René, der ein methodisch geschickter Prakti-

kant war und nun ein ebenso guter Diplomand ist. Kim und Annie danke ich für die tollen „Parties“ und langen „Weinabende“.

Und am allermeisten danke ich meinen Eltern, ohne die das alles (einschließlich mir) nicht möglich gewesen wäre.