

**Apoptosemarker in Kardiomyozyten;  
Eine immunhistochemische Studie an Myokardbiopsien von Patienten mit  
Enterovirus-assoziiertes dilatativer Kardiomyopathie**

**D i s s e r t a t i o n**

**zur Erlangung des akademischen Grades**

**doctor medicinae (Dr.med.)**

**eingereicht von Hans-Jörg Busch**

Vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena  
von Hans-Jörg Busch  
geboren am 01.04.1972 in Aalen

Gutachter:

1. Prof. Dr. Hans Reiner Figulla
2. Prof. Dr. Fred Sinowatz
3. Prof. Dr. Gustav Jirikowski

Tag der öffentlichen Verteidigung: 02. April. 2002

**For every cell, there is a time to live and a time to die.**

*Kimball*

# **Inhaltsverzeichnis**

## **Einleitung**

### **1.1 Apoptose**

1.1.1 Definition

1.1.2 Apoptoseablauf

1.1.3 Morphologische Zeichen

1.1.4 Nachweis apoptotischer Zellen

1.1.5 Der pathologische Zelltod: Nekrose

### **1.2 Kardiomyopathie**

1.2.1 Definition

1.2.2 Einteilung

1.2.3 Dilatative Kardiomyopathie

### **1.3 Kardiale Grundlagen**

1.3.1 Der Kardiomyozyt

1.3.2 Kardiale Funktionsgrößen

### **1.4 Einführung in die Problematik**

### **1.5 Fragestellungen und Hypothesen**

## **Material und Methoden**

### **2.1 Patienten**

### **2.2 Gewebegewinnung und Standardanalysen**

2.2.1 Endomyokardiale Biopsie

2.2.2 Histologische Klassifikation

2.2.3 Immunologische Klassifikation

2.2.4 Enterovirusnachweis

## **2.3 Histochemische Untersuchungen**

- 2.3.1 Gewebeaufarbeitung
- 2.3.2 Tunel-Methode
- 2.3.3 Transglutaminase-Färbung
- 2.3.4 Aktin-Färbung
- 2.3.5 Fluoreszenzmikroskopie
- 2.3.6 Transmissions-Elektronenmikroskopie
- 2.3.7 Kontrollen

## **2.4 Auswertung**

- 2.4.1 Morphologische Auswertung (Qualitativ)
- 2.4.2 Morphologische Auswertung (Quantitativ)
- 2.4.3 Bestimmung der Apoptose-Rate
- 2.4.4 Statistische Auswertung

## **Ergebnisse**

### **3.1 Allgemeine histologische und histochemische Beurteilung**

### **3.2 Dilatative Kardiomyopathie (DCM)**

- 3.2.1 Standardanalysen und klinische Befunde
- 3.2.2 Histochemische Bewertung und Vergleich

### **3.3 Histochemische Bewertung von rechts- und linksventrikulärem Herzmuskelgewebe**

## **Diskussion**

### **4.1 Allgemeine histologische und histochemische Beurteilung**

### **4.2 Enterovirus-assoziierte dilatative Kardiomyopathie (DCM)**

### **4.3 Histochemische Charakterisierung von rechts- und linksventrikulärem Herzmuskelgewebe**

**Zusammenfassung und Ausblick**

**Schlussfolgerung**

**Bilder**

**Anlage**

**Literaturverzeichnis**

**Danksagungen**

**Liste der verwendeten Abkürzungen**

ARC	Apoptosis repressor with caspase recruitment domain
BrdU	Bromdesoxyuridine
Bp	Basenpaare
CI	Cardiac Index (l/min/m <sup>2</sup> BSA)
DAB	Diaminobenzidin
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
DD	Death domain
DED	Death effector domain
DIC	Differential Interferenz Kontrast (-Mikroskopie)
EDVI	Enddiastolischer Volumenindex (ml/m <sup>2</sup> KOF)
EF	Ejektionsfraktion (%)
eVneg	Enterovirus-negativ
eVpos	Enterovirus-positiv
FADD	Fas associated death domain
Fas	CD 95 Rezeptor
FLIP	FLICE Inhibitory Protein (Caspaseninhibitor)
FLICE	Ursprünglicher Name der Caspase-8
HF	Herzfrequenz (1/min)
HMV	Herzminutenvolumen oder Cardiac Output (CO) (l/min)
iDCM	Idiopathische dilatative Kardiomyopathie
ISEL	In situ nick endlabeling
KM	Kardiomyopathie
KOF	Körperoberfläche (m <sup>2</sup> )
LVEDD	Linksventrikulärer enddiastolischer Diameter (mm)
MAP-Kinase	Mitogen aktivierte Proteinkinase
NYHA	New York Heart Association
PAP	Pulmonary arterial pressure ( pulmonalarterieller Druck, mmHg)
PBS	Phosphate-buffered saline
PCWP	Pulmonary capillary wedge pressure (mittlerer pulmonalkapillärer Druck, mmHg)
RR	Arterieller Blutdruck (mmHg)
TNF	Tumor Nekrose Faktor

tTG	Tissue Transglutaminase
Tunel	Terminal deoxynucleotidyl-transferase mediated BrdU nick end labeling
WHO	World Health Organisation
ISFC	International Society and Federation of Cardiology



---

# Einleitung

## 1.1 Apoptose

### 1.1.1 Definition

Apoptose ist neben der Nekrose eine Form des Zelltodes *in vitro* und *in vivo*. Bei dem programmierten Zelltod, wie die Apoptose ebenfalls bezeichnet wird, steht das gesteuerte und kontrollierte Absterben von Zellen im Mittelpunkt und ist die häufigste Form des Zelltodes im Organismus. Der aus dem Griechischen stammende Ausdruck Apoptose (αποπτωσις) bedeutet sinngemäß „das Herunterfallen der Blätter“. Kerr et al. konnten mit ihrem Artikel „*Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics (British Journal of Cancer)*“ bereits 1972 deutlich machen, dass Apoptose ein biologisches System mit großer Bedeutung für Entwicklung, Homöostase und Regeneration des Organismus darstellt (Kerr et al. 1972; Payne et al. 1995; Orrenius 1996).

Die Erkenntnis, dass sowohl Regulation als auch Ablauf der Apoptose bei diversen Krankheiten verändert sein könnte, lässt dem programmierten Zelltod ein besonderes wissenschaftliches Interesse zukommen. Erkrankungen wie das Acquired Immune Deficiency Syndrom, neurodegenerative Erkrankungen, Tumorerkrankungen oder Herz-Kreislauf-Erkrankungen zählen heutzutage schon zu Krankheiten, bei denen ein gestörtes Auftreten der Apoptose bekannt ist (Narula et al. 1996; Orrenius 1996; Anversa et al. 1997).

### 1.1.2 Apoptoseablauf

Der Apoptosemechanismus läuft entweder spontan am Ende der Lebenszeit der Zelle nach ihrem eigenen *Selbstmordprogramm* ab oder wird durch äußere Faktoren in Gang gesetzt (Riede und Schäfer 1995). Zum Untergang der Zelle kommt es, wenn von ihr gebildete Proteine und Rezeptoren extrazellulär oder intrazellulär aktiviert werden. „Solange eine Zelle dem Körper nützt, hält sie diese - wohl stets bereite - Todesmaschinerie im Zaum“ (Duke et al. 1996). Entartet eine Zelle, wird sie infiziert oder ist sie für den Organismus in einer anderen Weise gefährlich, laufen proapoptische Kaskaden in der Zelle ab. Eine Vielzahl von verschiedenen Auslösern bewirkt, dass die Zelle Signale zum Untergang erhält und daraufhin die entsprechenden Enzyme aktiviert. Nachfolgend werden im Zellkern und Zytoplasma spezielle Proteasen, Endonukleasen und Transglutaminasen aktiviert, welche über genau definierte Schritte einen Abbau des Kerns und der Zelle selbst bedingen (*Übersicht 1-3*) (Heinzl 1995; Payne et al. 1995).

**Signaltransduktion** Für die Signalübertragung innerhalb und in die Zelle gibt es unterschiedliche Möglichkeiten, wobei gegenwärtig nur ein Teil der Transduktionswege bekannt zu sein scheint. Obwohl die Auslöser recht unterschiedlicher Art sein können, verläuft überraschenderweise bei allen Zellarten die Apoptose in einer ähnlichen Form ab. Dieser einheitliche Ablauf könnte – gewissermaßen als stabiles Minimal- oder Basisprogramm – in der Endphase der Apoptose auf identische Wege der Signalübertragung zurückgeführt werden (Rudel 1999). Wichtige Wege der Übertragung sind die Aktivierung der Caspasen durch Rezeptoren, mitochondrial kontrollierte externe Caspasenaktivierung sowie die mitogen aktivierten Proteinkinasen (*Übersicht 3*) (Bokemeyer et al. 1996; Pankuweit et al. 1999).

**Caspasen** Caspasen spielen bei der Durchführung und Regulation der Apoptose eine wichtige Rolle. Ihre Aktivierung kann über Rezeptoren erfolgen, die der Tumor-Nekrose-Faktor-Familie (TNF-Rezeptoren) zugehörig sind. Dementsprechend aktiviert der CD 95 Rezeptor mit seiner intrazellulär liegenden „death domain“ (DD) das Adaptermolekül FADD, welches die Caspase-8 – eine Initiator-Caspase – aktiviert (*Übersicht 1-3*) (Chinnaiyan et al. 1996). Die Caspasen-Aktivierung läuft kaskadenartig in kontrollierten Schritten ab und leitet so den programmierten Zelltod ein. Ein anderer Transduktionsweg der Caspasen läuft über die Mitochondrien ab, welche auf einen apoptotischen Stimulus mit der Ausschüttung von proapoptotischen Faktoren reagieren. Das intramembranär gelegene Cytochrom C und das „Apoptosom“, ein Komplex aus apoptosehemmenden und proapoptotischen Proteinen, werden auf diese Weise aktiviert. Das Verhältnis von BAX, Bad, Bak (proapoptotisch) zu Bcl-xl, Bcl 2 (hemmend) entscheidet hier über Ausführung oder Stillstand der Apoptose (Holtz und Heinrich 1999; Pankuweit et al. 1999).

Weitere Initiatoren der Apoptose sind Granzym B und MAP-Kinasen. Letztere werden über Tyrosin-Kinase-Rezeptoren oder Stressoren wie UV-Licht und Hyperosmolarität aktiviert (Bokemeyer et al. 1996; Pankuweit et al. 1999).

**Transglutaminase** Die tissue Transglutaminase (tTG) wird zu den Schlüsselenzymen des programmierten Zelltodes gezählt. Unter physiologischen Bedingungen ist sie in der Mehrzahl der Zellen nicht vorhanden. Als Konsequenz einer apoptotischen Stimulation wird nach Autuori et al. (1998) die mRNA der tTG transkribiert. Zellen mit konstitutioneller Expression von tTG findet man in Geweben mit großem umweltbedingten oder funktionellen Stress. In Transfektionsstudien konnte der Zusammenhang zwischen dem programmierten Zelltod und der tTG anhand einer erhöhten Apoptoserate gezeigt werden (Autuori et al.

1998). Transglutaminasen sind  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Enzyme, welche in einer späten Phase der Apoptose aktiviert werden.

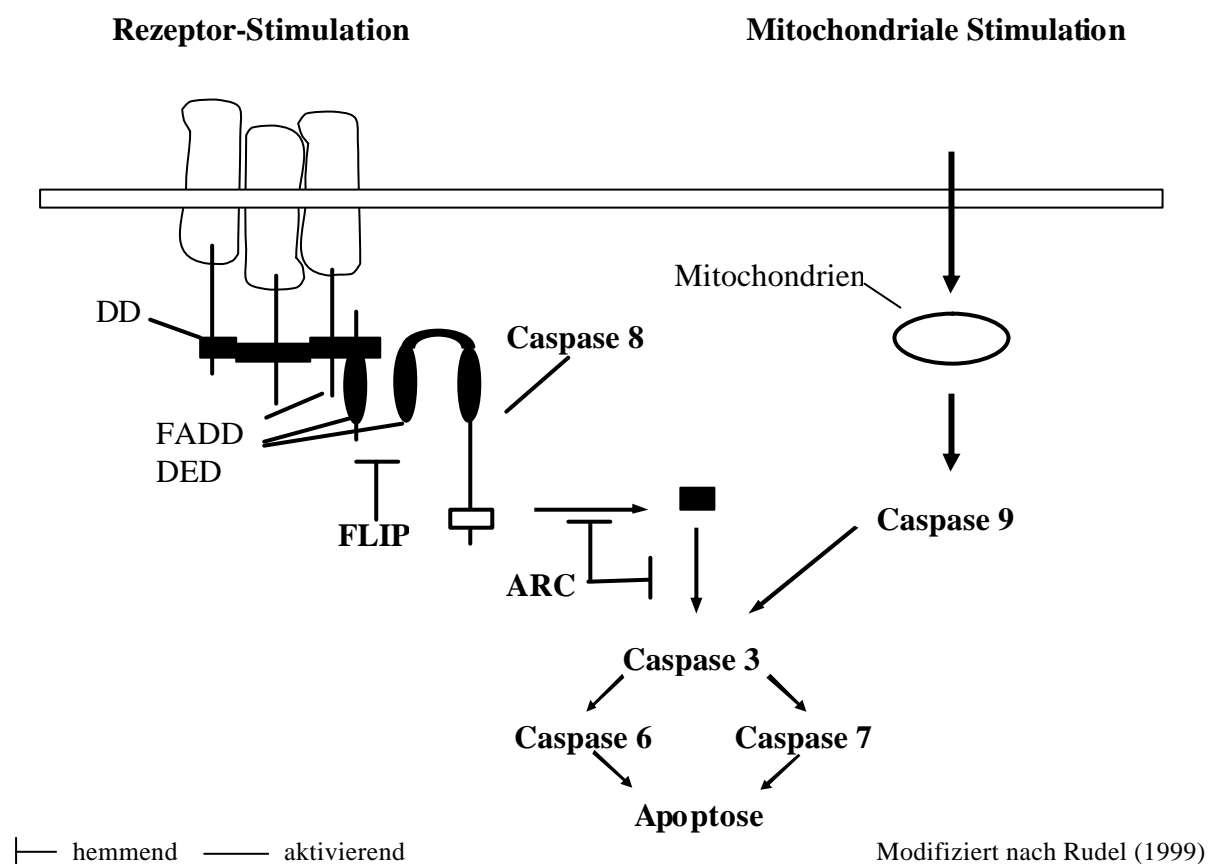
Neuere Untersuchungen zur Transglutaminasenaktivierung konnten zeigen, dass die tTG mit einem GTP-Proteinkomplex verbunden ist und dieser die tTG simultan mit anderen apoptose-spezifischen Enzymen, wie z.B. der rezeptor-abhängigen Phospholipase-C aktiviert. Hauptsächlich katalysiert die tTG Verbindungen zwischen intrazellulären Proteinen, sogenannte *crosslinks*. Auf diese Weise wird ein biologisches, unlösliches Netz in der Zelle angefertigt. Die im Abbau begriffene Zelle wird stabilisiert, der Zellinhalt kann in der Zelle gehalten, in Vesikel verpackt und abgebaut werden. Als Substrat dienen der tTG Tubulin, Vinculin, Actin, Histone und andere intrazelluläre Proteine. Von einigen Autoren wurde zudem noch eine hydrolytische Aktivität der Transglutaminase beschrieben (Fesus et al. 1991; Fesus 1992; Fesus et al. 1996; Autuori et al. 1998; Fesus 1998; Simon 1999).

**Apoptoseregulation** Für den kontrollierten und definierten Ablauf der Apoptose sind regulatorisch wirksame Proteine von großer Bedeutung. Intrazelluläre Proteine wie FLIP [FLICE (Ursprünglicher Name der Caspase-8) Inhibitory Protein] oder ARC [Apoptosis repressor with caspase recruitment domain] vermögen den Caspasen-Signalweg zu inhibieren und stellen in der Zukunft eventuell therapeutische Ansatzpunkte dar (Nicholson und Thornberry 1997; Salvesen und Dixit 1997; Pankuweit et al. 1999). Ebenso greift das Protein p53 in die Regulation des programmierten Zelltodes ein und übernimmt sozusagen die Aufgabe der „molekularen Polizei“, Zellen mit ausgeprägten DNA-Schäden in den programmierten Tod zu treiben (Payne et al. 1995). Infektionen, Mutationen und DNA-Schäden können die Induktion dieses Tumorsuppressorgens auslösen, was einen Stillstand des Zellzyklus zur Folge hat und in Abhängigkeit des Schadens zur Apoptose führt. Dieser Mechanismus versucht, den Organismus vor gefährlichen Zellmutationen zu bewahren, die später zu malignen Zellen entarten können. Geht eine Zelle nach einer adäquaten Stimulation unter, werden unterschiedliche Endonukleasen, DNasen und tTG für einen nicht-inflammatorischen Abbau der betreffenden Zelle aktiviert. Kommt es zur Aktivierung der Proteasen oder Endonukleasen, wie der DNase I, wird die DNA an genau festgelegten Punkten aufgespalten. Es kommt zu den charakteristischen Einzel- bzw. Doppelstrangbrüchen der DNA, vorzugsweise mit Bruchstücken der Größe 180 bis 200 bp oder einem mehrfachen davon (Holtz und Heinrich 1999). Bei diesem Vorgang stabilisiert die tTG die Zellkompartimente und deren Abbauprodukte. Auf der Oberfläche apoptotischer Zellen werden veränderte Zuckerstrukturen, Bindung von Thrombospondin und die Expression von

Phosphatidylserin durch phagozytierende Zellen erkannt und die Zellen beseitigt (Payne et al. 1995; Holtz und Heinrich 1999).

Im Unterschied zur Nekrose wird die betreffende Zelle ohne eine Entzündungsreaktion abgebaut. Dies kann nur erfolgen, wenn die Zelltrümmer und Zellreste von einer intakten Membran umgeben werden, so dass kein entzündungsfördernder Zellinhalt in die Umgebung gelangt.

*Übersicht 1:* Vereinfachte Darstellung der Caspasenaktivierung



*Übersicht 1* zeigt zwei wichtige Wege der Caspasenaktivierung. Unterschieden werden die rezeptor-abhängige und die mitochondriale Aktivierung. Der zytoplasmatische Anteil des Rezeptors, als DD (death domain) bezeichnet, reagiert über das FADD (Fas-associated death domain) Adapter-Protein mit der DED (death effector domain) der Caspase 8.

Mit einer Ausschüttung von caspasen-aktivierenden Proteinen, wie dem Cytochrom C, reagieren die Mitochondrien auf einen apoptotischen Stimulus.

FLIP (FLICE, anderer Name für Caspase 8, Inhibitory Protein) und ARC (Apoptosis Repressor Protein With Caspase Recruitment Domain) stellen Proteine dar, welche diese

Wege hemmen können. FLIP inhibiert die Aktivierung der Caspase 8. ARC hemmt die Weiterleitung des Signals ab der Caspase 8. Beide Proteine sind in normalem Myokardgewebe stark ausgebildet.

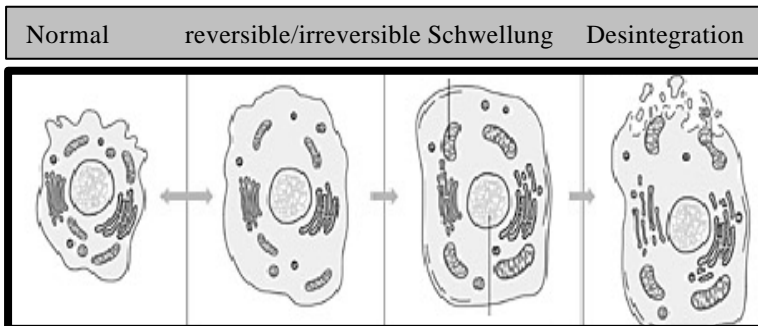
### 1.1.3 Morphologische Zeichen

Der programmierte Zelltod umfasst eine Reihe von Veränderungen, die beim Abbau der Zielzelle auftreten.

- (1) Enzymatische DNA-Fragmentierung.
- (2) Zellkernschrumpfung mit Chromatinkondensation, Verlagerung des verdichteten Chromatins an den Kernrand und verschiedene crescendierende (sichelmondähnliche) Formen des kondensierten Chromatins (Payne et al. 1995; Holtz und Heinrich 1999).
- (3) Expression von Phosphatidylserin in der Phospholipiddoppelschicht der Zellmembran, wodurch spezifische Bindungsstellen für das Protein „Annexin V“ entstehen.
- (4) Unregelmäßige Zelloberfläche mit Einstülpungen und „*membrane blebs*“ auf der Außenseite der Zelle (Duke et al. 1996).
- (5) Zellschrumpfung, Zytoskelettdegradierung.
- (6) Apoptotic bodies, Zerfall des Zellkerns und der Zelle in kleine membranumhüllte Vesikel.
- (7) Nichtentzündlicher Abbau und Abtransport.

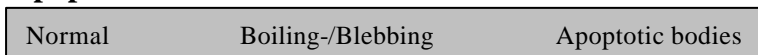
Übersicht 2: Morphologische Kennzeichen im Verlauf von Nekrose bzw. Apoptose

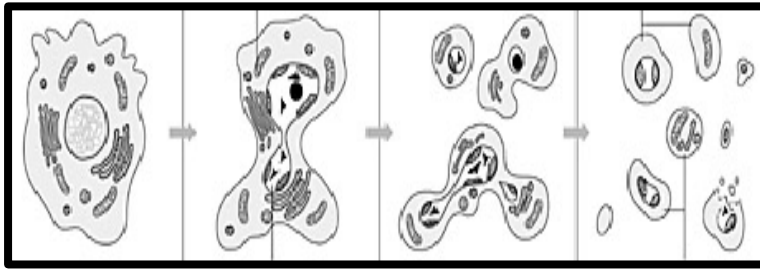
#### Nekrose



Übersicht 2 stellt die verschiedenen morphologischen Stadien von Nekrose und Apoptose dar. Bei der Nekrose kommt es zu Wassereinstrom und Zellschwellung bis zum kompletten Membranuntergang. Apoptose ist durch Zellschrumpfung und Abschnürung von einzelnen Bläschen morphologisch gekennzeichnet.

#### Apoptose





Modifiziert nach Boehringer Mannheim Apoptose Website

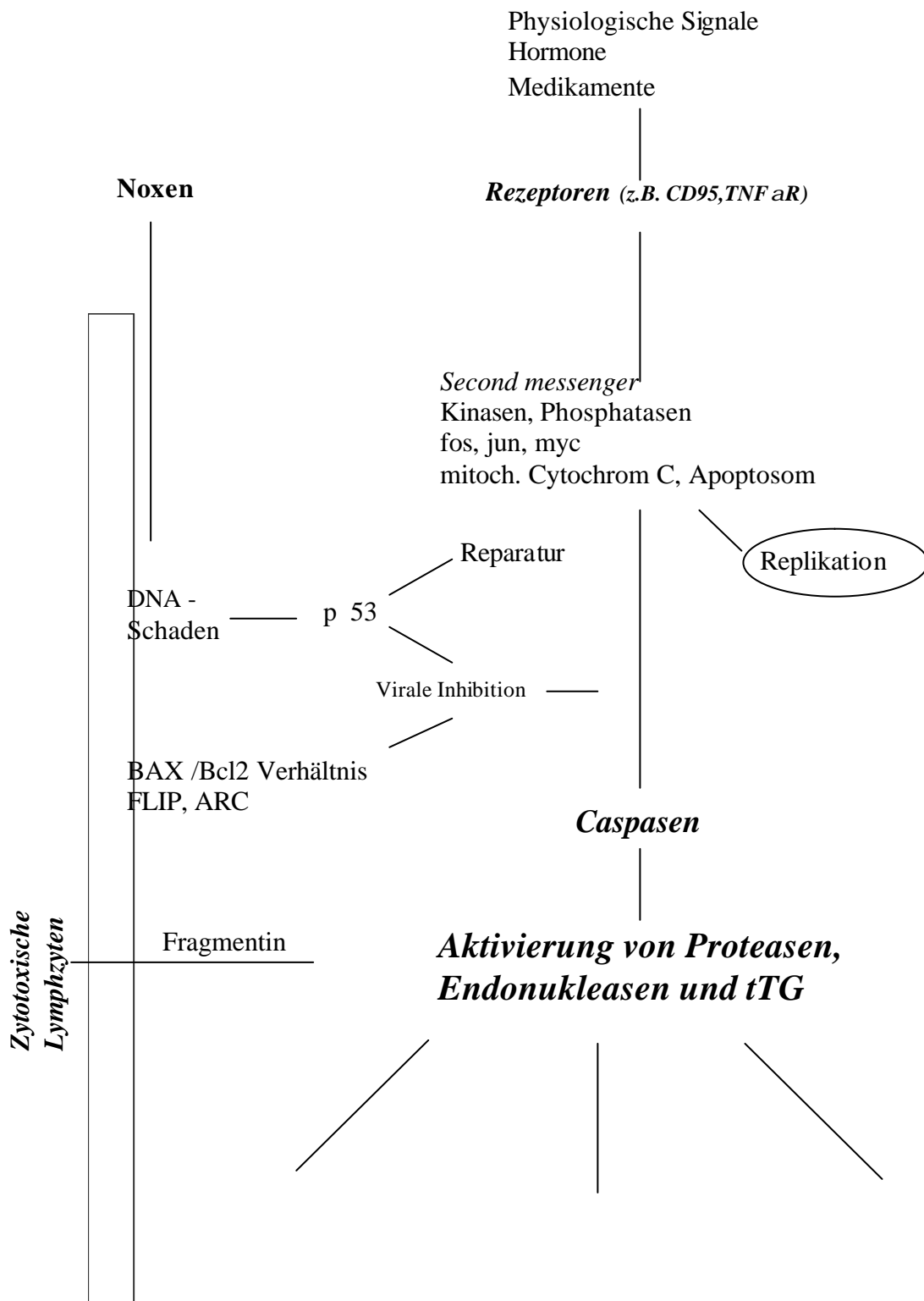
Anhand der obigen Kennzeichen kann der apoptotische Prozess morphologisch in das Boiling-, Blebbing- und Phagozyten-Stadium eingeteilt werden. Das Boiling-Stadium (engl. boiling - kochend) wird durch unruhige, unregelmäßige Zelloberflächen mit kleinen Membranausbuchtungen und -abschnürungen charakterisiert. Das Blebbing-Stadium (engl. blebbing - Bläschen werfend) ist durch Vesikelabschnürung bzw. -abgabe und im fortgeschrittenen Stadium durch kleine Vesikelguppierungen, den *apoptotic bodies*, gekennzeichnet. In der Phagozytose-Phase werden die Vesikel von Phagozyten aufgenommen und abgebaut (Krammer 2000).

Wie bereits dargelegt, braucht der Organismus das programmierte Absterben der Zellen zum Überleben. Die Apoptose ist in einer Vielzahl von Körpergeweben physiologisch zu finden. Dies gilt für Zellen in Auge, Darm, Haut, Immunsystem und Uterus. Aufgrund der hohen Zellumsatzraten und der hohen Regenerationsfähigkeit werden diese Gewebe zu den Erneuerungs- oder Mäusergeweben gezählt. (Riede und Schäfer 1995)

Riede und Schäfer (1995) klassifizieren als weitere Formen das stabile Gewebe und das Ruhegewebe. Bei stabilem Gewebe (Niere, Leber) kommt es durch das programmierte Absterben zu Regenerationsmechanismen bis hin zur Zellerneuerung. Die Zellneubildung ist im Gegensatz zum Erneuerungsgewebe jedoch relativ gering.

Nach Riede und Schäfer besteht das Ruhegewebe aus irreversiblen postmitotischen Zellen, die unter normalen Umständen nicht mehr zur Teilung fähig sind. Zu diesen zählt das Herz- und Nervengewebe. In diesen Geweben findet normalerweise keine physiologische Gewebserneuerung durch Apoptose statt. Untergegangene Zellen können hier meist nur durch Narbengewebe ersetzt werden (Riede und Schäfer 1995).

Übersicht 3: Apoptoseablauf



- Kondensation
- DNA-Fragmentation
- Zytoskelettabbau
- Wasserverlust
- Zellschrumpfung
- Phagozytosemarker
- Protein crosslinking
- Vesikel
- “apoptotic bodies”

### 1.1.4 Nachweis von apoptotischen Zellen

Zum Nachweis von Apoptose stehen derzeit unterschiedliche Methoden mit mehr oder minder hoher Spezifität und Sensitivität zur Verfügung. In Abhängigkeit des Gewebes, des Zelltyps, der Fixierung oder der Fragestellung kommen dabei verschiedene Methoden zur Anwendung. Die unten aufgeführte Tabelle zeigt eine Übersicht der verfügbaren Methoden.

*Tabelle 1:* Übersicht verschiedener Nachweismethoden von apoptotischen Zellen

Methoden	Spezifität	Apoptosestadium Früh/Spät	Nekrose	Quantifizierung
<b>Morphologischer Nachweis:</b> (1) Elektronenmikroskopie (2) Fluoreszenzmikroskopie (3) Standardhistologische Analysen	spezifisch nicht-spezifisch nicht-spezifisch	pos/pos -/pos neg/pos	pos pos pos	schwierig schwierig schwierig
<b>DNA-Fragmentation:</b> (1) Tunel-Methode (2) EM-Tunel (3) Taq in situ ligand assay (4) ss DNA-Färbung (5) DNA-Laddering	möglich spezifisch spezifisch möglich spezifisch möglich spezifisch möglich spezifisch	pos/pos pos/pos -/pos -/pos pos/pos	pos pos - - neg	gut durchführbar schwierig möglich möglich unmöglich
<b>Caspase-Aktivierung</b>	Spezifisch	pos/pos	neg	möglich
<b>Phosphatidylserintranslokation</b> (Annexin-Färbung)	nicht-spezifisch	pos/neg	neg	möglich
<b>Monoklonale Antikörper</b> Fas, Bax, Bcl2 oder tTG	Spezifisch	pos/neg oder pos/pos oder neg/pos	neg	gut durchführbar
<b>Indirekte Testverfahren:</b> (1) Chrom <sup>51</sup> -bzw. <sup>3</sup> H Thymin-Freisetzungstest (Plasmamembranzerstörung) (2) Propidiumjodidfärbung	- -	neg/pos neg/pos	pos pos	- -

In Anlehnung an Pankuweit et al. (1999) und Elsässer et al. (2000)

### 1.1.5 Der pathologische Zelltod: Nekrose

Wegen entscheidender Analogien zwischen Apoptose und Nekrose sollen hier einige Merkmale der Nekrose betrachtet werden. Nekrose ist eine „Endstrecke irreversibler



Stoffwechselstörungen, die entweder den Struktur-, Funktions-, oder Proliferationsstoffwechsel oder alle zusammen betreffen“ (Riede und Schäfer 1995; Duke et al. 1996). Hierbei kommt es durch exogene und endogene Faktoren, Noxen oder durch Mangelversorgung zum unkontrollierten Untergang von Zellgruppen. Zumeist wird die Nekrose durch absoluten Sauerstoffmangel, wie z.B. bei Infarkten, ausgelöst. Für die jeweilige Zelle bedeutet Nekrose einen plötzlichen, katastrophenartigen Zustand, der nicht durch regulierende Kaskaden beeinflusst werden kann (Maisch 1999). Hauptsächlich durch stoffwechselbedingte Membran- und Transporterschäden kommt es zur intrazellulären Wassereinlagerung und damit zur Schwellung der Zelle mit ihren Kompartimenten. Im weiteren Verlauf kommt es zur Zerstörung der Zellmembranen und -kompartimente. Infolgedessen sind die Bruchstücke der untergegangenen Zelle frei zugänglich und werden durch Entzündungszellen abgeräumt (Riede und Schäfer 1995; Maisch 1999; Elsässer et al. 2000). Eine ausgeprägte entzündliche Antwort und das Einwandern von Entzündungszellen in das Nekrosegebiet ist charakteristisch. Analog zum programmierten Zelltod kommt es auch hier zu Einzel- bzw. Doppelstrangbrüchen der DNA. Für die histochemische Beurteilung betroffener Gewebe bedeutet dies, dass die Nekrose exakt von der Apoptose differenziert werden muss, da diese sich in Ursachen und Pathomechanismen unterscheiden (Maisch 1999; Elsässer et al. 2000).

In dem von Majno und Joris veröffentlichten Textbuch „Cells, Tissues and Disease“ wird postuliert, dass der Begriff Nekrose den Veränderungen nach dem Sterben der Zelle vorbehalten werden sollte, unabhängig vom Weg, der zum Zelltod geführt hat (Maisch 1999; Elsässer et al. 2000). Als Zelltodformen differenzieren die Autoren die Onkose von der Apoptose.

Tabelle 2: Vergleich Apoptose vs. Nekrose

<b>Apoptose</b>	<b>Nekrose</b>
<b>Morphologische Zeichen</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• In der Frühphase kein morphologisch sichtbarer Verlust der Membranintegrität</li> <li>• Membran blebbing</li> <li>• Chromatinkondensation</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reversibles Zellödem</li> <li>• Irreversibles Zellödem mit intaktem Kern</li> <li>• Desintegration der Organellen</li> <li>• Totaler Verlust der Membranintegrität</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Beginnt mit Schrumpfen und Kondensation der Zelle und endet mit Fragmentation der Zelle in Apoptosekörperchen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Beginnt mit Zellschwellung und endet mit totaler Lyse</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Apoptotic bodies</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Keine Vesikelformation</li> </ul>
<b>Biochemische Zeichen</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Enzymatischer Abbau in definierten Schritten</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kein kaskadenförmiger Ablauf</li> <li>• Verlust der Ionenhomöostase</li> </ul>

<ul style="list-style-type: none"> <li>• Energieabhängig (nicht bei niedriger Temperatur)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Energieunabhängig (auch bei niedriger Temperatur)</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• DNA-Abbau an genau festgelegten Stellen</li> <li>• Prälytische DNA-Fragmentation</li> <li>• Aktivierung der Caspasen-Kaskade</li> <li>• Ausschüttung von speziellen mitoch. Faktoren</li> <li>• Veränderungen an der Zellmembran (Phosphatidylserin auf der Außenseite der Zelle exprimiert, kein morph. Verlust der Membranintegrität)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Zufälliger Abbau der DNA (kein spezielles Bild in der Gelelektrophorese)</li> <li>• Postlytische DNA-Fragmentation</li> </ul>
<b>Physiologische Bedeutung</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Betrifft einzelne Zellen</li> <li>• Wird durch physiologische Signale ausgelöst</li> <li>• Abbau durch phagozytierende Zellen</li> <li>• Keine Entzündungsreaktion</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Betrifft meist Zellgruppen</li> <li>• Wird von unphysiologischen Zuständen wie Hypoxie oder Hyperthermie ausgelöst</li> <li>• Signifikante Entzündungsreaktion</li> </ul>

Modifiziert nach Boehringer Mannheim Apoptose Website

## 1.2 Kardiomyopathien

### 1.2.1 Definition (WHO Task Force; 1995)

Kardiomyopathien (KM) sind Funktionsstörungen des Herzmuskels, die nicht auf eine koronare Mangeldurchblutung, eine mechanische Überbeanspruchung wie hämodynamisch relevante Vitien oder auf einer Hypertonie im großen bzw. kleinen Kreislauf zurückzuführen sind (Richardson et al. 1996).

Nach dieser Definition entstehen Kardiomyopathien aufgrund von Läsionen der Stoffwechselfvorgänge, die dem Aufbau und der Erhaltung der myokardialen Struktur und Funktion dienen (Riede und Schäfer 1995).

### 1.2.2 Einteilung

Gegenwärtig werden Kardiomyopathien nach ätiologischen und hämodynamischen Gesichtspunkten unterteilt. Ätiologisch differenziert man primäre Kardiomyopathien mit unbekannter Ursache von sekundären Kardiomyopathien. Sekundäre Kardiomyopathien sind myokardiale Dysfunktionen, bei denen die auslösenden Ursachen bekannt sind. Hierzu zählen genetische Faktoren, Hypertonie, Toxine, entzündliche Reaktionen (z.B. Sarkoidosen, Kollagenosen, Postinfarktsyndrom), Infektionen oder auch die ischämische Herzkrankheit (Schwartz und Mercadier 1996; Maisch 1998). Aufgrund der großen Anzahl an ätiologisch unklaren Kardiomyopathien hat sich für klinische Interessen die Einteilung nach hämodynamischen Parametern bewährt. Es finden sich typische Abweichungen der enddiastolischen und endsystolischen Ventrikelform, der systolischen Wandfunktion, der ventrikulären Muskelmasse und des Durchmessers (Hopf et al. 1990).

Die im Jahr 1996 publizierte *WHO/ISFC*-Klassifikation unterscheidet folgende Kardiomyopathien (Richardson et al. 1996) :

- dilatative Kardiomyopathie (DCM)
- hypertrophe Kardiomyopathie (HCM)
- restriktive Kardiomyopathie (RCM)
- arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie (ARVC)
- nichtklassifizierbare Kardiomyopathien (NKCM)

### 1.2.5 Dilatative Kardiomyopathie (DCM)

**Epidemiologie** Die idiopathische dilatative Kardiomyopathie (DCM) betrifft bevorzugt Männer mit einer Verteilung von etwa 2:1. Die Inzidenz beträgt 6-8 pro 100 000 Einwohner, die Prävalenz 36 pro 100 000 Einwohner. Eine familiäre Häufung findet sich bei 15 bis 20 % der Patienten (Maisch 1998).

Im Vordergrund der Erkrankung steht eine mehr oder minder ausgeprägte Herzinsuffizienz und deren Symptome. Für die exakte Diagnosestellung der DCM ist die histologische Beurteilung von größter Bedeutung, da sich die verschiedenen Insuffizienzformen und Ursachen nicht anhand klinischer Symptome unterscheiden lassen (Sigusch et al. 1998). In großen kardiologischen Kollektiven findet sich nach der koronaren Herzerkrankung die DCM bei 14-19% der Patienten als zweithäufigste Ursache einer chronischen Herzinsuffizienz. Über 50% der DCM Patienten sterben innerhalb der ersten 5 Jahre nach Diagnosestellung (Osterziel und Dietz 2000). Für die pathophysiologischen Vorgänge der Herzinsuffizienz standen in den letzten Jahren mehrere Modelle zur Verfügung, welche die Therapieansätze wesentlich beeinflussen. Diese sind das Ödem-Modell, das Vaskuläre-Modell sowie das Neurohumorale-Modell. Dadurch kamen bei der DCM mit konsekutiver Herzinsuffizienz ACE-Hemmer,  $\beta$ -Blocker, Diuretika, Aldosteronantagonisten und Antikoagulantien therapeutisch zur Anwendung. Eine kausale Therapie der ventrikulären Dysfunktion bei der DCM ist jedoch noch nicht möglich. Infolgedessen bestehen die therapeutischen Optionen einzig aus der Behandlung der Symptome (s.o.).

Unter den Kardiomyopathien wird die dilatative Kardiomyopathie als häufigste Form diagnostiziert. Bei der sekundären DCM sind klinisch am häufigsten ischämische,

hypertensive, inflammatorische, postvirale und autoimmune Kardiomyopathien zu finden (Maisch 1998).

**Charakteristika** Hämodynamisch wird die DCM durch ein vergrößertes enddiastolisches und endsystolisches Volumen, eine erniedrigte Ejektionsfraktion (EF) sowie Kontraktionsstörungen des gesamten Ventrikels gekennzeichnet. Aufgrund dieser hämodynamischen Merkmale finden sich nachfolgend auch Veränderungen auf zellulärem Niveau.

Licht- bzw. elektronenmikroskopisch ist die DCM durch hypertrophe Herzmuskelfasern, vergrößerte, polymorphe Kerne mit großen aktiven Nukleolen und perinukleären Aufhellungszonen charakterisiert. Es kommt zu degenerativen Veränderungen der Myozyten, diffusen interstitiellen Fibrosen und einem verminderten Gehalt an Myofibrillen (Hopf et al.1990).

Eine Unterscheidung der kardialen Dysfunktionen unklarer Genese ist ohne eine Endomyokardbiopsie mit histologischen, immunhistochemischen und molekularbiologisch-viralen Untersuchungen nicht möglich (Maisch 1998; Maisch et al. 2000).

Patienten mit einer linksventrikulären Dysfunktion unbekannter Genese können unter Berücksichtigung des Infektionsnachweises oder des inflammatorischen Infiltrates weiter subklassifiziert werden (*Tabelle 3*). Infolgedessen hat sich bei Patienten mit einer idiopathischen linksventrikulären Dysfunktion gezeigt, dass bei 70-75% die Ursachen unerkannt bleiben, ein geringer Anteil der Patienten eine Autoimmunmyokarditis (3%) oder infektiöse Myokarditis (7%) aufweist. 20-25% der Patienten sind an einer Virus-assoziierten DCM erkrankt (Sigusch et al. 1998).

*Tabelle 3:* Vierfelder-Subklassifikation der idiopathischen DCM (iDCM)/Myokarditis

<b>Infektiöses Agens</b>	<b>Kein infektiöses Agens</b>	
<b>Myokarditis</b> [7%]	<b>Autoimmunmyokarditis</b> [3%]	<b>Zelluläres Infiltrat</b>
<b>Virus-assoziierte iDCM</b> [20-25%]	<b>iDCM mit unklarer Ätiologie (idiopathisch)</b> [70-75%]	<b>Kein zelluläres Infiltrat</b>

Modifiziert nach Sigusch et al. (1998)

## 1.3 Kardiale Grundlagen

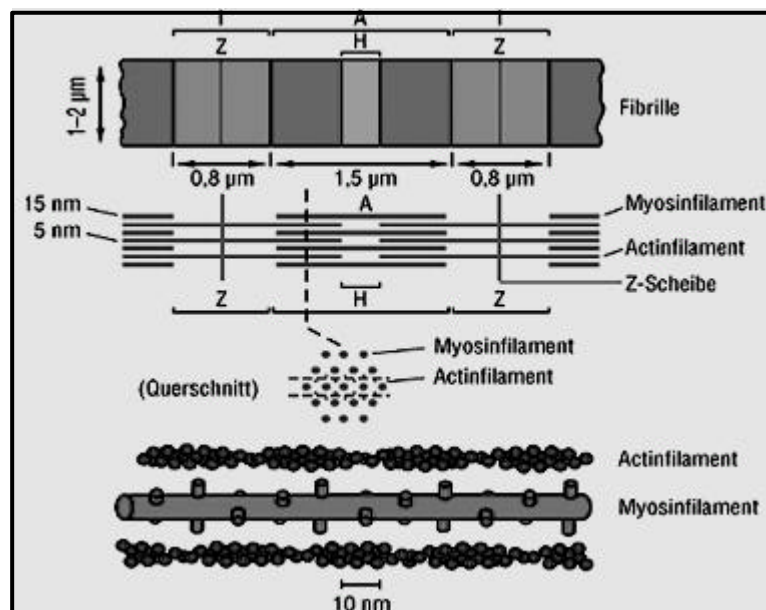
### 1.3.1 Der Kardiomyozyt

Die Muskelschicht des Herzens, das Myokard, ist aus intermitotischen Muskelzellen, den Myozyten aufgebaut und zählt zu den Ruhegeweben. Auf subtotale Zellschädigung reagieren die Myozyten meist mit zellulärer Hypertrophie, auf letale Zellschädigung mit Zelluntergang, Narbenbildung und Herzwandumbau (Riede und Schäfer 1995). Der durchschnittliche Kern-Durchmesser beträgt  $4\ \mu\text{m}$ , die durchschnittliche Kernlänge  $14\ \mu\text{m}$ .

Bei den Herzmuskelzellen handelt es sich um spezialisierte Muskelzellen. Die kontraktile Elemente der Myozyten sind die Myofibrillen und bestehen – als Untereinheiten der Muskelfasern – aus Myofilamenten, welche aus den beiden Proteinen Aktin und Myosin aufgebaut sind. *Übersicht 4* zeigt den schematischen Aufbau der kontraktile Elemente einer Myokardzelle. Durch die regelmäßige Anordnung der Filamente entsteht die typische Querstreifung der Muskulatur mit unterschiedlich optisch brechenden Streifen und Bändern (I-Band - dünne Actinfilamente; A-Band - dicke Myosin- und dünne Actinfilamente; H-Zone - Myosinfilamente). Zwischen den Z-Streifen, die als Haftungsstelle für die Actinfilamente dienen und im Zentrum der I-Bande liegen, befindet sich das Sarkomer.

Bei einer Kontraktion, ausgelöst durch Acetylcholin an der motorischen Endplatte, gleitet das Aktin am Myosin entlang und verkürzt somit die Sarkomerlänge und den Muskel (Sanger et al. 1984; Linß 1991; Riede und Schäfer 1995).

*Übersicht 4: Aufbau der kontraktile Elemente in Muskelzellen*



### 1.3.2 Kardiale Funktionsgrößen (Hopf et al.1990; Löllgen 1990)

#### *Allgemeine physiologische Parameter:*

- Herzfrequenz in Ruhe: 60-100 min<sup>-1</sup>
- Blutdruck in Ruhe : systolisch ≤ 139 mmHg, diastolisch ≤ 89 mmHg
- Herzgewicht: 250-300g
- Durchschnittliches Herzvolumen: 500-900 ml

#### *Hämodynamische Parameter:*

- Linksventrikuläres enddiastolisches Volumen (LVEDV): <160ml/1,73m<sup>2</sup> BSA
- Auswurfraction (ejection fraction = EF ): > 64%
- Linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser (LVEDd): ≤ 56 mm
- Linksventrikulärer endsystolischer Durchmesser (LVESd): ≤ 40 mm
- Schlagvolumen: 60-70 ml/b
- Herzzeitvolumen (HZV oder CO): 5-6 l
- Herzindex (HI): 2,8-4,2 l/min/m<sup>2</sup>
- Pulmonal arterieller Mitteldruck (PAP): 9-16 mmHg
- Pulmonal kapillärer Wedge Druck (PCWP): 2-12 mmHg

## 1.4 Einführung in die Problematik

Apoptose stellt ein zelluläres Phänomen dar, welches in den letzten Jahren viele Fachbereiche der Medizin, insbesondere die Kardiologie, beschäftigt hat. Vor einigen Jahren noch war die kardiologische Forschung darauf konzentriert, das Herz vor Nekrose, wie zum Beispiel bei der ischämischen Herzkrankheit, zu bewahren (Elsässer et al. 2000). Durch zunehmende Intensität der Forschungsarbeiten auf dem Gebiet des programmierten Zelltodes eröffnen sich neue Ansatzpunkte für Prävention und Therapie verschiedener kardialer Krankheitsbilder (Orrenius 1996; Simon 1999).

Wie eingangs erwähnt, findet man Apoptose gewöhnlich in Geweben mit einem hohen Zellumsatz. Neuere Untersuchungen konnten indes zeigen, dass der programmierte Zelltod auch in Ruhewebe wie Nerven- oder Herzgewebe vorkommt. Ein Verlust von Myozyten durch Apoptose konnte inzwischen bei kardialen Erkrankungen wie der chronischen Herzinsuffizienz, der koronaren Herzkrankheit und der idiopathischen Kardiomyopathie nachgewiesen werden (Cheng et al. 1995; Narula et al. 1997; Olivetti et al. 1997; Simon 1999). In der 44th Scientific Session des American College of Cardiology in New Orleans schlug Packer in diesem Zusammenhang erstmals das Apoptosemodell der Herzinsuffizienz zur Klärung der Ursachen und Progression der kontraktilen Dysfunktion vor (Heinzel 1995).

Trotz vieler brauchbarer Ansätze gibt es noch keinen „Goldstandard“ für den Nachweis von apoptotischen Herzmuskelzellen in Myokardbiopsien (Saraste 1999; Saraste und Pulkki 2000). Die üblichen Nachweismethoden sind momentan von recht unterschiedlicher Sensitivität und Spezifität, oft für die Quantifizierung ungeeignet. Viele Fragen zum programmierten Zelltod und dessen Nachweis bzw. Quantifizierung in Herzmuskelgewebe sind nicht oder nur unbefriedigend beantwortet (Elsässer et al. 2000). Auch Fragen zur Entwicklung und Progression des Kontraktilitätsverlustes sowie zu Ursachen und Initiatoren der dilatativen Kardiomyopathie können zur Zeit nicht ausreichend beantwortet werden.

## 1.5 Fragestellungen und Hypothesen

Wie in Abschnitt 1.4 bereits erläutert, war es möglich, in verschiedenen Untersuchungen an explantierten Herzen von Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz apoptotische Kardiomyozyten nachzuweisen. Dennoch waren die Angaben über die Ausprägung und Lokalisation der Apoptose in den verschiedenen Arbeiten recht unterschiedlich (Narula et al. 1997; Olivetti et al. 1997). Die chronische Herzinsuffizienz kann auf die unterschiedlichsten Ursachen zurückgeführt werden. Zunehmend werden virale Erreger als einer der ätiologischen Faktoren bei Kardiomyopathien beschrieben. Das Coxsackievirus B stellt den häufigsten viralen Erreger der infektiösen Herzmuskelerkrankungen dar (Kandolf et al. 1987; Kandolf 1993; Kandolf et al. 1993; Figulla et al. 1995).

Die Rolle der Apoptose bei Viruserkrankungen ist in den letzten Jahren für eine Reihe von Viren beschrieben worden (Duke et al. 1996; Gillet und Brun 1996; Derfuss et al. 1998). Bis zum Beginn der vorliegenden Untersuchung gab es keine Erkenntnisse über das Ausmaß der Apoptose und dessen Beeinflussung durch virale Infektionen bei idiopathischer dilatativer Kardiomyopathie.

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, folgende Fragen zu untersuchen:

- Stehen zum histochemischen Nachweis der myokardialen Apoptose geeignete Verfahren zur Verfügung, den programmierten Zelltod im Herzmuskelgewebe nachzuweisen?
- Ist es möglich, anhand einfacher histochemischer Apoptose-Marker Zellen zu identifizieren, welche sich im apoptotischen Prozess befinden?
- Können Aussagen über den Zusammenhang zwischen myokardialer Apoptose und kontraktile Insuffizienz bei DCM gemacht werden ?
- Gibt es Unterschiede in der morphologischen oder histochemischen Ausprägung und Intensität der myokardialen Apoptose zwischen Patienten mit Enterovirus-positiver und Enterovirus-negativer idiopathischer DCM?

Weiterhin soll in dieser Arbeit versucht werden, anhand des Erscheinungsbildes der myokardialen Apoptose und des Auftretens apoptotisch veränderter Myozyten ein einfach anwendbares Nachweis- und Klassifizierungssystem der Enterovirus-assoziierten DCM zu erstellen.



## Material und Methoden

### 2.1 Patienten

Im Zeitraum von Januar 1997 bis November 1998 wurden in der Klinik für Innere Medizin III der Friedrich-Schiller-Universität Jena 48 Patienten mit unklarer linksventrikulärer Dysfunktion aufgenommen.

Entsprechend der WHO/ISFC-Definition (1995) wurde – nach Ausschluß einer hypertonen/koronaren Herzerkrankung und eines hämodynamisch relevanten Vitiums – bei Patienten mit systolischem Pumpfehler, Kardiomegalie und einer LVEF < 55% in Ruhe (area-length method) die Diagnose einer *idiopathischen dilatativen Kardiomyopathie (DCM)* gestellt.

Anhand weiterführender Untersuchungen wurde echokardiographisch der linksventrikuläre enddiastolische Diameter (LVEDD; mm), die echographische Ejektionsfraktion (EF; %) sowie mittels einer Rechtsherzkatheteruntersuchung der mittlere pulmonalarterielle Druck (PAPm; mmHg), der mittlere pulmonalkapilläre Druck (PCWP; mmHg), der Cardiac Output (CO; l/min) und der Cardiac Index (CI; l/min/m<sup>2</sup> KOF) ermittelt. Die linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF; %) und der enddiastolische Volumenindex (EDVI; ml/m<sup>2</sup> KOF) wurden mittels Lävokardiographie bestimmt.

Zur histologischen Diagnosesicherung und zum Ausschluss von Sekundärerkrankungen wurde bei Patienten mit unklarer linksventrikulärer Dysfunktion im Rahmen der Linksherzkatheter-Untersuchung eine Myokardbiopsie durchgeführt (Richardson et al. 1996; Maisch 1998).

### 2.2 Gewebegewinnung und Standardanalysen

#### 2.2.1 Endomyokardiale Biopsie

Von 25 (52%) der 48 primär aufgenommenen Patienten wurde das Herzmuskelgewebe im apikalen Septumbereich des rechten Ventrikels entnommen. Aus methodischen Gründen wurde Mitte 1998 an der Klinik für Innere Medizin III von rechtsventrikulärer auf linksventrikuläre Myokardentnahme umgestellt. Somit erfolgte bei 23 (48%) Patienten die Entnahme des Muskelgewebes aus dem linken Ventrikel über die A. femoralis. Die

Myokardbiopsie wurde jeweils mit einem *Cordis long sheath biptome (5.4F; 7F)* durchgeführt.

Jedem der 48 Patienten wurden 6-8 Herzmuskelbiopsien entnommen, die einer histologischen und immunhistologischen Routinebeurteilung durch unabhängige Betrachter zugeführt wurden. Weiterhin wurden immunhistochemische und morphologische Untersuchungen zur myokardialen Apoptose mit unterschiedlichen immunhistochemischen Markern und der Nachweis von Enterovirus-RNA unter Verwendung von RT-PCR an den Biopsien vorgenommen.

### **2.2.2 Histologische Klassifikation**

Die standardisierte histologische Beurteilung der Bioptate erfolgte anhand Hämatoxyllin-Eosin gefärbten Paraffinschnitten durch die Pathologischen Institute Jena und Darmstadt.

Zum Ausschluß einer Myokarditis wurde das entnommene Gewebe anhand der Dallas-Klassifikation eingeteilt und bewertet (Aretz 1987; Aretz et al. 1987).

### **2.2.3 Immunologische Klassifikation**

Zur Beurteilung von entzündlichen Infiltrationen wurden die Bioptate mittels 4 µm dicken Gefrierschnitten durch das kardiologische Labor der Klinik für Innere Medizin III der Friedrich-Schiller-Universität Jena untersucht. Anhand der Expression unterschiedlicher Entzündungszellmarker wurde die inflammatorische Infiltration und Aktivität bewertet. Eine Biopsie pro Patient wurden in tissue tec eingedeckt und anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Zur Beurteilung wurden primäre Antikörper Anti-CD 2 (pan-T cell marker), Anti-CD 4 (T helper cells), Anti-CD 8 (T suppressor cells), Anti-CD 14 (Makrophagennachweis) und Anti-CD 45 RO als Nachweis für aktivierte T-Lymphozyten eingesetzt.

Zusätzlich zur Analyse der Entzündungszellen wurde die Expression der Major-Histokompatibilitäts-Komplexe (MHC) der Klassen I (HLA-A,B,C) und der Klasse II (HLA-DR,DP,DQ) an den Kryostatschnitten untersucht und semiquantitativ beurteilt.

### **2.2.4 Enterovirusnachweis**

Die Virusanalysen wurden dankenswerterweise durch das Virologische Institut der Friedrich-Schiller-Universität Jena mittels einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit nachfolgender Southern Blot-Hybridisierung durchgeführt.

Die dazu benötigte RNA-Extraktion aus dem Herzmuskelgewebe wurde aus tiefgefrorenen Myokardbiopsien nach der Guanidinium-Thiozyanate-Phenol-Chloroform Methode von Chomczynski und Sacchi (1987) erzielt. Aus der so gewonnenen RNA wurde ein Aliquot durch oligo-dt Priming in cDNA umgewandelt.

Die Effizienz der RNA-Extraktion wurde durch den Nachweis des Housekeeping-Genes  $\beta$ -Aktin überprüft (Primer der Fa. Clontech, Heidelberg, Germany).

Der Nachweis der Enterovirus-RNA/cDNA erfolgte durch eine one-Step RT-PCR (Titan One tube<sup>TM</sup> Systeme.; Böhlinger Mannheim, Germany) und Primern, die den konservierten 5'-Bereich der Enteroviren erkennen können (5'CGGTACCTTTGTGCGCCTGTTTAA-3' und CGGACACCCAAAGTAGTCGGTTCC-3').

Zur Erhöhung der Sensitivität und Bestätigung der Spezifität wurde eine Hybridisierung des PCR-Produktes anhand eines Southern-Blot durchgeführt.

Unter Verwendung einer spezifischen Sonde (5'-CCCCGGACTGAGTCAATA-3' und CAGTTAGGATTAGCGGCATTC-3'), die mit Digoxigenin-markierten Primern hergestellt wurde, konnte die Hybridisierung durchgeführt und anschließend durch Chemilumineszenz sichtbar gemacht werden.

## 2.3 Histochemische Untersuchungen

Wegen unterschiedlicher Literaturangaben zu Apoptose-Raten von Herzmuskelzellen in explantierten Herzen und einer erforderlichlich höheren Sensitivität und Spezifität des Apoptosenachweises wurde in der vorliegenden Arbeit versucht, den Apoptosenachweis zusätzlich zu den enzymatischen Kriterien mit typischen morphologischen Kriterien zu führen (Narula et al. 1996; Anversa et al. 1997; Olivetti et al. 1997; Narula et al. 1998; Kanoh et al. 1999). Antikörper-Daten sind der *Übersicht 6* zu entnehmen.

### 2.3.1 Gewebeaufbereitung

Das entnommene Herzmuskelgewebe wurde anhand standardisierter Schritte für die unterschiedlichen immunzytochemischen Verfahren aufbereitet. Nach der bioptischen Entnahme wurde das Gewebe unmittelbar in 5% igem Paraformaldehyd fixiert, anschließend

über eine aufsteigende Alkoholreihe dehydriert und in Eponharz eingebettet. Zur Weiterverarbeitung wurde das eingebettete Gewebe für ca. 14 Tage ausgehärtet und danach mit einem Reichert Ultracut Mikrotom semidünn auf 1µm geschnitten (Aschoff et al. 1996; Aschoff et al. 2000). Von jedem Patient wurden primär 20 Folgeschnitte mit je 1µm angefertigt. Das Entharzen der Schnitte wurde mit methanolischer NaOH für zwei Minuten erzielt. Die Überführung des Gewebes in PBS erfolgte über Methanol-Benzol und zweimal Aceton jeweils zwei Minuten. Nachfolgend wurden die Schnitte zweimal für zehn Minuten in PBS gespült.

### 2.3.2 Tunel-Methode

Aschoff et al. (1996) beschrieben zum Nachweis von DNA-Strangbrüchen eine hochempfindliche „BrdU in situ nick end labeling-Methode“ (ISEL). Hierbei wird Bromdesoxyuridin (BrdU) durch eine terminale Transferase enzymatisch mit den freien OH-Enden der apoptotischen DNA-Strangbrüche verbunden. Durch nachfolgende Präzipitation kann das angefügte BrdU immunzytochemisch durch Brücken-Antikörper nachgewiesen werden (Aschoff et al. 1996). *Übersicht 5* zeigt den schematischen Aufbau der Tunel-Reaktion.

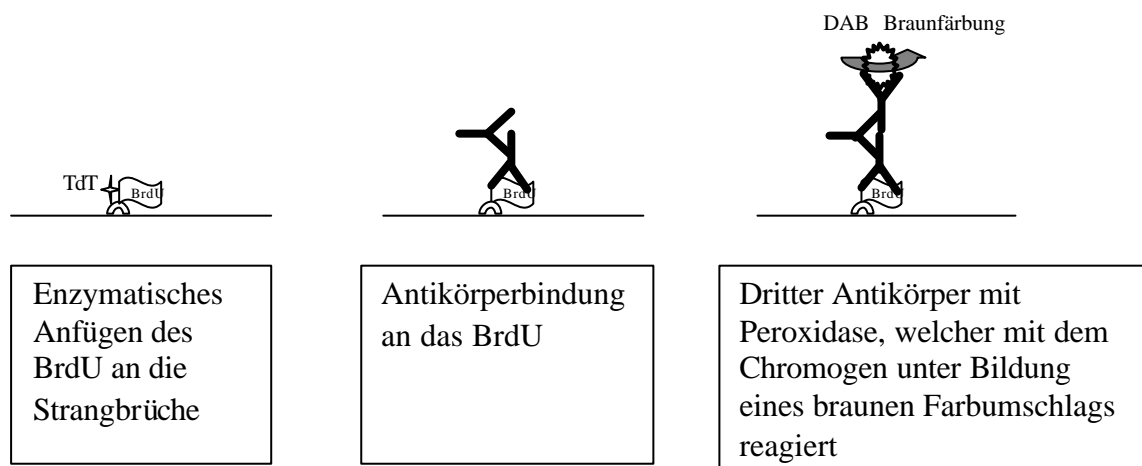
#### *Procedere zum Nachweis von DNA-Fragmentation in Herzmuskelzellen*

- Entharzen
- Waschen mit PBS, 2 mal je 10 min
- Inkubation mit Apo-Mix für 1 Stunde bei 37°C
  - *Apo-Mix (420µl):*
    - 4µl terminale Transferase (TdT)
    - 8µl TdT-Puffer
    - 3µl CoCl<sub>2</sub>
    - 2µl BrdU
    - 400µl PBS
- Waschen mit PBS, 2 mal je 10 min
- Präinkubation mit normal goat Serum, Verdünnung 1:5 für 30 min bei Raumtemperatur (RT)
- Abpipettieren
- Inkubation mit dem Anti-BrdU-Antikörper [mouse monoclonal antibody, Progen Heidelberg] für 12 Stunden bei 4°C
- Waschen mit PBS, 2 mal je 10 min

- Inkubation mit Anti-mouse-Antikörper [goat monoclonal antibody, Sigma] für 30 min bei RT, 1:100
- Waschen mit PBS, 2 mal je 10 min
- Inkubation mit Peroxidase-Anti-Peroxidase-Komplex [mouse-monoclonal-PAP, Sigma] für 30 min bei RT, 1:100
- Waschen mit destilliertem Wasser, 2 mal je 10 min
- Inkubation der Schnitte mit Diaminobenzidin (DAB) für 15 min bei RT
- Waschen mit destilliertem Wasser, 2 mal je 10 min

Nach der DAB-Färbung wurden die Schnitte über eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert und mit Entellan eingedeckelt.

#### Übersicht 5: Schematische Darstellung der Tunel-Reaktion



### 2.3.3 Transglutaminase-Färbung

Die tTG-Färbung wurde an unmittelbaren Folgeschnitten der Tunel-Methode durchgeführt.

#### Procedere zum Nachweis von tissue Transglutaminase (tTG) in Herzmuskelzellen

Die Vorbehandlung der Schnitte wie Fixation, Einbetten in Eponharz, Schneiden und Entharzen erfolgte entsprechend den schon beschriebenen Behandlungsschritten.

- Inkubation mit tTG-Antikörper [goat polyclonal antibody, Upstate] bei einer Verdünnung von 1:2000 mit 1%igem rabbit normal Serum für 24 Stunden bei 4°C
- Waschen mit PBS, 2 mal je 10 min

- Inkubation mit biotinyliertem Anti-goat-Antikörper [rabbit monoklonal antibody, Vector] für 1 Stunde bei RT, 1:200
- Waschen mit PBS, 2 mal je 10 min
- Inkubation mit Avidin HRP bei für 1 Stunde bei RT, 1:200
- Waschen mit destilliertem Wasser
- Inkubation der Schnitte mit DAB für 15 min bei RT

Nach DAB Färbung wurden die Schnitte 2 mal 10 min in destilliertem Wasser gewaschen, über eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert und mit Entellan eingedeckt.

### **2.3.4 Aktin-Färbung**

Zur eindeutigen Identifikation wurden die Zellen an Folgeschnitten mit einer Aktin-Färbung dargestellt.

#### **Procedere zur $\alpha$ -Aktin-Färbung in Herzmuskelzellen**

Die Vorbehandlung der Schnitte wie Fixation, Einbetten in Eponharz, Schneiden und Entharzen erfolgte gemäß den oben genannten Behandlungsschritten.

- Präinkubation mit normal goat Serum, Verdünnung 1:5 für 30 min bei Raumtemperatur (RT)
- Waschen mit PBS, 2 mal je 10 min
- Inkubation mit dem Anti- $\alpha$ -Actin-Antikörper [mouse monoclonal antibody, Dako und Sigma] für 12 Stunden bei 4°C, 1:100
- Waschen mit PBS, 2 mal je 10 min
- Inkubation mit Anti-mouse-Antikörper [goat monoclonal antibody, Sigma] für 30 min bei RT, 1:100
- Waschen mit PBS, 2 mal je 10 min
- Inkubation mit Peroxidase-Anti-Peroxidase-Komplex [mouse-monoclonal-PAP, Sigma] für 30 min bei RT, 1:100
- Waschen mit destilliertem Wasser
- Inkubation der Schnitte mit DAB

Weiteres Vorgehen wie beschrieben.

### **2.3.5 Fluoreszenzmikroskopie**

In verschiedenen histologischen und klinischen Arbeiten wurde eine Eigenfluoreszenz von Muskelgewebe beschrieben (Yamani et al. 2000). Diese Beobachtungen konnten in unseren Voruntersuchungen bestätigt werden. Für die Fluoreszenzanalysen wurden die Semidünnschnitte unter dem Mikroskop (Olympus BX 50) mit der Wellenlänge von 440 nm angeregt.

Durch die Eigenfluoreszenz der Myozyten können Aussagen zur Zell- und Membranintegrität, zum Vorhandensein eines ungefärbten bzw. angeschnittenen gesunden Zellkerns und zum Fibrillenverlust gemacht werden. Mit dieser Methode konnten vorhandene Myozyten vom umgebenden Gewebe und von inflammatorischen Zellen differenziert werden.

#### **Procedere zur Fluoreszenzmikroskopie in Herzmuskelzellen**

Zur fluoreszenzmikroskopischen Beurteilung der Myozyten wurden sowohl ungefärbte als auch kerngefärbte Schnitte benutzt. Die Vorbehandlung bzw. die Färbung der Schnitte wurde nach den vorstehend beschriebenen Schritten durchgeführt.

### **2.3.6 Transmissions-Elektronenmikroskopie (EM)**

Zur Bestätigung der angewandten Methodik auf ultrastrukturellem Niveau wurde bei Patienten mit einer hohen Apoptose-Rate eine Transmissions-Elektronenmikroskopie durchgeführt.

Hierbei wurden die Schnitte einer morphologischen Auswertung und einer Folgeschnittauswertung zugeführt. In einem primären Screening wurden die EM-Schnitte auf das Auftreten von ultrastrukturellen, apoptosetypischen Veränderungen untersucht.

Bei gelungenem Nachweis wurde versucht, diese Beobachtungen durch TUNEL- und tTG-Färbungen zu belegen. Da TUNEL- bzw. tTG-gefärbte Schnitte für eine EM-Betrachtung ungeeignet sind, wurden für die Identifizierung gleicher Areale deren unmittelbare Folgeschnitte herangezogen. Identische Areale konnten anhand ihres morphologischen Erscheinungsbildes bei 1200- bzw. 3300fachen Vergrößerung einander zugeordnet werden. Auffällige Veränderungen auf ultrastruktureller Ebene wurden weiterführend bei einer 4000- bis 13000fachen Vergrößerung untersucht (Kerr et al. 1972).

### **Procedere an Tunnel- Folgeschnitten zur Gewinnung von Ultradiünnschnitten zur EM**

- Schneiden der Epon-eingebetteten Biopsien mit einem Reichert-Mikrotom auf 70nm zu Ultradiünnschnitten
- Nachkontrastierung in wässrigem 5% Uranylacetat für 20min bei RT
- Inkubation mit Bleicitrat nach Reynolds für 2 min bei RT

#### **2.3.7 Kontrollen**

Positivkontrollen wurden bei jeder Tunnel- und tTG- Färbung mittels mitgeführten Dünndarm-Semidünnschnitten der Maus angefertigt. Aufgrund der Tatsache, dass im Darmgewebe gewöhnlich DNA-Fragmentation in einer typischen Verteilung von basal nach apikal zu finden ist, konnte anhand des hier ausgebildeten Verteilungsmusters die durchgeführte Färbung beurteilt werden.

Durch Weglassen des primären Antikörpers oder der terminalen Transferase bei der Tunnel-Färbung wurden Negativkontrollen erstellt. Hämalaun-Eosin-Färbungen erfolgten zur Kontrolle der quantitativen Beurteilung der angeschnittenen Zellkerne und Zellen.

#### *Übersicht 6: Verwendete Antikörper und Materialien*

##### *Primäre Antikörper*

Anti-alpha-sacromeric-actin antibody, mouse monoclonal, Sigma St.Louis, USA

Anti-human-actin antibody, mouse monoclonal, Dako Carp., USA

Anti-BrdU antibody, mouse monoclonal, Progen Heidelberg, Germany

Anti-transglutaminase type II antibody, goat polyclonal, Upstate NY, USA

##### *Sekundäre Antikörper*

Anti-mouse antibody, goat monoklonal, Sigma St.Louis, USA

Anti-goat-antibody, rabbit biotinyliert, Vector Burlingame, USA

##### *Tertiäre Antikörper*

Mouse-Peroxidase Anti-Peroxidase Complex, mouse monoclonal, Sigma St.Louis, USA

Horseredish Peroxidase Streptavidin-Complex, Vector Burlingame, USA

Avidin-HRP-Komplex, Vector Burlingame, USA

##### *Chromogen*

DAB fast, Peroxidase Substrate Tablet Set, Sigma St.Louis, USA



### *Enzyme*

Terminale Transferase, calf thymus, Boehringer Mannheim GmbH

## **2.4 Auswertung**

Von jedem, in die Untersuchung eingeschlossenen Patienten, wurden 10 auswertbare Semidünnschnitte angefertigt. Ohne vorherige Kenntnis des Viren-Status und der hämodynamischen Parameter wurden die Schnitte blind von einem unabhängigen Betrachter beurteilt und ausgezählt.

### **2.4.1 Morphologische Auswertung (Qualitativ)**

Die morphologische Auswertung erfolgte an einem Olympus Mikroskop (BX 50) unter 400 bzw. 1000-facher Vergrößerung. Interferenz-Kontrast- und Fluoreszenzmikroskopie wurden zur Identifikation der Myozyten hinzugezogen. Die morphologische Beurteilung der Tunel-, tTG- und Aktin-Färbung erfolgte an unmittelbaren Folgeschnitten.

Im folgenden sind die zur Identifizierung herangezogenen morphologischen Kriterien der Zellen aufgeführt.

#### **Intakter Myozyt**

- Unversehrtheit der Zellmembran
- Keine Anzeichen einer Lyse
- Keine DNA-Fragmentierung
- Kein Fibrillenverlust
- Normale Eigenfluoreszenz

- Ultrastrukturell homogenes Zytosol, keine Chromatinkondensation oder Membraneinbuchtungen.

### **Apoptotischer Myozyt**

- DNA-fragmentierter Kern
- Positive tTG-Färbung bei über 50% der Zellanschnittsfläche der identischen Zellen im Folgeschnitt
- Morphologische Intaktheit der Zellmembran
- Keine Anzeichen einer Lyse
- Ultrastrukturelle apoptosetypische Veränderungen

### **Nekrotischer Myozyt**

- Zellschwellung
- Zellmembrandefekt
- Anzeichen einer Lyse
- DNA-Fragmentation
- Typische ultrastrukturelle Veränderungen

### **Fibrillenverlustbewertung**

- Morphologische Intaktheit der Zellmembran
- Keine Anzeichen einer Lyse
- Reduzierte Eigenfluoreszenz der Myofibrillen
- Sichtbarer Fibrillenverlust

#### **2.4.2 Morphologische Auswertung (Quantitativ)**

Die quantitative Auswertung der Semidünnschnitte erfolgte auch hier mit einem Olympus BX 50-Mikroskop. Unter 400-facher Vergrößerung und Zuhilfenahme des Differential-Interferenz-Kontrastes (DIC) wurden Myozyten mit DNA-fragmentierten Kernen und einem Myofibrillenverlust mit konsekutiver tTG-Färbung von über 50 % Zellanschnittfläche identifiziert und in einem definierten Feld von 0,32 mm Länge und 0,21 mm Breite, entsprechend einer Fläche von 0,067 mm<sup>2</sup> (Frame) ausgezählt.

Aufgrund der Eigenfluoreszenz gelang die exakte Identifizierung sowie Differenzierung der Myozyten im UV-Licht. Das umgebende Bindegewebe wie auch die infiltrierten Entzündungszellen, die auch DNA-fragmentiert sind, konnten dadurch ermittelt und aus der Auswertung eliminiert werden.

Um die gesamte Fläche eines Gewebeschnittes zu erfassen, mussten 5 bis 15 Frames pro Semidünnschnitt ausgezählt werden. Für jeden Patient sollten durchschnittlich 6 Folgeschnitte zur Auszählung herangezogen werden.

### 2.4.3 Bestimmung der Apoptose-Rate

Folgende Parameter wurden für jeden Semidünnschnitt erhoben:

- Gesamtzahl der angeschnittenen Zellen pro Frame (Zelldichte)
- Gesamtzahl der angeschnittenen Myozytenkerne pro Frame (Kerndichte)
- Anzahl der DNA-fragmentierten, angeschnittenen Myozytenkerne pro Frame
- Anzahl der apoptotisch definierten Myozyten pro Frame (Kombination aus DNA-Fragmentierung im Kern und positiver Transglutaminase-Färbung).

Unter Berücksichtigung dieser Parameter wurde die Apoptose-Rate als Prozentsatz der apoptotisch abgegrenzten Myozyten zur Gesamtzahl der angeschnittenen Myozytenkerne pro Frame definiert.

$$\text{Apoptose-Rate [\%]} = \frac{\text{Myozyten mit Kernfragmentierung + simult. tTG-Nachweis}}{\text{Gesamtzahl der Myozytenkerne}} \times 100$$

Die Fragmentations-Rate wurde ebenfalls entsprechend den obigen Angaben berechnet.

$$\text{Fragmentations-Rate [\%]} = \frac{\text{Myozyten mit Kernfragmentierung}}{\text{Gesamtzahl der Myozytenkerne}} \times 100$$

### 2.4.4 Statistische Auswertung

Fortlaufende Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  SD (Standardabweichung), absolute Daten wurden als relative Häufigkeiten in Prozent angegeben.

Zum Vergleich der Enterovirus-positiven und Enterovirus-negativen Gruppen wurde der ungepaarte Student-*t*-Test und der chi- bzw. Fischer-Test angewandt.

Ein Zusammenhang zwischen Hämodynamik und Apoptose-Index wurde anhand Spearman-Rang-Correl überprüft. Statistisch signifikant waren Werte bei einem p-Wert unter 0,05.

## Ergebnisse

### 3.1 Allgemeine histologische und histochemische Auswertung

#### DNA-Fragmentation der Herzmuskelzellen (Tunel-Methode)

Fragmentierte DNA der Herzmuskelzellen wurde in dieser Arbeit mit der BrdU-Tunel-Methode nach Aschoff et al. (1996) nachgewiesen. Hierbei zeigte ein Teil der Myozyten DNA-Fragmentierung. Die morphologische Beurteilung mit hochauflösender Interferenz-Kontrast-Mikroskopie (DIC) erfasste bei den Schnitten eine spezifische Bindung der Immunpräzipitate im Zellkern sowie eine Anfärbung eingewanderter Entzündungszellen. Beim Vergleich der angefärbten Herzmuskelzellen zeigten diese eine graduierte Intensität der Kernfärbung. Oberflächen der Kerne mit intensiver Färbung stellten sich im Interferenz-Phasen-Kontrast (DIC) deutlich unregelmäßiger dar als Oberflächen von Kernen mit einer geringeren Farbintensität (Bildertafel 1; Abb.1-2).

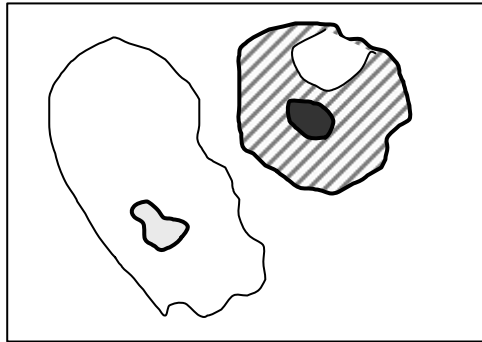
In den mitgeführten Negativkontrollen konnte keinerlei Immunreaktivität ermittelt werden. Die Positivkontrollen bildeten das für Darmgewebe typische Verteilungsmuster aus (Aschoff et al. 1996) (Bildertafel 1; Abb. 3).

#### Transglutaminase-Färbung (tTG)

An den direkten Folgeschnitten der Tunel-Methode konnte das proapoptotische Enzym Transglutaminase Typ II in Myozyten nachgewiesen werden. TTG-Immunpräzipitate fanden sich immer im Zytoplasma der betroffenen Zellen, in einigen Fällen auch in ihrem Kern (Bildertafel 2; Abb.1-3). Da in Endothelzellen und Bindegewebe tTG Expression physiologisch stattfindet, wurden diese ebenfalls bei der tTG-Färbung erfasst.

Vergleicht man die Tunel-gefärbten Schnitte mit den tTG-gefärbten Schnitten, zeigt ein Teil der Myozyten mit einer positiven Tunel-Reaktion eine simultane zytoplasmatische tTG-Färbung im Folgeschnitt. Zellen mit angeschnittenem, unfragmentiertem, gesundem Zellkern wiesen jedoch niemals eine positive tTG-Färbung auf. Weiterhin fanden sich Kardiomyozyten mit isolierter DNA-Fragmentation, die jedoch keine simultane tTG-Färbung zeigten.

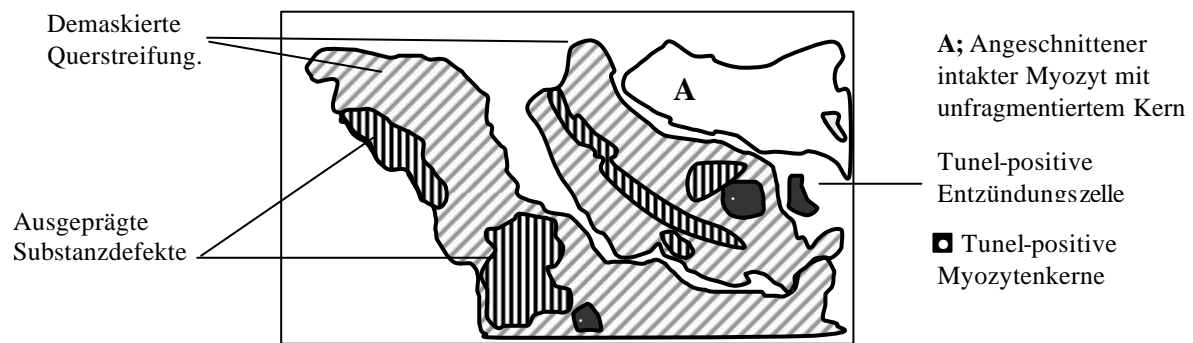
*Schema zu Bildertafel 1; Abb. 1*

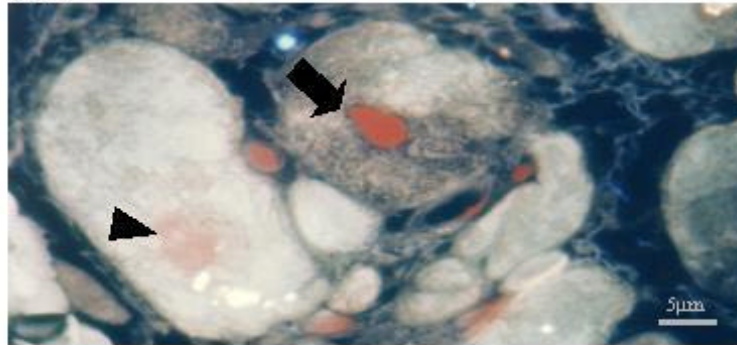
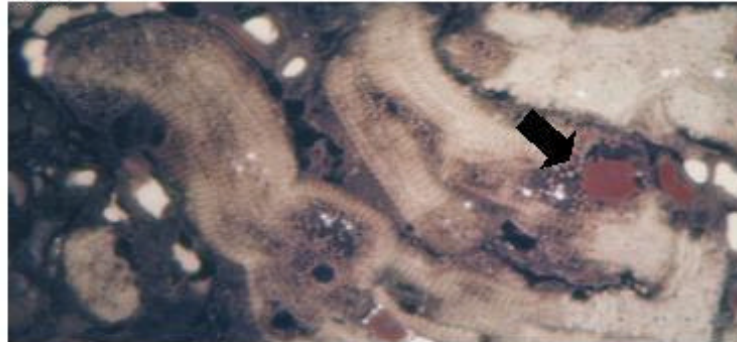
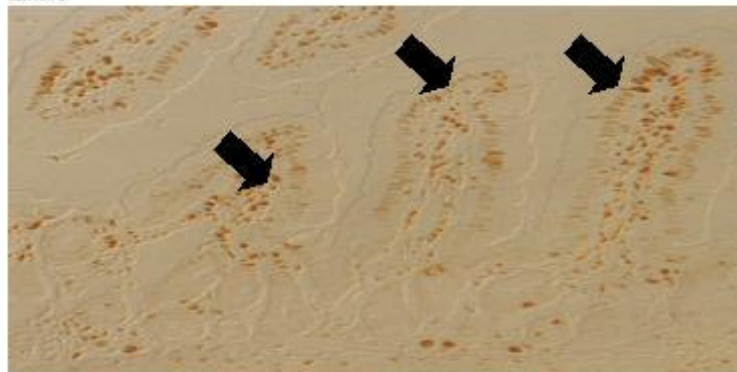


Links: Myozyt mit intaktem Zytosol, ausgeprägter Eigenfluoreszenz und unfragmentiertem Kern.

Rechts: Geschädigter Myozyt mit Tunel-positivem Kern und ausgeprägtem Myofibrillenverlust, welcher als Fluoreszenz-Defekt im UV-Licht auffällig war (gestreifte Fläche). In der weißen Fläche ist die ursprüngliche Fluoreszenz noch zu erkennen

*Schema zu Bildertafel 1; Abb. 2*



**Abb. 1****Abb. 2****Abb. 3**

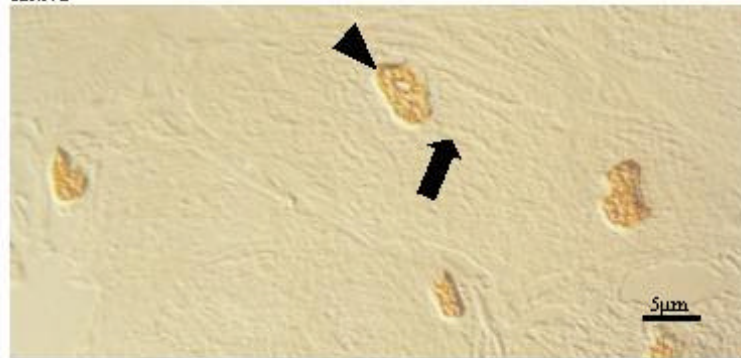
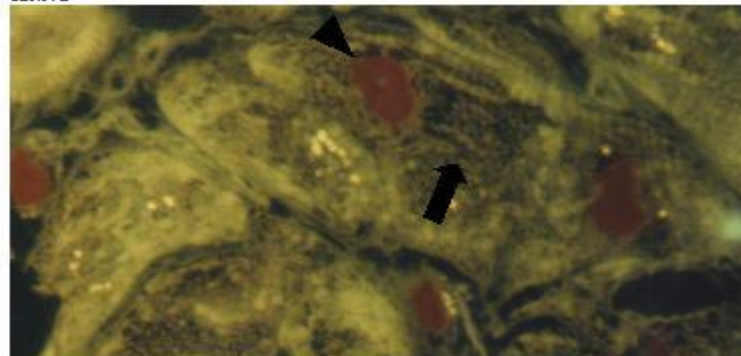
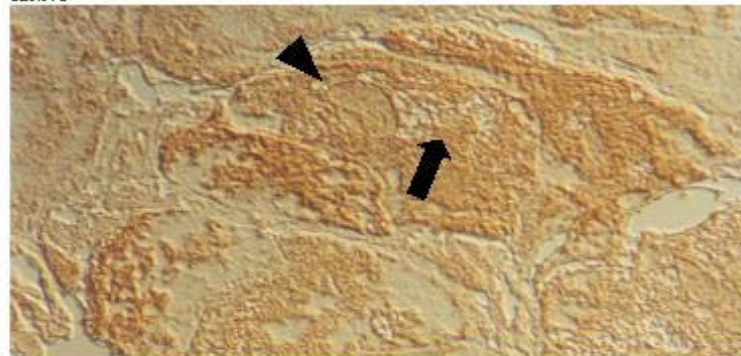
### Bildertafel 1

**Abb.1-3:** (Vergrößerung 1000 bzw. 400fach)

**Abb.1:** Intakter Myozyt (Dreieck) mit unfragmentiertem Kern und geschädigter Myozyt (Pfeil) mit TUNEL-positivem Kern unter UV-Licht.

**Abb.2:** Längs angeschnittene Myozyten mit positiver TUNEL-Reaktion (Pfeil) und deutlicher Demaskierung und Zerstörung intrazellulärer Strukturen in der Fluoreszenz-Mikroskopie.

**Abb.3:** Kontrollschnitt. Typisches Verteilungsmuster der TUNEL-positiven Zellen (Pfeile) im Darmgewebe der Maus.

**Abb. 1****Abb. 2****Abb. 3****Bildertafel 2**

**Abb.1-3:** Immunhistochemische Darstellung eines als apoptotisch definierten Myozyten (Vergrößerung 1000fach).

**Abb.1-2:** Darstellung mit TUNEL-Methode in DIC- und Fluoreszenz-Mikroskopie.

**Abb.3:** TTC-Färbung im Folgeschnitt.

Kernfragmentierung (Abb.1, Dreieck) findet sich in derselben Zelle, die ausgeprägte Fluoreszenz-Defekte (Abb.2, Pfeil) und intensive TTC-Färbung im Kern (Abb.3, Dreieck) und Zytosol (Abb.3, Pfeil) aufweist.



## **Aktin-Färbung**

In Semidünnschnitten, welche mit Aktin-Antikörpern angefärbt wurden, zeigten einzelne Myozyten eine intensive, perinukleäre Färbung des Zytoplasmas. Die eigentlich zu erwartende gleichmäßige Färbung aller Herzmuskelzellen mit dem Aktin-Antikörper konnte überraschenderweise nicht erreicht werden. Während manche Myozyten eine intensive Aktin-Färbung aufwiesen, wurden andere nur schwach oder gar nicht angefärbt.

Beim Vergleich der einzelnen Folgeschnitte mit den verschiedenen Färbungen war auffällig, dass Zellen mit Nachweis von DNA-Fragmentation und tTG-Färbung eine vielfach intensivere Aktin-Färbung zeigten als Zellen mit negativer TUNEL- und tTG-Färbung. Eine geringe Aktin-Färbung wurde bei Zellen mit lediglich schwacher oder fehlender DNA-Fragmentation und tTG-Färbung gefunden (Bildertafel 3; Abb.1-4).

## **Autofluoreszenz und Myofibrillenverlust der Myozyten**

Unter UV Licht der Wellenlänge 440 nm (blau) war es möglich, Zellstrukturen der Myozyten so anzuregen, dass diese eine Autofluoreszenz erzeugten (Bildertafel 1; Abb. 1-2). Ungefärbte Kontrollschnitte mit intakten Herzmuskelzellen zeigten ebenfalls eine intensive Autofluoreszenz der zellulären Strukturen.

Vergleicht man die verschiedenen Zellen mit Fluoreszenz-Defekt, so ergibt sich eine Graduierung in dessen Ausprägung bis hin zur fehlenden Nachweisbarkeit. Trotz fließender Übergänge empfiehlt sich eine Einteilung der untersuchten Myozyten in drei Basisgruppen (Bildertafel 4; Abb.1-6).

A) *Myokardzellen ohne Defekt*. Diese zeigten eine starke Eigenfluoreszenz, durch die das typische Muster der kontraktilen Elemente im UV Licht größtenteils überstrahlt wurde (Bildertafel 1; Abb. 1 und Bildertafel 4; Abb.1-6). Zellgrenzen und Zytosol zeigten sich intakt.

B) *Myokardzellen mit geringem Defekt*. Bei Myozyten dieser Gruppe war ein Nachweis vollkommen intakter zellulärer Strukturen nicht möglich. Zellmembranen und Zellgrenzen waren jedoch noch intakt (Bildertafel 4; Abb.1-6).

C) *Geschädigte Myokardzellen*. Bei dieser Fraktion war das Synzytium sichtlich zerstört, teilweise waren die Zellen aus dem Zellverband herausgelöst. Das typische streifenförmige Muster der kontraktilen Elemente sowie die zytosolische Architektur der Zellen war mitunter demaskiert und sichtbar. Das Nebeneinander von ausgeprägtem Fluoreszenz-Verlust, demaskierten Zellstrukturen und Substanzdefekten war charakteristisch für diese Gruppe (Bildertafel 1; Abb.2 und Bildertafel 4; Abb.1-6).

### Aktin-, Tunel- und tTG-Färbung an unmittelbaren Folgeschnitten

Durch die Semidünnschnitt-Technik war es möglich, die verschiedenen Marker in ein und derselben Zelle zu beurteilen. Im Vergleich dieser zeigte sich ein simultanes Auftreten der Tunel-, tTG- und Aktin-Färbung in betroffenen Myozyten (Bildtafel 4; Abb.1-6).

Betrachtet man die zuvor beschriebenen Gruppen, so konnte bei Myozyten ohne Fluoreszenz-Defekt (*Gruppe A*) kein Hinweis einer Kernfragmentierung und Transglutaminase-Expression gefunden werden. Eine intensive Eigenfluoreszenz der Zellanschnittfläche, ein intakter Zellkern und eine schwache Aktin-Färbung waren für diese Myozyten charakteristisch (Bildtafel 1 bis 4).

Zellen mit geringen Fluoreszenz-Defekten (*Gruppe B*) zeigten ebenfalls eine schwache tTG- und Aktin-Färbung. Die angeschnittenen Kerne waren jedoch häufig fragmentiert.

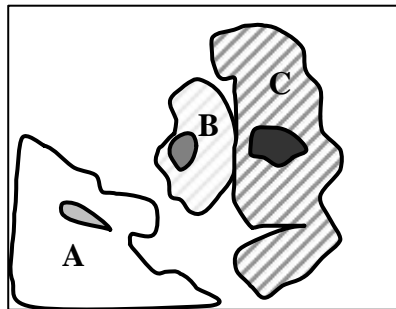
Herzmuskelzellen mit einer deutlich reduzierten Eigenfluoreszenz (*Gruppe C*) zeigten dagegen eine ausgeprägte Kernfragmentierung mit simultanem tTG- und Aktin- Nachweis.

Erstaunlicherweise konnten dabei die Immunpräzipitate der verwendeten Antikörper an den identischen Lokalisationen im Zytosol nachgewiesen werden (Bildtafel 1 bis 4).

*Schema zu Bildertafel 4; Abb. 1-6*

Gruppe A  
Myozyt mit ausgeprägter  
Fluoreszenz, ohne positive  
tTG- und Aktin-Färbung

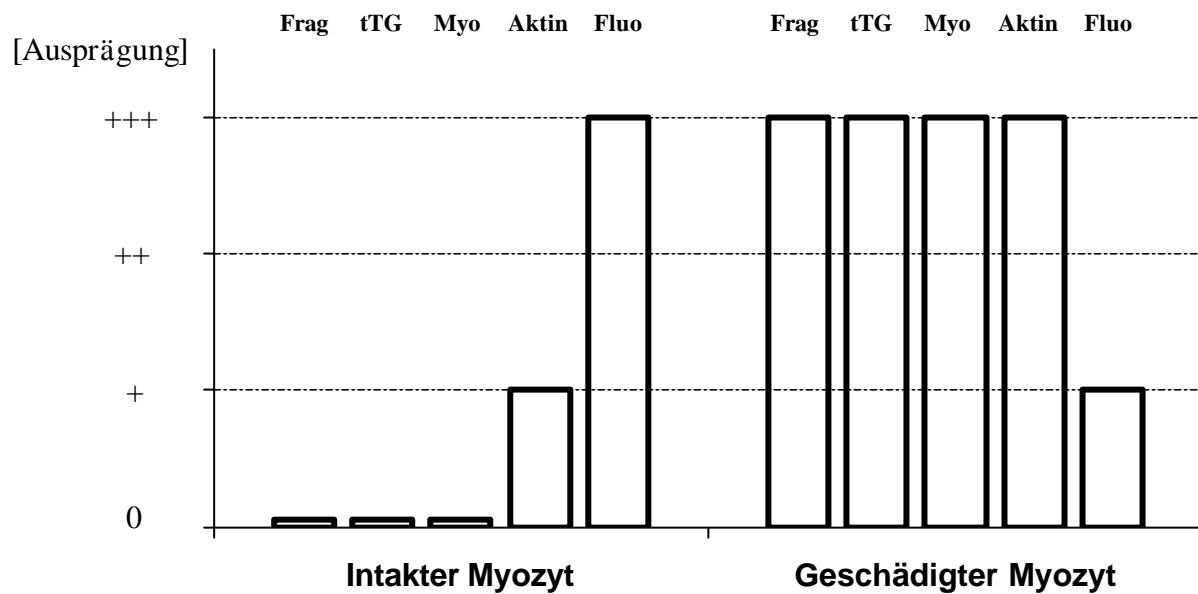
Gruppe B  
Myozyt mit leicht  
fragmentiertem Kern und  
gering ausgeprägter tTG-  
bzw. Aktin-Färbung



Gruppe C  
Myozyt mit  
fragmentiertem Kern,  
Myofibrillen-verlust,  
starker tTG- und Aktin-  
Färbung.

Trägt man zum Vergleich der verschiedenen Myozyten die unterschiedlichen Ausprägungen (keine Ausprägung = 0; starke Ausprägung = +++ ) der Farb-Intensitäten auf, so ergibt sich für intakte (Gruppe A) und geschädigte (Gruppe C) Myozyten folgendes *Schaubild 1*.

*Schaubild 1*: Zusammenfassung der histologischen und histochemischen Bewertung



Frag : DNA-Fragmentation

Myo : Myofibrillenverlust

tTG : Transglutaminase-Färbung

Fluo : Autofluoreszenz

Aktin : Aktin-Färbung

Abb. 1

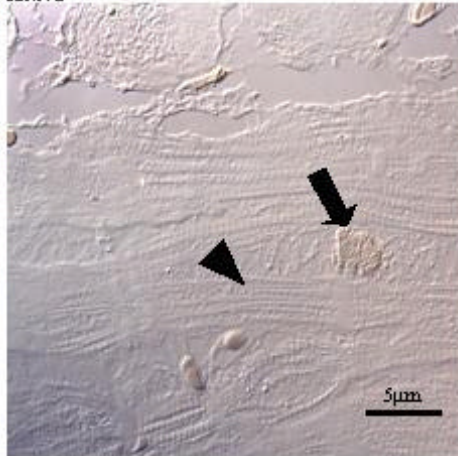


Abb. 2

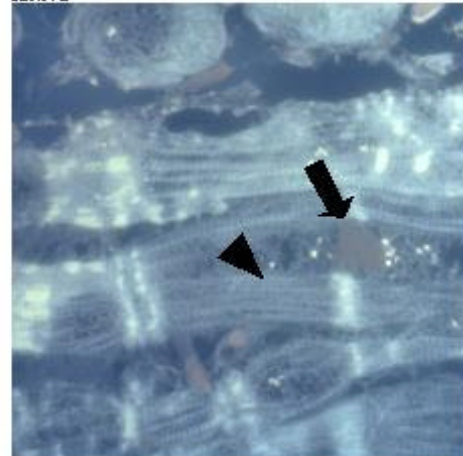


Abb. 3

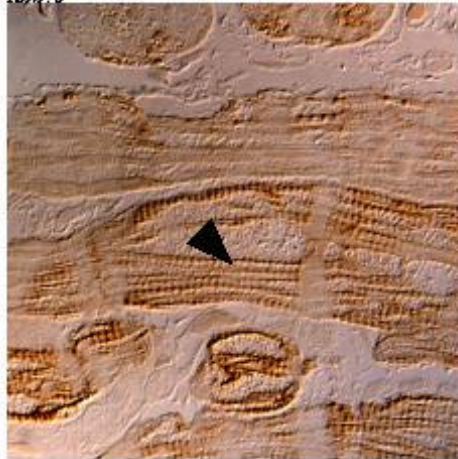
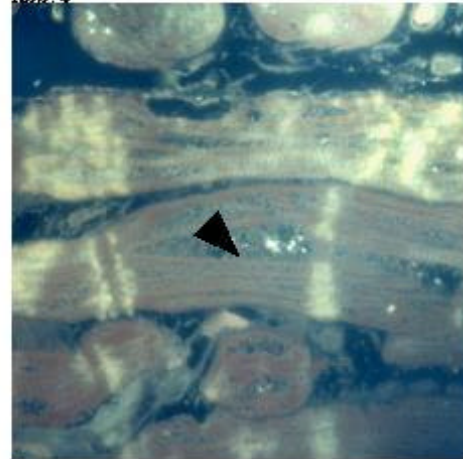


Abb. 4



### Bildertafel 3

**Abb.1-4:** Apoptotische Herzmuskelzellen in konsekutiven Myokard-Folgeschnitte (1µm) eines DCM-Patienten. Es findet sich eine positive Tunel-Reaktion (Pfeil) in den Kernen derselben Zelle, die mittels Aktin-Färbung identifiziert wurde (Vergrößerung 1000fach).

**Abb.1-2:** DNA-fragmentierter Herzmuskelzellkern mit positiver Tunel-Reaktion und in fluoreszenz-mikroskopischer Darstellung.

**Abb.3-4:** Aktin-Färbung mit unterschiedlichen Farbintensitäten der Myozyten unter DIC- und Fluoreszenz-Mikroskop.

Demaskierte Myofibrillen mit freigelegtem typischen Streifenmuster der kontraktiven Elemente und nachweisbarem Fluoreszenz-Defekt (Dreieck). Intakte Myozyten zeigen nur eine diskrete Anfärbung durch den Aktin-Antikörper.

Abb. 1

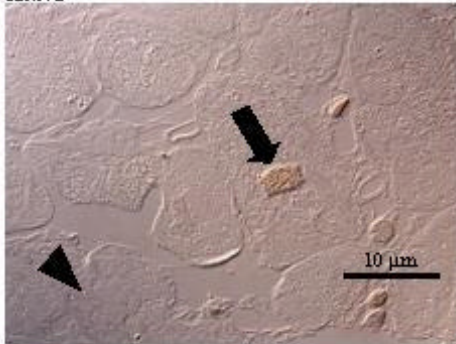


Abb. 2

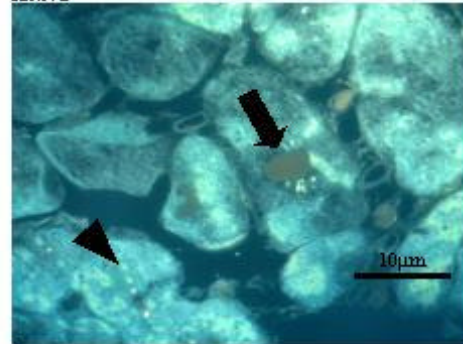


Abb. 3



Abb. 4

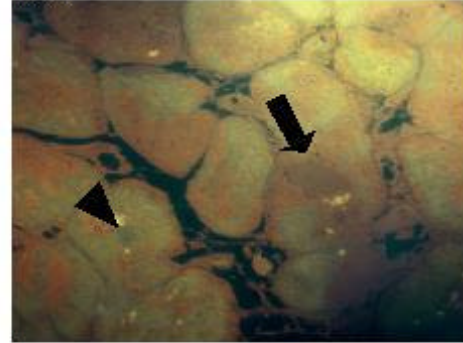


Abb. 5

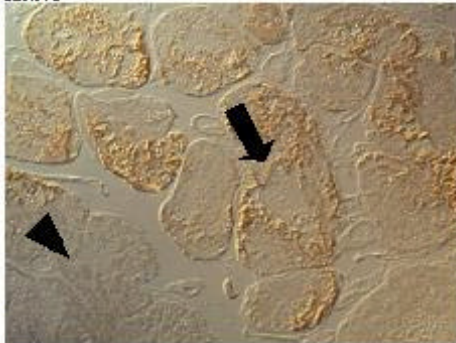
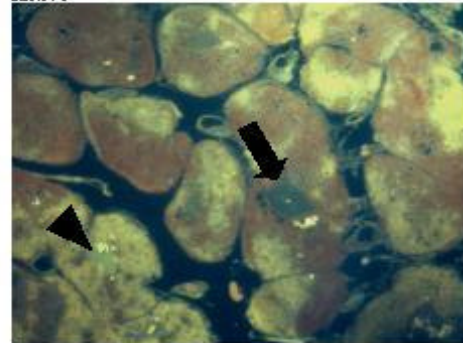


Abb. 6



#### Bildertafel 4

**Abb. 1-6:** Repräsentative immunhistochemische Darstellung der Co-Expression durch Tunel-Reaktion, tTG- und Aktin-Färbung in Kardiomyozyten von endomyokardialen Biopsien ( $1\mu\text{m}$  Folgeschnitte) (Vergrößerung 400fach).

**Abb. 1-2:** Tunel-Methode mit nachfolgender Fluoreszenzmikroskopie.

**Abb. 3-4:** Aktin-Färbung und Aktin-Fluoreszenz

**Abb. 5-6:** TTAG-Darstellung und tTG-Fluoreszenz.

Myozyt mit DNA-fragmentiertem Kern (Pfeil), Myofibrillenverlust und identischer Bindung der Aktin- bzw. tTG-Immunopräzipitate an den Stellen des Myofibrillenverlustes. Intakt erscheinender Myozyt mit angeschnittenen, unfragmentiertem Kern (Dreieck), negativer tTG- und Aktin-Färbung.

## **Transmissions-Elektronenmikroskopie (EM)**

### ***Morphologische Betrachtung***

#### ***Übersicht (1200- bzw. 3300fache Vergrößerung)***

In der Übersicht wurden sowohl morphologisch normale Zellkerne als auch Kerne mit deutlichen Merkmalen von Apoptose gefunden. Normale Kerne waren durch ein homogenes Zytoplasma, regelmäßige Zellkompartimente und normale Chromatinmorphologie gekennzeichnet. Kerne mit apoptosetypischen Veränderungen wiesen unregelmäßige Kern- und Zelloberflächen und verdichtetes Chromatin in der Übersichtsbetrachtung auf.

#### ***Ultrastrukturelles Niveau (4000- bzw. 13000fache Vergrößerung)***

Zellen mit morphologisch normalen Kernen zeigten auch in der Strukturanalyse intakte Zellmembranen und -grenzen. Hierbei waren Zellorganellen und kontraktile Elemente vollständig (Bildertafel 5; Abb.1-2).

Myozyten mit auffälliger Kernmorphologie wiesen dagegen typische ultrastrukturelle Apoptosemerkmale auf. Die Zelloberfläche gestaltete sich hier unregelmäßig mit deutlichen Einbuchtungen und Abschnürungen. Morphologisch waren die betroffenen Myozyten „unruhig“, kondensiert und inhomogen, was für das „Boiling-“ oder „Blebbing-Stadium“ kennzeichnend ist. Das Kernchromatin war ebenfalls kondensiert und inhomogen, mit erhöhter Konzentration in Arealen von Membraneinbuchtungen. Die ultrastrukturelle Ordnung dieser Myozyten war aufgehoben, myofibrillenfreie Defekte waren sichtbar und ein Myofibrillenverlust konnte beobachtet werden. Die Zellkompartimente und Zellorganellen erschienen verkleinert (Bildertafel 5; Abb.3-4).

### ***EM-Folgeschnittanalyse***

In der EM-Folgeschnittbetrachtung wurden Myozyten mit positiver TUNEL-Reaktion und simultanem tTG-Nachweis (*Gruppe C*) auf ultrastrukturelle apoptosetypische Kriterien hin untersucht. Durch EM-Beurteilung unmittelbarer Folgeschnitte von TUNEL und tTG-gefärbten Schnitten konnten elektronenmikroskopisch Zellkerne identifiziert werden, die eine Kernfragmentierung und simultane tTG-Färbung aufwiesen (Bildertafel 6; Abb.1-5).

Myozyten mit positiver TUNEL-/tTG-Reaktion im vorangegangenen Schnitt zeigten deutliche ultrastrukturelle Merkmale von Apoptose (s.o.).

Das Chromatin war bei diesen Zellen kondensiert und in auffälliger Weise an der Kernmembran (crescendoartig) und in Membraneausbuchtungen (sogen. „blebbs“) konzentriert.

Unregelmäßige und unruhige Oberflächen der Zellen mit einer konsekutiven Verkleinerung der Zellorganellen waren hierbei kennzeichnend. Zudem trat eine Auflösung der zellulären Struktur/Ordnung mit folgendem Verlust von kontraktilen Elementen in den betroffenen Myozyten auf. Auch hier waren die betroffenen Myozytenkerne dem Boiling- bzw. Blebbing-Stadium zuzuordnen (Bildertafel 6).



Abb. 1

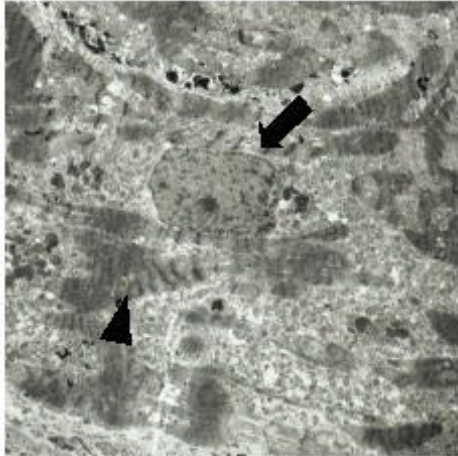


Abb. 2

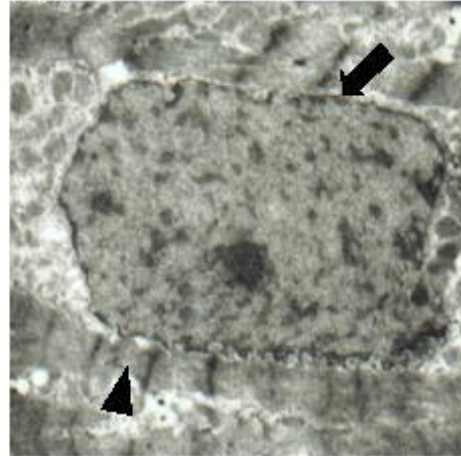


Abb. 3

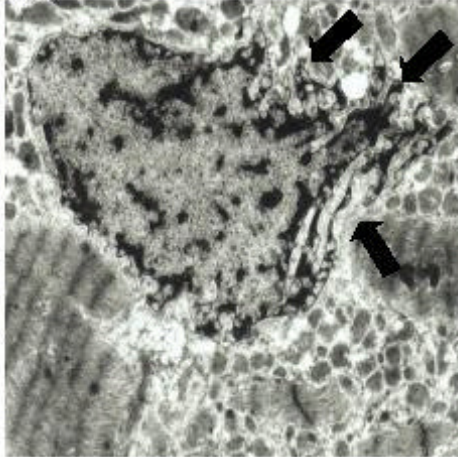
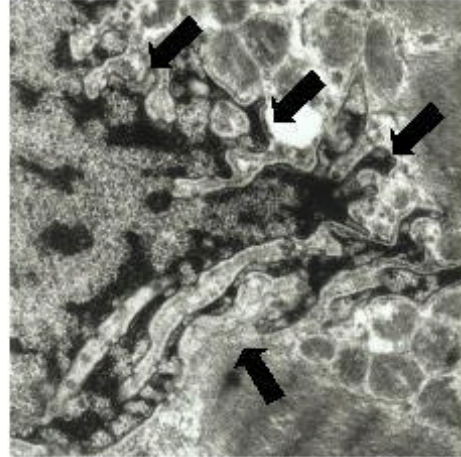


Abb. 4



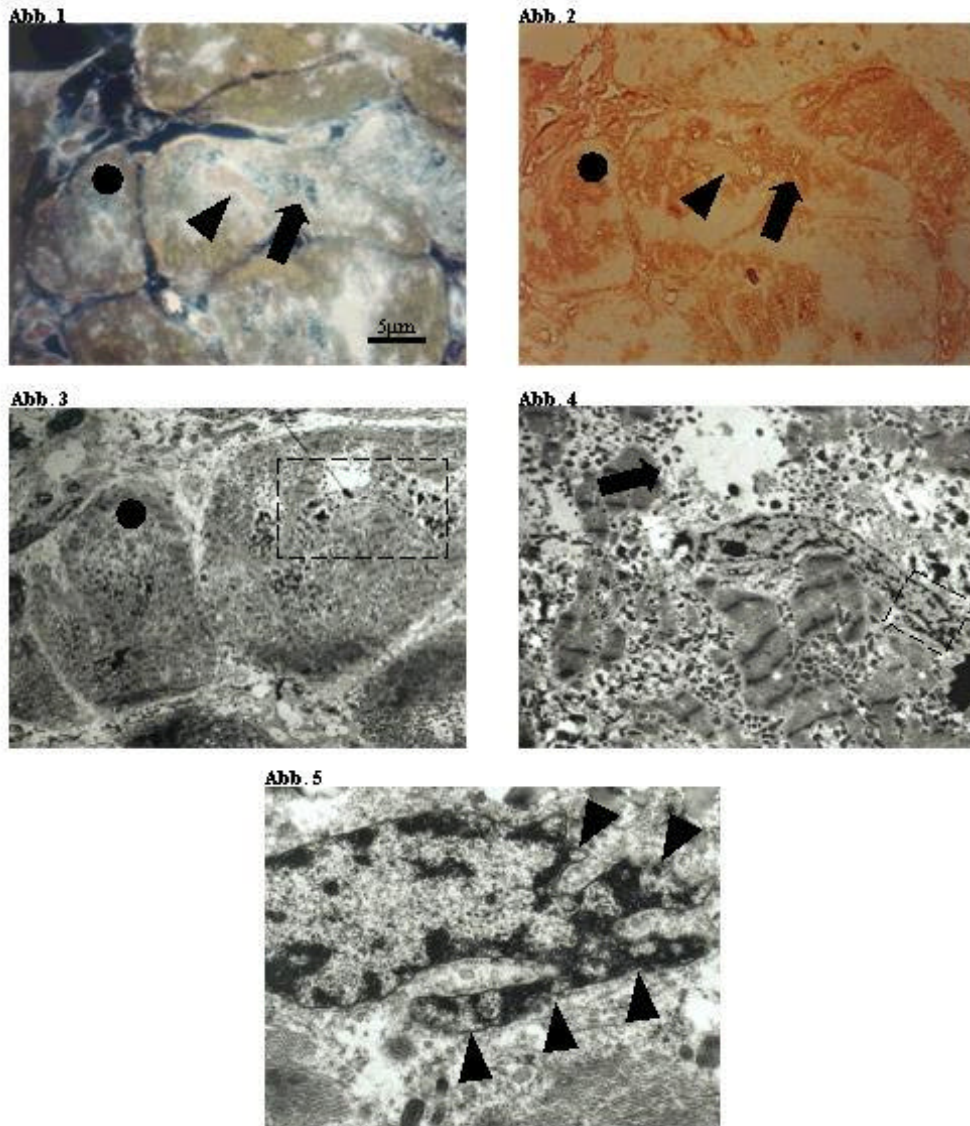
### Bildertafel 5

**Abb.1-4:** Repräsentative elektronenmikroskopische Darstellung von intakten und geschädigten myokardialen Kernen. (Verg. 3000fach, 7500fach bzw. 13000fach)

**Abb.1-2:** Intakter Myozytenkern (Pfeil). Normal imponierende Zellmembranen, längs- bzw. quergeschnittene Myofibrillen (Dreieck) mit typischer Streifung und nahezu keiner Chromatinkondensation im Kern sichtbar.

**Abb.3-4:** Myokardialer Kern in 7500facher (links) sowie 13000facher (rechts) Vergrößerung mit deutlichen apoptose-typischen Zeichen. Membranunregelmäßigkeiten, sogenannte „cell membrane blebs“ (Pfeile), tiefe Membraneinschnürungen der Kernmembran mit deutlich kondensiertem Kerninhalt (Pfeile) und vermehrte Chromatinkondensation des gesamten Kernes sind zu sehen. Morphologisch kann dieser Kern dem „Boiling- oder Blebbing-Stadium“ zugeordnet werden.





### Bildertafel 6

**Abb.1-5:** Ultrastrukturelle Darstellung eines Kardiomyozyten mit DNA-Fragmentation und simultaner tTG-Färbung an konsekutiven Folgeschnitten.

(Abb.1-2, Vergr. 1000fach, Abb.3-5 Vergr. 1500fach/7500/13000fach)

**Abb.1-2:** Simultane positive Tünel-Reaktion und tTG-Färbung desselben Myozyten.

**Abb.3-5:** Unmittelbare Folgeschnitte der obigen Zelle unter dem Elektronenmikroskop.

Herzmuskelzelle mit DNA-fragmentiertem Kern (Dreieck), simultaner tTG-Anfärbung (Pfeil) und Myofibrillenverlust (Pfeil). Elektronenmikroskopisch zeigt der Tünel- und tTG-positive Myozyt Chromatinkondensation, Membranunregelmäßigkeiten, Blebs und Einschnürungen. Dargestellt in schrittweiser Ausschnittvergrößerung der markierten Rechtecke.

## Dilatative Kardiomyopathie (DCM)

Die Ergebnisse der allgemeinen histologischen und histochemischen Auswertung ließen eine unproblematische Quantifizierung geschädigter Myozyten (*Gruppe C*) zu. Aufgrund dessen konnten Patienten mit einer DCM unter Berücksichtigung dieser histologischen Merkmale untersucht werden.

### 3.1.1 Standardanalysen und klinische Befunde

Die Diagnose einer *idiopathischen dilatativen Kardiomyopathie (DCM)* konnte bei 31 (65 %) Patienten (26 Männer, 5 Frauen; Durchschnittsalter  $50 \pm 4$  Jahre), der primär 48 aufgenommenen Patienten anhand der hämodynamischen Parameter, der klinischen Basisdaten und der Histologie bzw. Immunhistologie gestellt werden.

Von den 48 biopsierten Patienten mit Verdacht auf idiopathische DCM wurden 17 (35 %) aufgrund des Nachweises entzündlicher bzw. anderer Myokarderkrankungen oder methodischer Probleme von der Untersuchung ausgeschlossen. Einzelne Befunde sind aus *Tabelle 4* zu entnehmen.

*Tabelle 4:* Histologische Befunde der Pathologischen Institute

Histologischer Befund	Patienten (n = 48)
Dilatative Kardiomyopathie	31
Kein auswertbares Gewebe (leere/zu kleine Biopsie oder Fettgewebe)	4
Akute Myokarditis	3
Perimyokarditis	1
Chronische Myokarditis	3
Vd.a. Hypertensive Kardiomyopathie	3
Anthrazyklin assoziierte Kardiomyopathie	1
Kardiale Amyloidose	1
Vd. a. Kollagenose	1

## Virusanalyse

Die Bestimmung des viralen Status der bioptierten Kardiopathiepatienten erfolgte durch ein Enterovirus-spezifisches PCR-Verfahren mit nachfolgendem Southern-Blot im Institut für Virologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena. Hierbei konnten bei 14/31 (45%) in unsere Untersuchung eingeschlossenen Patienten ein positiver und 17/31 (55%) Patienten ein negativer Enterovirus-spezifischer Befund erhoben werden.

Die Patienten wurden aufgrund der PCR Befunde in Patienten mit Enterovirus-positiver oder Enterovirus-negativer DCM unterteilt.

## Klinische Standarddaten

Vergleicht man die eingeteilten Patientengruppen hinsichtlich der klinischen Basisdaten, der echokardiographischen und hämodynamischen Befunde, findet sich kein signifikanter Unterschied zwischen Patienten mit einer Enterovirus-positiven bzw. Enterovirus-negativen DCM.

In *Tabelle 5 und 6* sind die klinischen und hämodynamischen Parameter der Enterovirus-positiven und Enterovirus-negativen Patienten dargestellt.

*Tabelle 5:* Klinische Basisdaten

Klinische Größen	Enterovirus-positiv (n = 14)	Enterovirus-negativ (n = 17)	p-value
Alter (Jahre)	52 ± 12	50 ± 9	0,55
Männliches Geschlecht (%)	12 (86)	14 (82)	0,81
Durch. NYHA Grad	2,75 ± 1,2	2,1 ± 1,1	0,21
Herzfrequenz (1/min <sup>-1</sup> )	90 ± 20	92 ± 22	0,76
RR systolisch (mmHg)	128 ± 16	131 ± 24	0,63
RR diastolisch (mmHg)	84 ± 13	84 ± 17	0,92

Tabelle 6: Echokardiographische und Hämodynamische Parameter

Parameter	Enterovirus- positiv (n = 14)	Enterovirus- negativ (n = 17)	p-value
Echo LVEDD (mm)	67 ± 8	67 ± 9	0,84
EF kardiograph. (%)	32 ± 11	29 ± 9	0,45
PAPm (mmHg)	25 ± 10	25 ± 10	0,84
PCWPm (mmHg)	18 ± 9	17 ± 9	0,77
EF angiographisch (%)	36,0 ± 13	36 ± 12	0,98
Cardiac output (l/min)	5,5 ± 1,4	5,7 ± 1,4	0,67
Herzindex (l/min/m <sup>2</sup> /KOF)	2,6 ± 0,7	3,0 ± 0,9	0,25

### Immunhistologische Befunde

Hinsichtlich der myokardialen Infiltration und Expression der Major-Histokompatibilitäts-Komplexe (MHC) der Klasse I (HLA-A,B,C) und II (HLA-DR,DP,DQ) konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen der Enterovirus-positiven und der Enterovirus-negativen Gruppe festgestellt werden.

### 3.1.2 Histochemische Bewertung und Vergleich

#### DNA-Fragmentation (Tunel-Methode)

Vergleicht man die Enterovirus-positive mit der Enterovirus-negativen Gruppe bezüglich der DNA-Fragmentation, zeigt sich bei Patienten mit einer Enterovirus-positiven DCM eine signifikant niedrigere Anzahl an DNA-fragmentierten Zellen als bei Patienten mit DCM und negativem Enterovirusnachweis (26,6 ± 11 % vs. 43,3 ± 14 %). Tabelle 7 stellt die Enterovirus-positive Gruppe und Enterovirus-negative Gruppe gegenüber (Bildertafel 1 und Bildertafel 7; Abb.1-6).

#### Transglutaminase-Färbung

In der qualitativen Auswertung war bei Patienten mit einer Enterovirus-positiven DCM eine geringere Anfärbung mit tTG als bei Patienten mit einer Enterovirus-negativen DCM zu finden (Bildertafel 7; Abb. 5-6).

### DNA-Fragmentation und simultane tTG-Färbung (*Apoptose-Rate*)

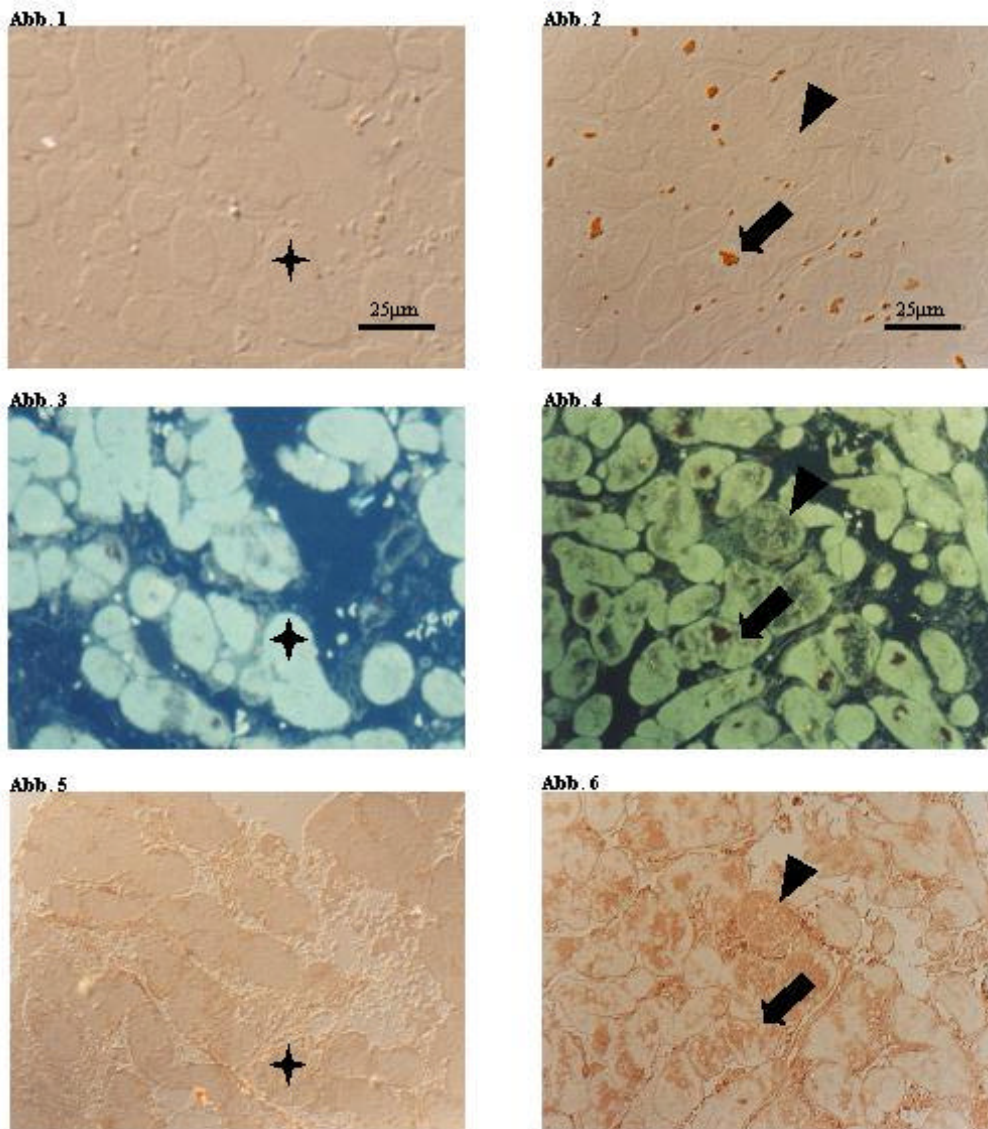
Nimmt man das gemeinsame Auftreten von DNA-fragmentierten Kernen und den Nachweis von tTG in über 50 % der Zellanschnittfläche einer Herzmuskelzelle als Kriterium für den programmierten Zelltod und vergleicht beide Gruppen miteinander, so haben Patienten mit einer Enterovirus-positiven DCM eine signifikant niedrigere Apoptose-Rate als Patienten mit einer Enterovirus-negativen DCM ( $10,6 \pm 5 \%$  vs.  $19,5 \pm 9 \%$ ). Die Ergebnisse sind *Tabelle 7* zu entnehmen. In *Schaubild 2-3* werden graphisch die Ergebnisse beider Gruppen dargestellt (Bildertafel 7).

### Auszählparameter

Bei etwa gleicher Anzahl untersuchter Frames in beiden Patientengruppen ( $32 \pm 8$  vs.  $29 \pm 6$  Frames/Patient) ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied bezüglich Anzahl angeschnittener Kerne ( $344 \pm 150$  vs.  $361 \pm 144$  Kerne/Patient;  $p = \text{n.s.}$ ), Anzahl angeschnittener Zellen ( $11\ 300$  vs.  $13\ 300$  Zellen/Patientengruppe;  $p = \text{n.s.}$ ), durchschnittlicher Zelldichte ( $24 \pm 14$  vs.  $25 \pm 10$  Zellen/Patientengruppe;  $p = \text{n.s.}$ ) und der durchschnittlichen Kerndichte ( $11 \pm 4$  vs.  $12 \pm 4$  Kerne/Patient;  $p = \text{n.s.}$ ). Vergl. *Tabelle 7*.

*Tabelle 7:* Immunhistochemische Auswertung

Erhobene Parameter	Enterovirus- positiv (n = 14)	Enterovirus- negativ (n = 17)	p-value
Apoptose-Rate	$10,6 \pm 5$	$19,5 \pm 9$	0,002
DNA-Fragmentierung	$26,6 \pm 11$	$43,3 \pm 14$	0,0008
Gesamtzellzahl	$799 \pm 546$	$728 \pm 303$	0,66
Gesamtkernzahl	$344 \pm 150$	$361 \pm 144$	0,75
Zelldichte	$24 \pm 14$	$25 \pm 10$	0,91
Kerndichte	$11 \pm 4$	$12 \pm 5$	0,36



### Bildertafel 7

**Abb. 1-6:** Morphologischer Vergleich der Enterovirus-positiven (links; Abb.1,3,5) und Enterovirus- negativen (rechts; Abb.2,4,6) DCM durch Folgeschnitte (Vergrößerung 200fach).

**Abb. 1-4:** Vergleich der Kernfragmentierung in beiden Gruppen. Darstellung durch DIC- (Abb.1-2) und Fluoreszenz-Mikroskopie (Abb.3-4).

**Abb. 5-6:** Vergleich der tTG-Färbung in beiden Gruppen in DIC-Mikroskopie.

Deutliche Unterschiede von „apoptotisch definierten Myozyten“ mit DNA-Fragmentierung und Myofibrillenverlust sind in beiden Gruppen zu erkennen: Apoptotisch definierter Myozyt (Pfeil), Myozyt mit ausgeprägter tTG-Expression/Fibrillenverlust (Dreieck), intakter Myozyt mit angeschnittenem Kern (Stern).

Schaubild 2: Vergleich Apoptose-Rate bei Enterovirus-positiver und negativer idiopathischer dilatativer Kardiomyopathie

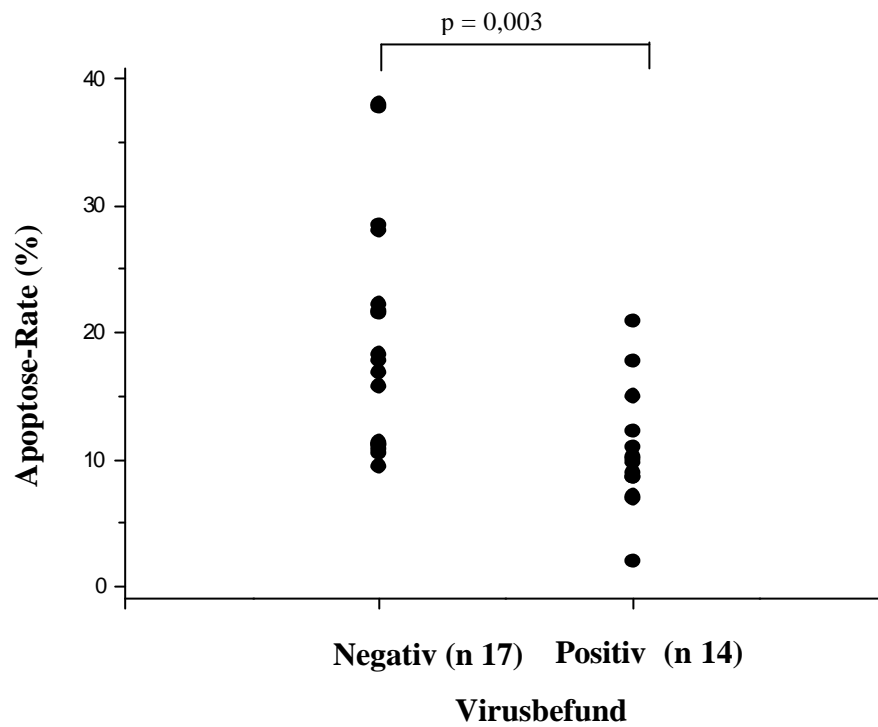
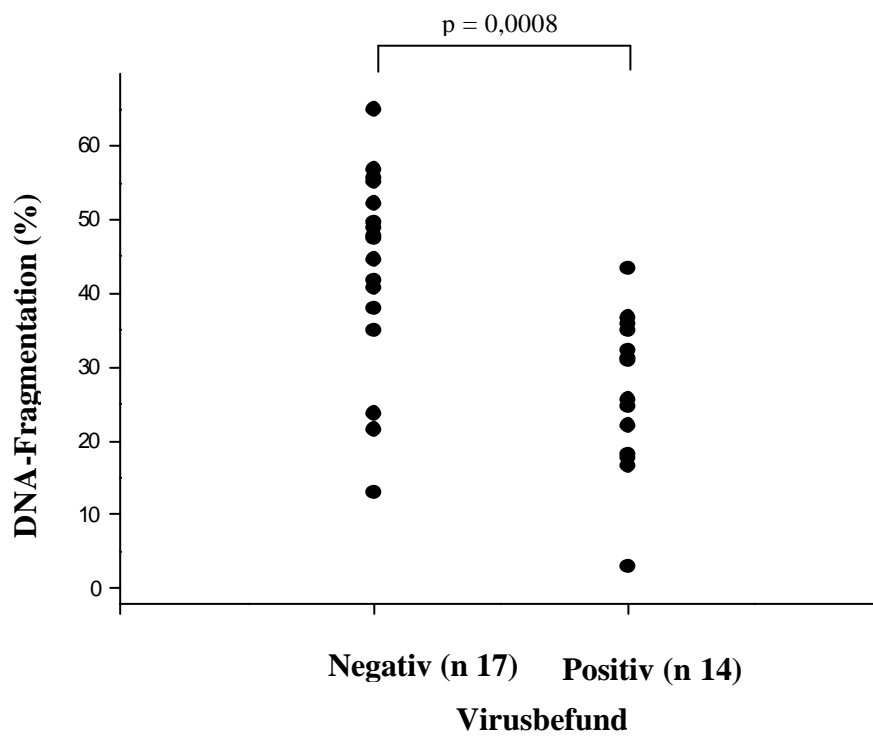


Schaubild 3: Vergleich der DNA-Fragmentations-Rate bei Enterovirus-positiver und negativer idiopathischer dilatativer Kardiomyopathie

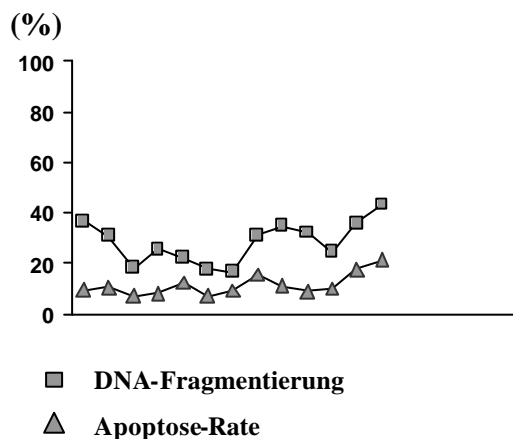


In beiden Gruppen war ein etwa 2,5fach (2,42 bzw. 2,48) höherer Anteil an Myozyten mit alleiniger Kern-Fragmentierung gegenüber Myozyten mit kombiniertem Nachweis fragmentierter DNA und tTG zu beobachten. *Myozyten ohne DNA-Fragmentierung des angeschnittenen Kerns, aber positiver tTG –Reaktion, konnten bei keinem Patienten gefunden werden.*

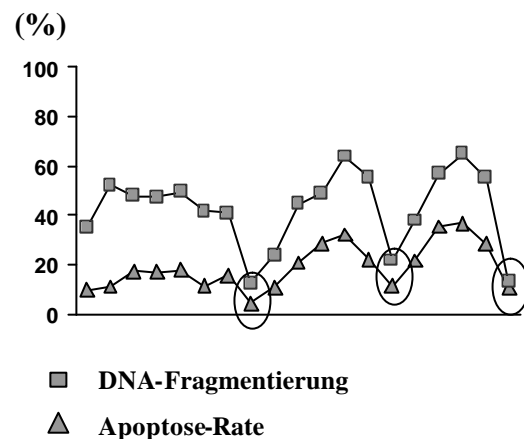
Der Zusammenhang von DNA-Fragmentierung und Apoptose-Rate ist in den folgenden Diagrammen unter Berücksichtigung der Ergebnisse der Enterovirus-Analyse dargestellt.

*Schaubild 4 und 5:* Verhältnis von DNA-Fragmentierung und anteiliger Apoptose-Rate bei Enterovirus-positiver DCM (rechts) und Enterovirus-negativer DCM (links).

*Enterovirus-positive DCM*



*Enterovirus-negative DCM*



In der Auswertung fielen drei Patienten der Enterovirus-negativen Gruppe auf, die relativ niedrige Apoptose- bzw. DNA- Fragmentations-Raten zeigten (Kreise).

### **Vergleich von Ausprägung des Myofibrillenverlustes und der Aktin-Färbung in beiden Gruppen**

Im Vergleich beider Patientengruppen konnte auch qualitativ ein Unterschied in der morphologischen Ausprägung und Intensität des Myofibrillenverlustes (Fluoreszenz-Defekt) und der Aktin-Färbung festgestellt werden.

Bei Patienten mit einer Enterovirus-positiven DCM war deutlich weniger Myofibrillenverlust zu finden als bei Patienten mit einer Enterovirus-negativen DCM (Bildertafel 7; Abb.3-4).

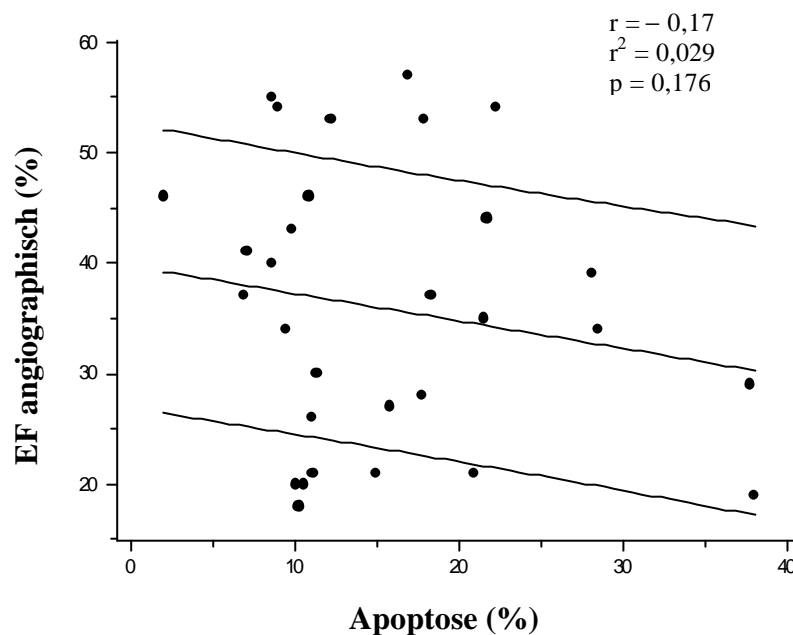


Weiterhin wurden ebenfalls deutlich weniger Myozyten mit einer intensiven, zytosolischen Aktin-Färbung in der Enterovirus-positiven Gruppe gefunden.

## Hämodynamik und Apoptose-Index

Die hämodynamischen Befunde wurden in demselben Zeitraum erhoben, in dem die Gewebeentnahme durchgeführt wurde. Beim Vergleich zwischen angiographischer Ejektionsfraktion und Apoptoseindex konnte lediglich eine Tendenz zur negativen Korrelation erkannt werden.

*Schaubild 6: Zusammenhang zwischen Apoptose (%) und linksventrikulärer Ejektionsfraktion (EF %)*



Eine Übersicht der Patienten und deren virologischen Befunde, Ergebnisse der klinischen und hämodynamischen Untersuchungen sowie der Befunde der immunhistochemischen Untersuchungen sind in *Tabellen 11* und *12* des Anhangs dargestellt.

### 3.2 Histochemische Bewertung von rechts- und linksventrikulärem Herzmuskelgewebe

Von den 31 in der Untersuchung betrachteten Patienten wurde bei 15 (48%) Patienten das Myokardgewebe aus dem rechten Ventrikel und bei 16 (52%) aus dem linken Ventrikel entnommen.

#### Klinische Standarddaten

Hinsichtlich der hämodynamischen und klinischen Parameter konnte kein signifikanter Unterschied bei rechts- bzw. linksventrikulär biopsierten Patienten festgestellt werden. Die Daten sind *Tabelle 8* zu entnehmen.

*Tabelle 8:* Vergleich der echokardiographischen und hämodynamische Parameter von Patienten mit rechts- vs. linksventrikulären Myokardbiopsien

Parameter	Rechtsventrikuläre	Linksventrikuläre	p-value
	Myokardbiopsie (n = 15)	Myokardbiopsie (n = 16)	
<b>Echo LVEDD</b> (mm)	67 ± 9	67 ± 8	0,95
<b>EF Echo</b> (%)	32 ± 10	28 ± 10	0,20
<b>PAP</b> (mmHg)	24 ± 11	26 ± 9	0,67
<b>PCWP</b> (mmHg)	17 ± 9	17 ± 9	0,96
<b>HMV</b> (l/min)	5,8 ± 1,0	5,3 ± 1,7	0,35
<b>Herzindex</b> (l/min/m <sup>2</sup> /KOF)	2,8 ± 0,6	2,8 ± 1,0	0,87

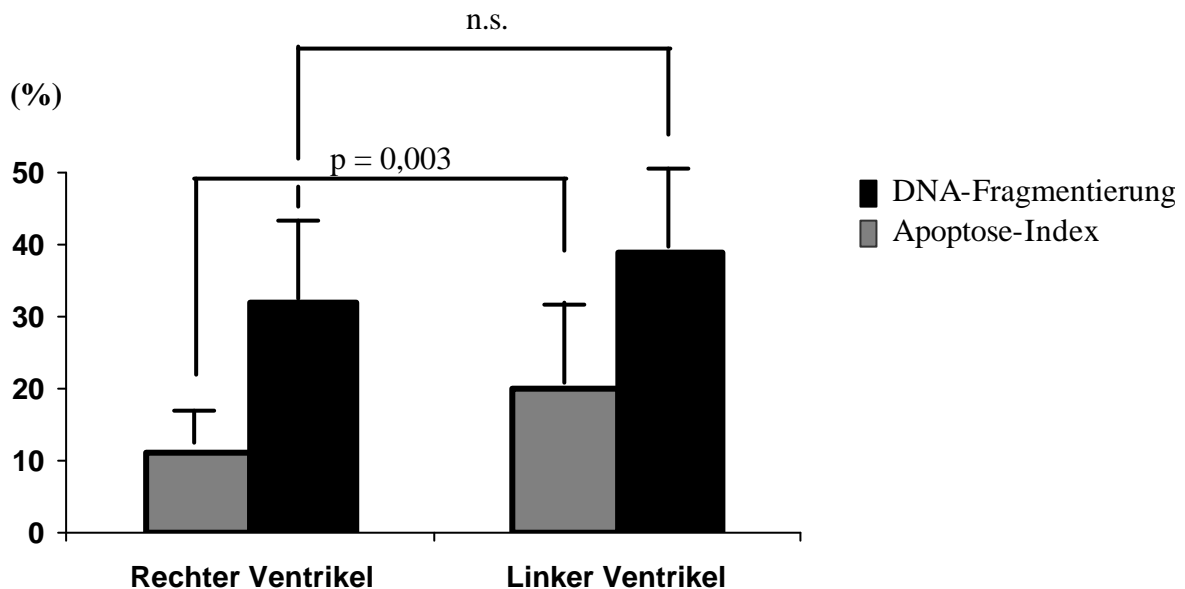
#### Bewertung der Apoptose bzw. der Fragmentations-Rate in rechts- und linksventrikulärem Myokard ohne Berücksichtigung des viralen Status

Vergleicht man die Apoptose-Rate beider Gruppen miteinander, so ergibt sich eine signifikant höhere Apoptose-Rate der Myokardbiopsien in Geweben des linken Herzens ( $20\% \pm 9$  vs.  $11\% \pm 5$ ;  $p = 0,003$ ). Erstaunlicherweise konnte beim Vergleich der Fragmentations-Raten kein signifikanter Unterschied gefunden werden ( $32\% \pm 14$  vs.  $39\% \pm 14$ ;  $p = 0,21$ ) (*Tabelle 9* und *Schaubild 7*).

Tabelle 9: Vergleich von rechts- bzw. linksventrikulär biopsierten Patienten

	Rechtsventrikuläres	Linksventrikuläres	p-value
	Gewebe (n = 15)	Gewebe (n = 16)	
Virusbefund (pos/neg)	8/7	6/10	0,39
Apoptose-Index	11 ± 5	20 ± 9	0,003
DNA-Fragmentierung	32 ± 15	39 ± 15	0,21

Schaubild 7: Graphische Darstellung der Apoptose- und Fragmentations-Rate im Vergleich von linksventrikulären und rechtsventrikulären Biopsien



### Apoptose-Rate in Abhängigkeit von Lokalisation der Myokardbiopsie und Virusanalyse

Nimmt man die durchschnittliche myokardiale Apoptose-Rate der Enterovirus-positiven Patienten unter Berücksichtigung der Entnahmelokalisation, so ergibt sich für linksventrikuläres Gewebe von Virus-positiven Patienten eine signifikant höhere Apoptose-Rate als in Rechtsherzgewebe von Virus-positiven Patienten ( $8\% \pm 3$  vs.  $13\% \pm 4$ ;  $p = 0,009$ ). Dasselbe gilt auch für die Virus-negativen Patienten. Hierbei konnte im linksventrikulären Myokard ebenfalls eine signifikant höhere Apoptose-Rate im Gegensatz zum rechtsventrikulären Gewebe gefunden werden. ( $14\% \pm 3$  vs.  $23\% \pm 10$ ;  $p = 0,02$ ) (Tabelle 10 und Schaubild 8).

Prüft man nun die einzelnen Apoptose-Raten innerhalb der Entnahmegruppe nach Virusbefunden, so ist festzustellen, dass sich auch hier die Apoptose-Raten unterscheiden. In

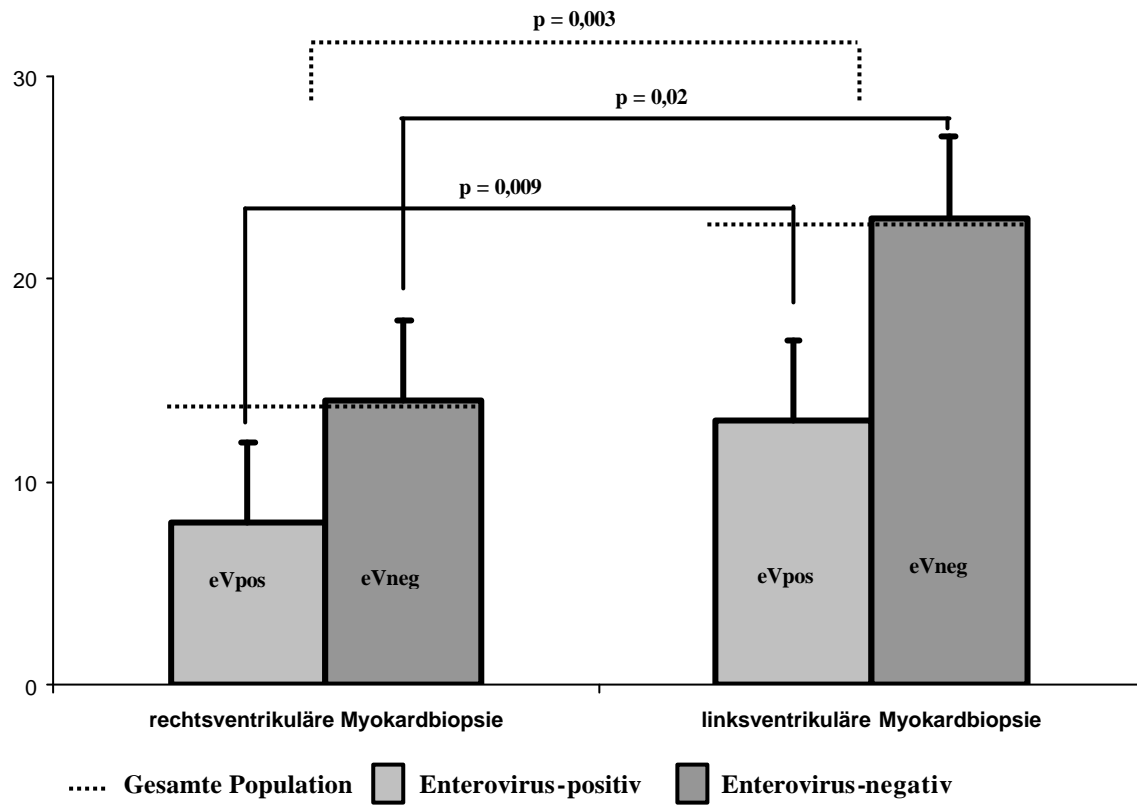
linksventrikulärem Gewebe konnte bei Enterovirus-positiven und Enterovirus-negativen Patienten unterschiedliche Apoptose-Raten gefunden werden. (eVpos vs. eVneg; 13 % vs. 23 %;) In rechtsventrikulärem Myokardgewebe waren die Apoptose-Raten der Enterovirus-positiven bzw. -negativen Patienten ebenfalls unterschiedlich (eVpos vs. eVneg; 8% vs. 14%) (Tabelle 10 und Schaubild 8).

*Tabelle 10:* Apoptose im Vergleich rechts- vs. linksmyokardbiopsierter Patienten, aufgeschlüsselt nach virologischem Befund

Apoptose Parameter	Apoptose-Rate in rechtsventrikulärer Myokardbiopsie (%)	Apoptose-Rate in linksventrikulärer Myokardbiopsie (%)	p-value
<b>Gesamte Studienpopulation</b> (n = 31)	11 ± 5 (n 15)	20 ± 9 (n 16)	0,003
<b>Enterovirus-positive Patienten</b> (n = 14)	8 ± 3 (n 8)	13 ± 4 (n 6)	0,009
<b>Enterovirus-negative Patienten</b> (n = 17)	14 ± 3 (n 7)	23 ± 10 (n 10)	0,02

*Schaubild 8:* Vergleich der Apoptose-Raten aufgeschlüsselt nach virologischem Befund

(%)



## Diskussion

### 4.1 Allgemeine histologische und histochemische Beurteilung

#### 4.1.1 Histochemische Kriterien

##### Tunel-Methode

In der vorliegenden Arbeit stellte die Fragmentierung der DNA ein wesentliches Kriterium von apoptotischen Myozyten dar. Zur Erfassung eines Myozyten im apoptotischen Prozess wurde zusätzlich der simultane Nachweis der tTG in den betroffenen Zellen hinzugezogen. Wie vorangehend beschrieben, zeigte sich in beiden Gruppen eine ca. 2,5fach höhere Rate an Myozyten mit isolierter DNA-Fragmentierung im Vergleich zu Myozyten mit DNA-Fragmentierung und simultaner tTG-Färbung (Fragmentations-Rate : Apoptose-Rate - eVpos 26,6% vs. 10,6%; eVneg 43,3% vs. 19,5%).

Nach derzeitigen Erkenntnissen stellt der alleinige Nachweis von DNA-Fragmentation kein eindeutiges Zeichen für Apoptose in Geweben dar (Elsässer 2000; Saraste 1999). So ist anzunehmen, dass die erhobenen Fragmentations-Raten auch Zellen mit einer positiven Tunel-Reaktion erfassen, die nicht als apoptotisch zu werten sind. Nicht-standardisierte Labor- und Färbebedingungen, inflammatorische Verhältnisse der Gewebe oder Nekrose können bei der Tunel-Methode zu falsch positiven Ergebnissen führen (Elsässer 2000; Saraste 1999). Daneben gibt es aber auch Hinweise, dass gerade DNA-Fragmentierung im apoptotischen Prozess reversibel sein kann. In Studien wurde die Tunel-Methode zur Identifikation von Myozyten mit reversibler und irreversibler DNA-Fragmentierung im Rahmen des apoptotischen Verlaufes beschrieben (Negoescu et al. 1996). Durch apoptotische Auslöser bzw. subletale Zellschäden wird der Apoptoseprozess aktiviert, die definitive „Entscheidung“ der Zelle zum endgültigen apoptotischen Untergang ist jedoch noch nicht getroffen (Pankuweit et al. 1999). Diese Entscheidung hängt unter anderem vom Verhältnis bestimmter intrazellulärer Faktoren wie z.B. Bax/Bcl-2 oder anderen Einflüssen ab.

Noch ist auch nicht geklärt, wie viele DNA-Brüche überhaupt notwendig sind, d.h. wie groß die Schädigung sein muss, um ein positives Apoptose-Signal in den Zellen auslösen zu können, bzw. bis zu welchem Ausmaß der DNA-Fragmentation dieser Prozess noch reversibel ist (Elsässer, 2000). Negoescu (1996) beschrieb in diesem Zusammenhang die Darstellung von präapoptotischen Zellen anhand der Tunel-Methode (Negoescu et al. 1996).

Obwohl Herzmuskelgewebe formalpathologisch dem Ruhewebe zugeordnet wird, konnte in neueren Studien nicht nur eine erhöhte Anzahl von apoptotischen Zellen, sondern auch eine

erhöhte Anzahl von Mitosen in Myokardgewebe von Patienten mit fortgeschrittener Herzinsuffizienz gefunden werden. Noch ist unklar, ob Mitosen in Kombination mit Apoptose alleinig im „*Remodeling*“ des Herzens auftreten oder auch schon im normalen Herzen vorhanden sind und ob dieser Prozess in gestresstem Myokard amplifiziert wird. In dem von Kanoh et al. (1999) publizierten Artikel stellten die Autoren die These auf, dass die Tunel-Methode in Patienten mit idiopathischer DCM keine Apoptose, sondern lediglich DNA-Reparatur vergleichbar mit Zellen in der S-Phase anzeigt (Kanoh et al. 1999).

All diese Resultate legen nahe, dass eine positive Tunel-Reaktion per se nicht ausreichend zur Apoptose-Detektion im Myokardgewebe ist. Zusammenfassend betrachtet, können Myozyten aufgrund reversibler oder irreversibler apoptotischer Stimulation, Reparaturmechanismen, Nekrose und infolge der von Remodeling-Prozessen beschriebenen Mitose eine positive Tunel-Reaktion ausbilden. Gerade durch diese Vielzahl von möglichen Ursachen der DNA-Fragmentierung sind mehrere Kriterien zur Bestimmung von Apoptose in Myokardgewebe nötig. Deshalb sollte bei der vorliegenden Untersuchung nicht davon ausgegangen werden, dass alle Myozyten mit positiver Tunel-Reaktion unwiderruflich in apoptotische Prozesse einbezogen sind. Gerade der simultane Nachweis der tTG und die gefundenen elektronenmikroskopischen Merkmale legen nahe, dass sich die Kardiomyozyten in einem fließenden Prozess befinden. Durch bestimmte Kaskaden und Abläufe werden spezielle Enzyme bzw. Proteine ausgebildet oder aktiviert, um den programmierten Zelltod durchzuführen oder aufzuhalten. Der immunzytochemische Nachweis einer DNA-Fragmentierung kann somit kein „absolutes“ Entscheidungskriterium bezüglich des apoptotischen Untergangs einer betroffenen Zelle darstellen, sondern sollte eher als ein sensitiver Marker in den komplexen Nachweis-Methoden der Apoptose verstanden werden. In aktuellen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass ein Zusammenhang zwischen DNA-Fragmentierung und tTG-Expression besteht (Autuori et al. 1998; Aschoff et al. 2000). Die licht-, fluoreszenz- und elektronenmikroskopischen Befunde der vorliegenden Arbeit stützen diese Auffassung. Mit dem Nachweis einer Kernfragmentation in Kombination mit tTG-Expression erhält man neben dem deutlichen Hinweis auf einen apoptotischen Vorgang gleichzeitig ein Ausschlusskriterium für DNA-Fragmentation anderer Ursachen. So ist es fraglich, ob Myozyten mit tTG-Expression nur DNA-Reparatur durchführen ohne in apoptotische Prozesse involviert zu sein. Auch ist es unwahrscheinlich, dass Myozyten, die durch Nekrose zugrunde gehen - was bekanntermaßen ein katastrophenartiger Zustand für die betroffenen Zellen bedeutet - noch Zeit und Energie haben, Enzyme wie die tTG auszubilden.



Inwieweit der „Apoptose-Ablauf“ bei Zellen reversibel ist, die tTG ausgebildet haben, lässt sich zum jetzigen Zeitpunkt schwer beurteilen.

Myozyten mit angeschnittenem, unfragmentiertem Zellkern zeigten nie eine positive tTG-Färbung. In dieser Untersuchung konnte festgestellt werden, dass die tTG-Expression unmittelbar an eine Kernfragmentation geknüpft war. Gesunde Myozyten wiesen keine tTG-Expression auf. Dementsprechend wurde bei Myozyten mit positiver TUNEL-Reaktion und simultaner tTG-Expression von apoptotischen Prozessen ausgegangen.

Myozyten, die in der immunzytochemischen Untersuchung positiv reagierten, zeigten auch auf ultrastrukturellem Niveau apoptosetypische Befunde wie Chromatinkondensation, Membranblebbing und Zellschrumpfung. In diesen Myozyten fanden sich keinerlei Anzeichen von Zellschwellung oder Lyse, welche für Nekrose charakteristisch wären. Morphologisch konnten diese Kerne dem Boiling- bzw. Blebbing-Stadiums der Apoptose zugeordnet werden. Abschließend konnten die lichtmikroskopischen Apoptose-Kriterien wie positive TUNEL-Reaktion mit konsekutiver tTG Färbung, Aktin-Färbung und Fluoreszenz-Defekte, welche wahrscheinlich das morphologische Korrelat des Myofibrillenverlust darstellen, auf ultrastruktureller Ebene bestätigt werden.

Um unspezifisches Färbeverhalten oder Nekrose soweit wie möglich auszuschließen, wurde das untersuchte Gewebe ohne längeres „Ischämie-Intervall“ entnommen, schonend fixiert, in standardisierten Abläufen gefärbt, sowie Negativ- und Positivkontrollen angefertigt. Zudem fanden sich in der statistischen Auswertung keinerlei Ausreißer, welche eine Vermutung färbetechnischer oder methodischer Fehler zuließen.

### **Transglutaminase und Myofibrillenverlust**

Bei fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen konnte eine intensive Eigenfluoreszenz der Myofibrillen und Zellkerne in intakten Myozyten festgestellt werden. In Gewebeschnitten von Patienten mit idiopathischer DCM war diese Autofluoreszenz in einigen Myozyten deutlich reduziert und die Myofibrillen zerstört oder demaskiert. Regionen reduzierter Autofluoreszenz zeigten eine erhöhte Aktivität der tTG. Ein Teil der Myozyten wies dabei vermehrt das typische streifenförmige Muster der kontraktilen Elemente auf. Gemeinsam mit den obigen Ergebnissen sprechen diese Resultate am ehesten für einen enzymatischen Verlust bzw. enzymatischen Abbau von kontraktilen Elementen an diesen Lokalisationen. Die verbesserte Darstellung der Myofibrillen in Regionen mit Fluoreszenz-Defekt ist durch eine mögliche enzymatische Freilegung von Antigenen zu erklären. Dies könnte bedeuten, dass an diesen Stellen die tTG zusammen mit Hilfe weiterer Enzyme intrazelläre Proteine wie

Tubulin, Aktin oder Vinkulin abbaut und die entstandenen Produkte zum Aufbau eines intrazellulären Netzes benutzt (Fesus et al. 1991; Autuori et al. 1998; Fesus 1998). Ferner schreiben einige Autoren der tTG auch hydrolytische Fähigkeiten zu (Autuori et al. 1998). Schon 1995 wurde von Packer der durch Apoptose bedingte enzymatische Abbau der kontraktilen Elemente als Ursache der Herzinsuffizienzentwicklung angenommen. Das Konzept sagt aus, dass Herzmuskelzellen durch fortschreitende apoptotische Prozesse abgebaut werden und der progressive Verlust an kontraktilen Elementen zur fortschreitenden Verschlechterung der Pumpfunktion beiträgt (Heinzl 1995). Wie vorstehend diskutiert, weist die erhöhte Aktivität der tTG in Regionen des Myofibrillenverlustes am ehesten auf einen enzymatischen Abbau hin, welcher typischerweise beim programmierten Zelltod vorkommt (Fesus et al. 1996; Fesus 1998; Aschoff et al. 2000). Hall und Kollegen (1994) konnten zeigen, dass monomeres G-Aktin die DNase I inhibiert (Hall 1994). DNase I stellt eine wichtige Endonuklease im apoptotischen Prozess dar. Ihre mangelnde Hemmung durch vermehrten Abbau von Myofibrillen könnte somit einen fördernden Effekt auf den Apoptose-Prozess haben (Lacks 1981; Polzar et al. 1989). Ein weiterer Beleg für diese Hypothesen könnte in den erhöhten Werten der DNase I bei Patienten mit idiopathischer DCM gesehen werden (Yao et al. 1996). Auch beschränken sich die Interaktionen des Aktins mit der DNase I nicht nur auf deren Hemmung, sondern die DNase I bewirkt ihrerseits eine Konformationsänderung des Aktins, was zu einer verbesserten Reagibilität mit der tTG führen könnte (Polzar et al. 1989).

### **Aktin-Färbung**

Bei Untersuchungen mit Aktin-Antikörpern konnte keine homogene Färbung der Schnitte erreicht werden. Gesunde Herzmuskelzellen ohne DNA-Fragmentierung, tTG-Nachweis und intakter Fluoreszenz zeigten überraschenderweise eine schwache Aktin-Färbung. Zellen mit kombiniertem Nachweis von DNA-Fragmentation und tTG-Färbung wiesen hingegen eine intensive Aktin-Färbung auf. Die Anfärbung der Myozyten war mehr oder weniger diffus, ohne die zu erwartende geordnete Struktur der Herzmuskelzellen. Zytosolische Regionen mit ausgeprägten Fluoreszenz-Defekten wiesen dabei dieselben Farbe-Optima in der Aktin-Färbung auf wie sie in der tTG-Färbung festgestellt werden konnten.

Wie in einer kürzlich veröffentlichten Arbeit dargelegt wurde, ist anzunehmen, dass die intensivere Färbung einzelner Myozyten aus einer gesteigerten proteolytischen Demaskierung der einzelnen Aktinfilamente resultiert. Dieses Verfahren wird schon seit längerer Zeit in standard-histologischen Untersuchungen zur Verbesserung der Anfärbbarkeit von Schnitten

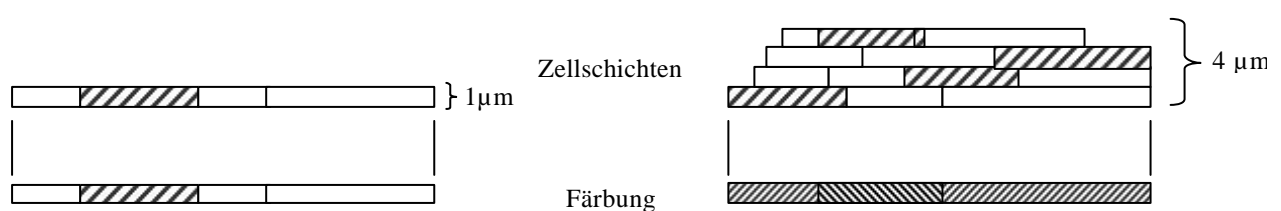
eingesetzt (Martin et al. 1982). Aufgrund der vorausgegangenen enzymatischen Andauung von Strukturen und Antigenen wird eine verbesserte Antikörper-Präzipitation und eine Erhöhung der zugänglichen Antikörperbindungsstellen an demaskierten Antigenen erreicht. Auch die verbesserte Darstellung zellulärer Strukturen in der Fluoreszenzmikroskopie, wie dem typischen Streifenmuster, spricht für eine proteolytische Demaskierung der Zellen. Die Demaskierung der Aktinfilamente mit konsekutiver tTG-Aktivitätserhöhung und Myofibrillenzerstörung unterstreicht die obige Annahme, dass Apoptose den enzymatischen Abbau von Myozyten erzwingen kann (Busch et al. 2001; Martin et al. 1982).

Inwieweit sich mit Aktin-Färbung die Kontraktilität und Beeinträchtigung der Pumpleistung auf zellulärer Ebene beurteilen lässt, müssen weitere Untersuchungen klären. Es wäre jedoch vorstellbar, dass die Aktin-Färbung ein histopathologisches Korrelat der insuffizienten Pumpleistung des linken Ventrikels der Patienten mit DCM darstellt. Demzufolge könnte dieses Verfahren als histologischer Marker angewandt werden, um den kontraktilen Status Praesens des jeweiligen Patienten zu beschreiben.

Zusammen betrachtet bestätigen die Resultate der TUNEL-Methode, tTG- und Aktin-Färbung und der Inhibition der DNase I durch Aktin das neue pathogenetische Konzept der Herzinsuffizienz durch apoptotisch bedingten enzymatischen Abbau der Myozyten.

Die vorgestellte Methodik sollte bei der Beurteilung der Ergebnisse mit in Betracht gezogen werden. Sie ist für Farbe-Verhalten und Farbe-Ergebnis entscheidend. Die morphologischen und färbetechnischen Befunde würden ohne die Semidünnschnitt-Technik nicht so deutlich werden. Diese Methode stellt ein sensitives Verfahren zur Beurteilung von Gewebeschnitten auf zellulärem Niveau dar (Aschoff et al. 1999; Busch et al. 2001). Im Semidünnschnitt stellt sich der größte Teil der Zellen unter dem Mikroskop überlagerungsfrei dar, was eine direkte Beurteilung der Morphologie und des Färbeverhaltes einzelner Zellen zulässt. Ein weiterer Vorteil dieses Verfahrens ist die Gewinnung von Folgeschnitten identischer Zellen und deren möglicher unterschiedlicher immunhistochemischer Darstellung.

*Schaubild 9:* Schematische Darstellung des Färbverhaltens an 1µm und 4µm starken Gewebeschnitten



## **4.2 Enterovirus-assoziierte dilatative Kardiomyopathie (DCM)**

Die Existenz von Viren als ein bedeutender ätiologischer Faktor bei der idiopathischen dilatativen Kardiomyopathie ist seit einigen Jahren unbestritten. Viele aktuelle Untersuchungen beschäftigen sich intensiv mit der Bedeutung, der Pathogenität und der Persistenz von Viren bei der idiopathischen DCM (Kandolf et al. 1987; Figulla et al. 1995; Andreoletti et al. 1996; Kandolf 1998; Maisch 1998; Fujioka et al. 2000).

### **Virusanalyse**

In dieser Arbeit konnte bei 45% der Patienten ein positiver Nachweis von Enteroviren anhand einer Enterovirus-spezifischen RT-PCR und einer Southern Blot-Hybridisierung erbracht werden. Die Angaben der Literatur über den Nachweis von Enterovirus-RNA bei Patienten mit einer idiopathischen DCM schwanken jedoch zwischen 10% und 67% (Archard et al. 1991; Kandolf et al. 1993; Figulla et al. 1995; Andreoletti et al. 1996).

Der hohe Anteil der Enterovirus-positiven Patienten in der Untersuchung lässt sich einerseits auf unterschiedliche Laborbedingungen bzw. Laborverfahren wie den ausgewählten Primern oder der Fixierung der Biopate, andererseits auf andersartige Krankheits- oder Studienpopulationen im Vergleich zu anderen Arbeiten zurückführen. Zur Erhöhung der Sensitivität und Spezifität wurde zusätzlich eine Southern Blot-Hybridisierung des PCR-Produktes durchgeführt, welche den Anteil gegenüber den in der Literatur angegebenen Enterovirus-positiven Patienten erhöhen konnte.

### **Klinische Beurteilung der Apoptose-Rate**

In zahlreichen Untersuchungen an Herzmuskelgewebe von Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz oder dilatativer Kardiomyopathie konnte das Vorkommen der Apoptose in Myozyten belegt werden. Der Stellenwert der Apoptose bei der Entstehung kardialer Erkrankungen ist jedoch aufgrund recht unterschiedlicher Ergebnisse weitgehend unklar (Bing 1994; Mallat et al. 1996; Narula et al. 1997; Olivetti et al. 1997; Narula et al. 1998). Wie bereits erwähnt, konnten virale Erreger als bedeutende ätiologische Faktoren der dilatativen Kardiomyopathie nachgewiesen werden. Inwieweit der programmierte Zelltod in deren Pathogenese eine Rolle spielt, ist gegenwärtig noch relativ unbekannt.

In der vorliegenden Untersuchung konnte gezeigt werden, dass Patienten mit einer Enterovirus-positiven DCM einen signifikant niedrigeren Apoptose-Anteil gegenüber Patienten mit einer Enterovirus-negativen DCM aufwiesen, ohne einen signifikanten Unterschied hinsichtlich der echokardiographischen und hämodynamischen Daten zu zeigen.

Der signifikante Unterschied der Apoptose-Raten zwischen beiden Gruppen wäre durch Einflussnahme von Viren in den Apoptoseablauf vorstellbar. Interessanterweise sind verschiedene Virusproteine identifiziert worden, die Sequenzhomologien von unterschiedlichen anti-apoptotischen Proteinen, wie z.B. FLIP (s.o., v-Flip – virales FLIP) oder Bcl-2, aufweisen. Durch diese Proteine haben die Viren die Möglichkeit, den apoptotischen Untergang der betroffenen Zelle zu verhindern. Dies gilt für Herpesviren, Epstein-Barr-Viren oder Pockenviren (Derfuss et al. 1998; Meinel et al. 1998). Adenoviren induzieren einen Polypeptidkomplex, der den Fas-Rezeptor blockieren kann und dann die CD 95-induzierte Apoptose hemmt.

Henke et al. (2000) konnten nun auch erstmalig Interaktionen zwischen dem Coxsackie-Virus B, - einem Enterovirus - und Proteinen, die in den apoptotischen Prozess involviert sind im Akutstadium der Infektion nachweisen (Schonian, et al. 1995; Gillet und Brun 1996; Pankuweit et al. 1998; Pankuweit et al. 1999; Zoog et al. 1999; Henke et al. 2000).

Entwicklungsgeschichtlich stellt dieser Einfluss in den zellulären Ablauf der Wirtszelle für Viren eine überlebensnotwendige Strategie dar. So hat das Virus die Möglichkeit, den Wirtsorganismus und dadurch sich selbst funktionell zu erhalten. Der programmierte Tod der infizierten Zelle ist zumeist der einzige Ausweg des betroffenen Organismus, um die in der Zelle befindlichen Viren zu eliminieren.

In klinischen Untersuchungen von Patienten mit idiopathischer DCM konnte Figulla et al. (1995) nachweisen, dass Patienten mit einer Enterovirus-Infektion einen längeren Zeitraum ohne Herztransplantation überlebten als Patienten mit einer Enterovirus-negativen DCM. Außerdem verbesserten sie sich signifikant in hämodynamischen Parametern, und insgesamt verstarben weniger Patienten in der Enterovirus-positiven Gruppe (5% vs. 19%) (Figulla et al. 1995). Saraste und Kollegen (1999) konnten an explantierten Herzen mit progressiver Herzinsuffizienz zeigen, dass der klinische Schweregrad und die Progression der Erkrankung mit dem Auftreten und der Anzahl von apoptotischen Myozyten zusammenhängt. Hierbei wurde die Tunel-Methode zur Quantifizierung eingesetzt. In dieser Studie konnten quantitativ mehr Tunel-positive Myozyten bei Patienten mit schwerer progressiver Herzinsuffizienz gefunden werden als bei Patienten mit einer mittleren oder langsamen Progression der Herzinsuffizienz (Saraste et al. 1999).

Ein Zusammenhang zwischen einer Verbesserung der Herzinsuffizienz bei Enterovirus-Infektion sowie der Korrelation der kardialen Dysfunktion mit apoptotischen Myozyten ist gegenwärtig noch ungeklärt. Jedoch konnte in der vorliegenden Arbeit eine signifikant niedrigere Apoptose-Rate bei Patienten mit Enterovirus-positiver DCM nachgewiesen werden, was unter Berücksichtigung der oben genannten Studienergebnisse ein denkbares und nachvollziehbares Resultat darstellt.

Bei vereinzelt Patienten konnte kein Nachweis einer Enterovirus-Infektion erbracht werden, obwohl diese eine sehr geringe Apoptose-Rate aufzeigten. Dies könnte durch eine Infektion mit kardiotropen Viren, die nicht in der Untersuchung erfasst wurden, erklärt werden (*Schaubild 4 und 5*). Hierbei kämen z.B. Viren aus der Gruppe der Cytomegalie- oder Adenoviren in Betracht (Gillet und Brun 1996).

### **Apoptose-Index und Hämodynamik**

Im klinischen Alltag wird bei Patienten mit Herzinsuffizienz vor allem die linksventrikuläre Auswurffrac tion (EF) zur Beurteilung der linksventrikulären Kontraktilität herangezogen. Ein Zusammenhang zwischen der linksventrikulären Auswurffrac tion als Parameter der linksventrikulären Kontraktilität und der Apoptose-Rate als putativer Schädigungs-Marker wäre plausibel. In der hämodynamischen Analyse konnte dagegen nur eine Tendenz zur negativen Korrelation zwischen der Apoptose-Rate und der Auswurffrac tion festgestellt werden. Hierbei konnten die unterschiedlichen Biopsielokalisationen und Kompensationsmechanismen sowie differierende Infektionsantworten in der Auswertung nicht berücksichtigt werden. Streng genommen bewertet die Ejektionsfrac tions-Messung nicht die Gesamtsituation des Myokards, sondern nur die linksventrikuläre systolische Kontraktilität. Da aber die Apoptose den gesamten Ventrikel betrifft, sollten hier vermutlich andere Messverfahren Anwendung finden, um den Zusammenhang von Kontraktilität und Apoptose zu klären. Tei et al. veröffentlichten 1995 ein echokardiographisches Verfahren, welches die kombinierte Beurteilung der systolischen und diastolischen Kontraktilität bei Patienten mit ventrikulärer Dysfunktion erlaubt ( $\text{Tei-Index} = [\text{isovolumetrische Kontraktions-Zeit} + \text{isovolumetrische Relaxations-Zeit}] / \text{EF}$ ) (Tei 1995; Tei et al. 1995). Interessanterweise konnte Bruch et al. (2000) in einer aktuellen Untersuchung zeigen, dass sich Patienten mit moderater Herzinsuffizienz ( $\text{NYHA} \geq 2$ ) signifikant von Patienten einer Kontrollgruppe bezüglich des Tei-Index unterschieden, obwohl kein wesentlicher Unterschied im Hinblick auf die üblichen hämodynamischen Prognoseparameter vorlag (Bruch et al. 2000).

Eventuell ist ein Zusammenhang der Apoptose-Rate mit dem Tei-Index, der die Gesamtkontraktilität des Herzens beschreibt, wahrscheinlicher als mit den üblichen hämodynamischen Parametern. Es ist anzunehmen, dass die Apoptose sich nicht nur auf die linksventrikuläre systolische Phase auswirkt, sondern die Gesamtkontraktilität des Herzens und somit möglicherweise den Tei-Index und nicht die linksventrikuläre Auswurfraction beeinflusst.

### **Einschätzung und Bewertung des erstellten Apoptose-Index**

Verschiedene Arbeiten weisen darauf hin, dass gerade immunzytochemische Färbeverfahren an unmittelbaren Folgeschnitten eine brauchbare und gut auswertbare Methode für Koexistenzstudien auf zellulärem Niveau darstellen (Aschoff et al. 1996; Aschoff und Jirikowski 1997; Aschoff et al. 1999; Aschoff et al. 2000; Busch et al. 2001). Wie vorangehend beschrieben, können durch die Schnittdicke von 1µm etliche Ebenen durch eine einzelne Zelle gelegt werden. Bei Folgeschnittanalysen kann eine einzelne Zelle sehr gut morphologisch und immunhistochemisch anhand unterschiedliche Marker beurteilt werden.

Angaben zu Höhe der Apoptose-Raten bei der DCM schwanken stark und werden kontrovers bewertet. In den richtungweisenden Arbeiten von Narula et al. (1996) und Olivetti et al. (1997) fanden sich große Unterschiede in den Angaben der myokardialen Apoptose. Narula et al. (1996) wiesen bei explantierten Herzen eine durchschnittliche Apoptose-Rate zwischen 5%-35% nach, Olivetti et al. (1997) hingegen eine von nur 0,25% (Narula et al. 1996; Olivetti et al. 1997). Yamamura et al. (1999) fanden im Myokard von biopsierten DCM-Patienten signifikant unterschiedliche Raten von kernfragmentierten Myozyten bei Patienten mit keiner, moderater oder schwerer Kontraktionsstörung (4,3% vs. 9,8%; Kontrolle 0%) (Yamamura et al. 1999). Saraste et al. (1999) zeigten, dass Patienten mit schneller, mittlerer und langsamer progressiver Herzinsuffizienz sich signifikant voneinander bezüglich myokardialer DNA-Fragmentation unterscheiden (0,192% vs. 0,093% vs. 0,026%) (Saraste et al. 1999).

In der hier vorliegenden Untersuchung fanden sich mittlere Apoptose-Raten von 10,6% bei Enterovirus-positiven und 19,5% bei Enterovirus-negativen Patienten. Die deutlichen Unterschiede der einzelnen Apoptose-Raten in den oben genannten Arbeiten sind zum einen auf die große Variabilität der Patientenzahl und -population zurückzuführen. Andererseits handelte es sich bei den Arbeiten von Narula et al. (1996), Olivetti et al. (1997) und Saraste et al. (1999) um explantierte Herzen in verschiedenen Stadien einer terminalen Herzinsuffizienz. Möglicherweise können in terminal insuffizienten Herzen nur noch wenig apoptotische Zellen im Sinne eines vorangegangenen Abbaus nachgewiesen werden. Dagegen wurden in der

vorliegenden Arbeit Biopsien von Patienten mit einem durchschnittlichen NYHA-Grad II untersucht. In biopsiertem Herzenmuskelgewebe fanden auch Yamamura et al. (1999) vergleichbar hohe Fragmentations-Raten. Die Ursache hierfür könnte in mäßigeren Erkrankungsstadien der biopsierten Patienten gegenüber den explantierten Patienten liegen. Auch wäre es denkbar, dass Lokalisationsunterschiede bei der Biopsie und der Entnahme von Gewebe aus explantierten Herzen bestehen.

So ist bekannt, dass gerade Myozyten von druckbelasteten Herzen aufgrund von Umstrukturierungen der Ventrikelwand in die epikardiale Region wandern, um so den vergrößerten Ventrikelraum zu umschließen (side-to-side slippage) (Olivetti et al. 1990; Cheng et al. 1995; Gerdes und Capasso 1995). Narula (1996) beschreibt in diesem Zusammenhang eine vorherrschende Verteilung der Apoptose in den subendokardialen und epikardialen Schichten (Narula et al. 1996; Narula et al. 1997; Narula et al. 1998). Aufgrund der biopsischen Entnahme des Herzgewebes spiegelt die erstellte Apoptose-Rate in allen Fällen die subendokardial gelegenen Myozyten wieder, womit die gegenüber anderen Untersuchungen höhere Apoptose-Rate erklärt werden könnte.

Andererseits spielen gewiss auch unterschiedliche methodische Aspekte eine wichtige Rolle. In der Arbeit von Narula et al. (1996) wurden durchschnittlich 200 Zellen pro Patient ausgezählt. Olivetti (1997) zählte einige hundert Zellen aus und extrapolierte seine Daten auf 1 Million Kardiomyozyten. Im Unterschied dazu wurden in dieser Untersuchung durchschnittlich 750 Zellen pro Patient ausgezählt und durchschnittlich 31 Frames mit einer Größe von 0,067 mm<sup>2</sup> pro Patient ausgewertet. Dies entspricht einem ausgezählten Volumen von 2,077 mm<sup>3</sup> Herzgewebe pro Patient. Insgesamt wurden pro betrachteter Patientengruppe durchschnittlich 12 300 Zellen bewertet.

Wie gegenwärtig allgemein gefordert, wurde in beiden Untersuchungen versucht, mehrere Kriterien und Methoden zum Apoptosenachweis heranzuziehen (Saraste et al. 1999; Elsässer et al. 2000). In der Arbeit von Narula wurde die Apoptose nach der Tunel-Methode und Gel-Elektrophorese nachgewiesen, bei Olivetti wurde mit konfokaler Mikroskopie versucht, verschiedene histochemische Marker wie Tunel-Methode, Bax- und Bcl-2- Nachweis sowie Gel-Elektrophorese den programmierten Zelltod nachzuweisen (Narula et al. 1996; Olivetti et al. 1997). In beiden Arbeiten wurden weder die Apoptosemarker anhand einer Betrachtung der zellulären Konstellation identischer Zellen bewertet, noch eignen sich die benutzten Methoden zur Quantifizierung. Allein die Tunel-Methode eignet sich zur Quantifizierung, welche bekannterweise bei der Beurteilung des apoptotischen Status nicht unproblematisch ist (Saraste 1999). Im Gegensatz dazu war es in dieser Untersuchung möglich, Apoptose anhand



von Tunnel-Methode, tTG-Färbung, Aktin-Färbung und Elektronenmikroskopie an Folgeschnitten ein und derselben Zelle zu beurteilen und diese Konstellation für quantitative Auswertungen heranzuziehen (Aschoff et al. 2000; Busch et al. 2001).

Es ist wahrscheinlich, dass die Apoptose-Rate in myokardialen Gewebe von vielen Faktoren abhängt. Infolgedessen sollten Erkrankungstyp, Entnahmelokalisation - epikardiales Gewebe vs. subendokardiales Gewebe - sowie methodische Aspekte in die Bewertung mit einbezogen werden.

### **4.3 Histochemische Charakterisierung von rechtsventrikulärem und linksventrikulärem Herzmuskelgewebe**

Bei den untersuchten Patienten erfolgte die Biopsientnahme entweder aus dem rechten oder aus dem linken Ventrikel. Vergleicht man - unabhängig vom Enterovirus-Befund - die Apoptose-Raten von links- und rechtsventrikulärem Myokardgewebe miteinander, so zeigt sich, dass im linken Herzen eine signifikant höhere Apoptose-Rate zu finden ist als im Rechtsherzgewebe (20% vs. 11%,  $p = 0,003$ ). Aufgrund seiner besonderen hämodynamischen und mechanischen Situation muss das linke Herz gegenüber dem rechten Herzen ein Vielfaches an Arbeit leisten (Hopf et al. 1990). Myozyten, die einem erhöhten intraventrikulären Druck oder einer erhöhten Wandspannung bzw. darauffolgender Dehnung ausgesetzt wurden, gehen gegenüber Zellen ohne diesen Stress schneller an Apoptose zugrunde (Cheng et al. 1995; Teiger et al. 1996). Die mechanische und hämodynamische Mehrbelastung des linken Ventrikels und der bei der DCM zusätzlich erhöhte enddiastolische Druck könnten die erhöhte linksventrikuläre Apoptose-Rate erklären. Inwieweit die Zellen des linken Herzens durch vermehrten Stress oder chronischen Sauerstoffmangel mit entsprechender Radikalbildung sich in einem unterschwelligen präapoptischen Reizzustand befinden und infolgedessen proapoptische Proteine ausbilden, ist gegenwärtig noch unklar. Insgesamt ist die erhöhte Apoptose-Rate im linksventrikulären Gewebe am ehesten dadurch erklärbar, dass diese einem größeren hämodynamischen Stress und höherer mechanischer Belastung als rechtsventrikuläre Myozyten ausgesetzt sind. Beim Vergleich zwischen Rechtsherz- und Linksherzbiopsien konnte weiterhin festgestellt werden, dass sich die Apoptose-Raten signifikant (20% vs. 11%,  $p = 0,003$ ), die Fragmentations-Raten jedoch nicht signifikant (32% vs. 39%,  $p = 0,21$ ) unterscheiden. Wie bereits diskutiert, kann DNA-Fragmentierung ein Indikator für eine Myozytenschädigung darstellen, die möglicherweise reversibel ist (Pankuweit et al. 1999). Hier sollte eine vermehrte Mitose in gestresstem

Myokardgewebe sowie eine geringere Kompensationsmöglichkeit des linksventrikulären Gewebes in Betracht gezogen werden. Es wäre denkbar, dass links- und rechtsventrikuläres Gewebe von der gleichen „Schädigungsstärke“ betroffen sind, das rechte Herz jedoch mehr Kompensationsfreiraum aufgrund der geringeren hämodynamischen Belastung zur Verfügung hat und dadurch zwar eine gleich hohe DNA-Fragmentations-Rate, aber eine deutlich niedrigere Apoptose-Rate aufweist. Vielleicht ist gerade die vermehrte linksventrikuläre kompensatorische Hyperplasie bei der DCM ein Grund, weswegen die Zellen im linken Herzen vulnerabler für den programmierten Zelltod sein können (Bing 1994; Cheng et al. 1995; Teiger et al. 1996).

Es bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten zu klären, inwieweit linksventrikuläre Zellen proapoptotische Proteine ausbilden oder in einem präapoptotischen Reizzustand sind. Es bleibt die Fragen offen, ob in den Ventrikeln unterschiedliche Wege des programmierten Zelltodes ablaufen und wie diese möglicherweise prophylaktisch gehemmt werden können.

Das oben diskutierte Konzept einer Apoptosehemmung durch Virusproteine ist auch für eine isolierte Betrachtung von links- bzw. rechtsventrikulärem Gewebe zutreffend. Isoliert betrachtet, ergab sich sowohl im links- als auch rechtsventrikulären Gewebe für Enterovirus-positive Patienten eine signifikant niedrigere Apoptose-Rate (*Schaubild 7 und 8*).

Spekulativ könnte davon ausgegangen werden, dass sich virale Proteine unabhängig von rechts- bzw. linksventrikulärem Gewebe in Form einer Erniedrigung der Apoptose-Rate auswirken.

## Zusammenfassung und Ausblick

Insgesamt muss davon ausgegangen werden, dass quantitative Untersuchungen der Apoptose im humanen Myokard noch am Anfang stehen. Typische Kriterien der Apoptose konnten licht- und elektronenmikroskopisch anhand zahlreicher Studien in Herzmuskelzellen nachgewiesen werden. Aufgrund der fehlenden Daten über Ablauf, Länge des Zeitraums und Reversibilität der Apoptose ist die quantitative Beurteilung in entnommenem Herzmuskelgewebe als relativ schwierig anzusehen. Trotz unterschiedlicher Literaturangaben über die myokardiale Apoptose hat sich nach Saraste et al. (2000) doch gezeigt, dass bei verschiedenen kardiologischen Krankheitsbildern gehäuft eine durch positive TUNEL-Reaktion nachweisbare internukleosomale DNA-Fragmentation in Kardiomyozyten vorliegt. Inwieweit die von uns bestimmte Apoptose-Rate bei Patienten mit einer Enterovirus-assoziierten dilatativen Kardiomyopathie von diagnostischer, therapeutischer und pathogenetischer Relevanz ist, müssen weitere Untersuchungen analysieren.

Abschließend sollen die wichtigen Fakten dieser Arbeit nochmals zusammengefasst werden: Bei Patienten mit Enterovirus-positiver bzw. negativer DCM konnte ein signifikanter Unterschied der Apoptose-Raten festgestellt werden, der möglicherweise auf hemmende viraler Faktoren zurückzuführen ist.

Durch den simultanen Nachweis von tTG, veränderter Aktin-Darstellung, Myofibrillenverlust und DNA-Fragmentierung konnten wichtige Marker des Apoptoseprozesses in Kardiomyozyten koexistent dargestellt werden.

Weiter erscheint die Aktin-Färbung an Semidünnschnitten ein valides Verfahren zu sein, um den kontraktile Status Praesens bzw. den Myofibrillenverlust der Myozyten bei der DCM immunzytochemisch darzustellen. Die Aktin-Färbung könnte somit ein geeigneter Marker zur morphologischen Abschätzung der hämodynamischen Parameter und der Kontraktilität des Herzens sein.

Durch den fluoreszenzmikroskopischen Nachweis des Myofibrillenverlustes und dessen direkte Korrelation mit der tTG-Aktivität konnte eine enzymatische Degradation bzw. ein apoptotischer Abbau der Kardiomyozyten dargestellt werden. Der simultane Nachweis proapoptotischer Enzyme konnte die Annahme nicht bestätigen, dass eine positive TUNEL-Reaktion lediglich DNA-Reparatur in Kardiomyozyten nachweist. Inwieweit Apoptose bei Zellen reversibel ist, die schon tTG ausgebildet haben, lässt sich zum jetzigen Zeitpunkt schwer beurteilen.

Insgesamt können anhand der immunhistochemischen Ausprägungen einer Zelle verschiedene Schädigungsgrade differenziert werden. In *Schaubild 10* ist ein Klassifizierungsvorschlag mittels der evaluierten immunhistochemischen Merkmale dargestellt.

*Schaubild 10*: Schema zur Beurteilung von Kardiomyozyten nach histochemischen Kriterien

Histologische Methode	Gesunde Zelle	Stimulierte Zelle	Geschädigte Zelle
Autofluoreszenz	↑↑	↑	↓
Tunel-Methode	■	↑	↑
tTG-Färbung	■	■	↑
Aktin-Färbung	(↑)	(↑)	↑↑

↑ vorhanden    ↑↑ stark ausgeprägt    ↓ reduziert    ■ nicht nachweisbar

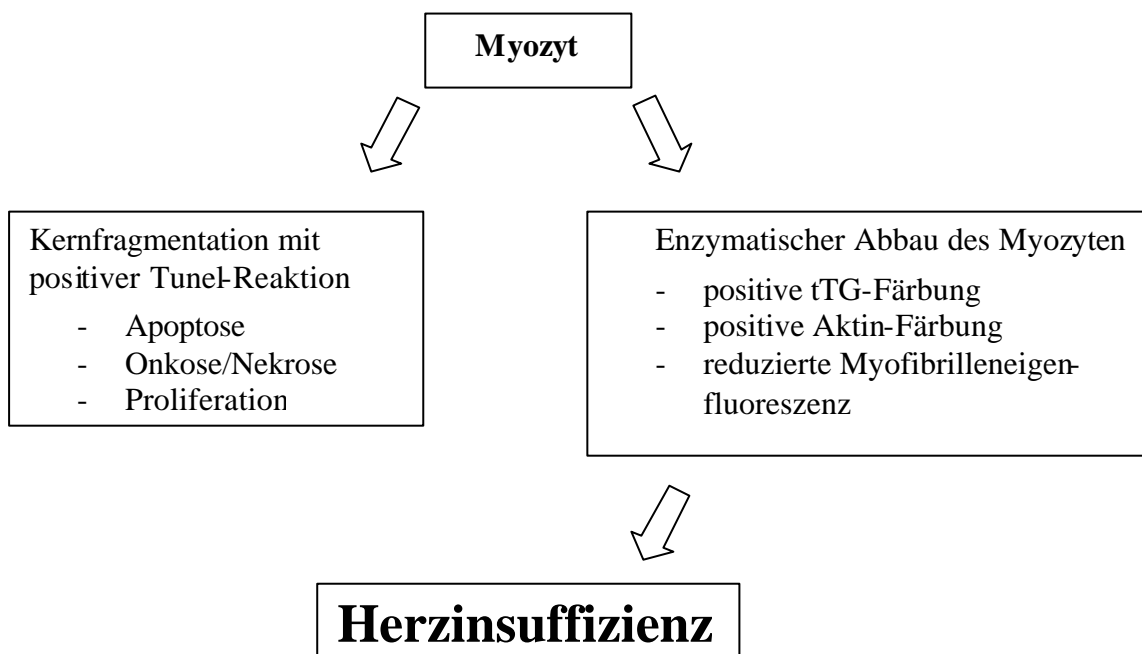
Ferner konnte ein signifikanter Unterschied der Apoptose-Raten beim Vergleich von links- vs. rechtsventrikulärem Gewebe festgestellt werden. Die Fragmentations-Raten unterschieden sich jedoch nicht signifikant, was auf unterschiedliche Kompensationsmöglichkeiten des links- bzw. rechtsventrikulären Gewebes zurückgeführt werden könnte.

Das diskutierte Konzept der Apoptosehemmung durch Virusproteine kann auch bei einer isolierten Betrachtung der ventrikulären Gewebe bestehen bleiben, da sich sowohl im links- als auch rechtsventrikulären Gewebe eine signifikant niedrigere Apoptose-Rate für Patienten mit positivem Enterovirus-Nachweis zeigt.

## Schlussfolgerung

Das bedeutendste histopathologische Substrat der dilatativen Kardiomyopathie ist zweifelsfrei der Verlust an kontraktilen Elementen (Hopf et al.1990). Die Koexistenz von Myofibrillenverlust und tTG-Aktivität könnte ein Hinweis auf den Zusammenhang zwischen programmiertem Zelltod und sich verschlechternder Pumpleistung der chronischen Herzinsuffizienz bedeuten (*Schaubild 11*). Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind somit im Einklang mit dem eingangs erwähnten Apoptose-Modell von Packer.

*Schaubild 11*: Apoptosemodell zur Entstehung der Herzinsuffizienz



Meist sind die Therapiestrategien der chronischen Herzinsuffizienz auf die Verbesserung und Behandlung der Symptomatik ausgerichtet. Ob eine Therapie zur Ödemprophylaxe, eine Therapie zur Verbesserung der Kontraktilität oder eine neurohormonale Blockierung zum kardiovaskulären Schutz durchgeführt wird, alle bisherigen Therapiemodelle sind auf Symptombekämpfung oder -verbesserung ausgerichtet.

In dem Apoptosemodell steht - durch den programmierten Tod von Myozyten als Ursache der Herzinsuffizienz - erstmals die kontraktile Dysfunktion als Therapieziel im Mittelpunkt. Sollte sich zukünftig herausstellen, dass die myokardiale Apoptose als neues pathologisches Modell für die Entwicklung und/oder Progression der kardialen Dysfunktion verantwortlich ist, ließen sich

daraus neue therapeutische Wege zur Behandlung der idiopatischen DCM und der chronischen Herzinsuffizienz ableiten.

Wie eingangs schon diskutiert, sind viele Fragen der Apoptose im Herzmuskelgewebe beantwortet, jedoch auch viele neu hinzugekommen. Es wird relativ deutlich, dass weitere Anstrengungen mit dem Ziel unternommen werden müssen, durch Prävention oder Hemmung der Apoptose eine Vielzahl von neuen therapeutischen Optionen zu eröffnen und die Progression solch schwerwiegender Krankheitsbilder wie die chronische Herzinsuffizienz aufzuhalten.

Anlage

Tabelle 11: Übersicht der hämodynamischen und immunhistochemischen Parameter der Enterovirus-positiven Patienten

Patienten	EF angio. (%)	EF echo. (%)	PCWP (mmHG)	PAP Ruhe (mmHG)	LVED (mm)	HI (l/min/m <sup>2</sup> )	HMV (l/min)	Alter (Jahre)	RR sys. (mmHg)	RR dia. (mmHg)	HF Ruhe (l/min)	DNA-Frag. (%)	Apoptose- Rate (%)	Zell- dichte (Zellen/Frame)	Kern- dichte (Zellen/Frame)	gezählte Frames	gezählte Kerne	gezählte Zellen
1	46	50	18	15	58	2,80	5,6	52	130	84	95	3,00	2,00	21,00	12,00	23,00	308,00	637,00
2	55	30	14	29	72	2,70	5,8	44	160	110	116	30,85	8,61	23,07	14,93	36,00	537,64	830,44
3	53	50	8	13	58	3,60	6,5	63	130	70	68	22,14	12,19	16,74	9,99	38,00	379,64	636,05
4	40	35	11	23	68	2,90	5,9	56	120	70	80	25,64	8,60	24,39	10,97	26,00	285,19	634,21
5	18	18	8	24	80	2,45	6,6	57	124	84	85	32,24	10,22	15,63	5,61	26,00	145,82	406,25
6	28	50	18	20	60	2,60	5,3	66	135	80	60	35,84	17,74	30,62	10,61	37,00	392,61	1132,92
7	21	26	32	47	69	2,30	4,9	60	110	80	120	31,18	14,93	11,75	4,65	36,00	167,40	423,00
8	21	21	38	30	59	1,29	2,5	57	120	80	84	43,33	20,86	17,33	7,97	45,00	358,73	779,63
9	20	20	12	18	63	2,20	4,2	33	110	80	110	24,60	10,01	18,74	9,10	22,00	200,18	412,20
10	37	20	8	12	83	2,82	6,1	33	155	110	96	18,09	6,90	19,68	8,95	24,00	214,86	472,29
11	43	25	28	24	68	3,90	8,0	40	120	80	81	36,75	9,80	69,00	18,99	37,00	702,79	2553,02
12	54	28	19	23	70	2,42	5,2	53	120	80	97	16,67	8,98	26,67	14,02	25,00	350,60	666,67
13	26	35	15	34	65	2,80	5,3	48	130	85	76	34,93	10,99	19,60	6,95	47,00	326,49	921,20
14	41	40	17	24	59	2,40	4,8	66	120	80	90	17,77	7,06	25,08	16,35	27,00	441,32	677,25
<b>Durch- schnitt</b>	<b>36±13</b>	<b>32±11</b>	<b>18±9</b>	<b>25±10</b>	<b>67±8</b>	<b>2,6±0,7</b>	<b>5,5±1,4</b>	<b>52±12</b>	<b>127,5±16</b>	<b>84±13</b>	<b>90±20</b>	<b>26,6±11</b>	<b>10,6±5</b>	<b>24±14</b>	<b>11±4</b>	<b>32±8</b>	<b>344±150</b>	<b>799±546</b>

Anlage

Tabelle 12: Übersicht der hämodynamischen und immunhistochemischen Parameter der Enterovirus-negativen Patienten

Patienten	EF angio. (%)	EF echo. (%)	PCWP (mmHG)	PAP Ruhe (mmHG)	LVED (mm)	CI (l/min/m <sup>2</sup> )	HMV (l/min)	Alter (Jahre)	RR sys. (mmHg)	RR dia. (mmHg)	HF Ruhe (l/min)	DNA-Frag. (%)	Apoptose- Rate (%)	Zell- dichte (Zellen/Frame)	Kern- dichte (Zellen/Frame)	gezählte Frames	gezählte Kerne	gezählte Zellen
1	29	26	15	25	65	2,70	4,7	37	128	86	80	64,9	37,75	39,4	13,6	34,0	461,0	1339,8
2	44	32	9	22	63	2,80	5,2	50	130	95	80	37,9	21,68	19,3	8,0	41,0	327,5	792,9
3	21	25	21	36	84	4,00	7,0	62	120	80	84	13,0	11,10	19,1	5,8	33,0	192,5	629,8
4	57	30	9	18	63	3,30	6,7	45	130	80	88	47,4	16,88	36,1	20,8	24,0	499,7	866,3
5	35	25	17	25	72	3,40	6,7	50	140	105	85	44,5	21,54	12,1	7,1	34,0	240,8	410,2
6	39	47	20	23	52	3,00	6,3	40	170	110	130	55,1	28,08	19,2	11,2	30,0	335,2	574,9
7	20	21	8	22	78	5,00	5,2	50	125	85	112	23,7	10,51	20,8	10,1	29,0	292,4	602,0
8	46	44	10	22	57	2,90	5,8	57	125	90	80	52,1	10,82	47,3	24,4	29,0	708,6	1371,5
9	34	17	12	20	65	4,20	8,7	57	140	90	88	48,9	28,47	14,2	6,8	26,0	177,7	369,2
10	53	40	14	20	80	3,04	6,7	43	170	100	88	47,8	17,83	26,8	16,7	23,0	385,0	615,4
11	19	20	25	37	69	2,20	4,2	30	90	60	88	56,8	37,97	26,2	8,6	30,0	259,3	786,6
12	30	17	18	23	80	3,21	6,7	52	120	90	82	41,7	11,23	28,6	13,6	38,0	518,4	1086,9
13	30	25	17	20	64	2,00	4,0	55	100	50	100	21,5	11,36	19,5	8,2	18,0	148,4	351,2
14	37	35	10	18	59	2,11	4,4	55	132	82	100	49,6	18,26	34,4	17,7	22,0	390,0	757,3
15	54	40	7	10	61	3,00	5,7	58	110	60	60	55,6	22,22	17,4	12,5	25,0	311,5	436,0
16	34	25	34	36	66	2,28	4,5	63	130	80	72	34,9	9,48	21,7	14,0	33,0	461,9	716,7
17	27	25	37	55	64	1,95	4,7	42	170	90	148	40,8	15,77	18,0	11,5	37,0	426,3	664,2
<b>Durch Schnitt</b>	<b>36±12</b>	<b>29±9</b>	<b>17±9</b>	<b>25±10</b>	<b>67±9</b>	<b>3,0±0,9</b>	<b>5,7±1,4</b>	<b>50±9</b>	<b>131±24</b>	<b>84±17</b>	<b>92±22</b>	<b>43,3±14</b>	<b>19,5±9</b>	<b>25±10</b>	<b>12±5</b>	<b>29±6</b>	<b>361±144</b>	<b>728±303</b>



## Literaturverzeichnis

Andreoletti L., Hober D. et al. (1996). "Detection of enteroviral RNA by polymerase chain reaction in endomyocardial tissue of patients with chronic cardiac diseases."

J Med Virol 48(1): 53-9.

Anversa P., Olivetti G. et al. (1997). "Myocyte cell death and ventricular remodeling."

Curr Opin Nephrol Hypertens 6(2): 169-76.

Archard L. C., Bowles N. E et al. (1991). "Molecular probes for detection of persisting enterovirus infection of human heart and their prognostic value."

Eur Heart J 12 Suppl D: 56-9.

Aretz H. T. (1987). "Myocarditis: the Dallas criteria."

Hum Pathol 18(6): 619-24.

Aretz H. T., Billingham M. E. et al. (1987). "Myocarditis. A histopathologic definition and classification."

Am J Cardiovasc Pathol 1(1): 3-14.

Aschoff A., Jantz M. et al. (1996). "In-situ end labelling with bromodeoxyuridine, an advanced technique for the visualization of apoptotic cells in histological specimens."

Horm Metab Res 28(7): 311-4.

Aschoff A. und Jirikowski G. F. (1997). "Apoptosis: correlation of cytological changes with biochemical markers in hormone-dependent tissues."

Horm Metab Res 29(11): 535-43.

Aschoff A., Gunther E. et al. (2000). "Tissue transglutaminase in the small intestine of the mouse as a marker for apoptotic cells. Colocalization with DNA fragmentation."

Histochem Cell Biol 113(4): 313-7.

Aschoff A., Ott U. et al. (1999). "Colocalization of BAX and BCL-2 in small intestine and kidney biopsies with different degrees of DNA fragmentation."

Cell Tissue Res 296(2): 351-7.

Autuori F., Farrace M. G. et al. (1998). "'Tissue' transglutaminase and apoptosis."

Adv Biochem Eng Biotechnol 62: 129-36.

Bing, O. H. (1994). "Hypothesis: apoptosis may be a mechanism for the transition to heart failure with chronic pressure overload [editorial] [see comments]."

J Mol Cell Cardiol 26(8): 943-8.

Bokemeyer D., Sorokin A. et al. (1996). "Multiple intracellular MAP kinase signaling cascades."

Kidney Int 49(5): 1187-98.

Bruch C., Schmermund A. et al. (2000). "Tei-Index in patients with mild-to-moderate congestive heart failure."

Eur Heart J 21(22): 1888-1895.

Busch H. J., Jirikowski G. F. et al. (2001). "Actin in semithin sections of myocardial biopsies as a tool to visualize myofibrillary degradation in humans."

Cell Mol Biol 47(N°12): 165-1158X (2001).

Cheng W., Li B. et al. (1995). "Stretch-induced programmed myocyte cell death."

J Clin Invest 96(5): 2247-59.

Chinnaiyan A. M., Tepper C. G. et al. (1996). "FADD/MORT1 is a common mediator of CD95 (Fas/APO-1) and tumor necrosis factor receptor-induced apoptosis."

J Biol Chem 271(9): 4961-5.

Derfuss T., Fickenscher H. et al. (1998). "Antiapoptotic activity of the herpesvirus saimiri-encoded Bcl-2 homolog: stabilization of mitochondria and inhibition of caspase-3-like activity."

J Virol 72(7): 5897-904.

Duke R. C., Ojcius D. M. et al. (1996). "Cell suicide in health and disease."

Sci Am 275(6): 80-7.

Elsässer A., Suzuki K. et al. (2000). "Unresolved issues regarding the role of apoptosis in the pathogenesis of ischemic injury and heart failure."

J Mol Cell Cardiol 32(5): 711-24.

Fesus, L. (1992). "Apoptosis."

Immunol Today 13(8): A16-7.

Fesus, L. (1998). "Transglutaminase-catalyzed protein cross-linking in the molecular program of apoptosis and its relationship to neuronal processes."

Cell Mol Neurobiol 18(6): 683-94.

Fesus L., Davies P. J. et al. (1991). "Apoptosis: molecular mechanisms in programmed cell death."

Eur J Cell Biol 56(2): 170-7.

Fesus L., Madi A. et al. (1996). "Transglutaminase induction by various cell death and apoptosis pathways."

Experientia 52(10-11): 942-9.

Figulla H. R., Stille-Siegener M. et al. (1995). "Myocardial enterovirus infection with left ventricular dysfunction: a benign disease compared with idiopathic dilated cardiomyopathy."

J Am Coll Cardiol 25(5): 1170-5.

Fujioka S. Kitaura Y. Ukimura A. Deguchi H. Kawamura K. Isomura T. Suma H. Shimizu A. Evaluation of viral infection in the myocardium of patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. [Article] Journal of the American College of Cardiology. 36(6):1920-1926, 2000 Nov 15

Gerdes A. M. und Capasso J. M. (1995). "Structural remodeling and mechanical dysfunction of cardiac myocytes in heart failure [editorial] [see comments]."

J Mol Cell Cardiol 27(3): 849-56.

Gillet G. und Brun G. (1996). "Viral inhibition of apoptosis." Trends Microbiol 4(8): 312-7.

Hall A. K. (1994). "Molecular interactions between G-actin, DNase I and the beta-thymosins in apoptosis: a hypothesis."

Med Hypotheses 43(3): 125-31.

Heinzl S. (1995). "Heart failure--the apoptosis model."

Med Monatsschr Pharm 18(8): 236-9.

Henke A., Launhardt H. et al. (2000). "Apoptosis in coxsackievirus B3-caused diseases: interaction between the capsid protein VP2 and the proapoptotic protein siva."

J Virol 74(9): 4284-90.

Holtz J. und Heinrich H. (1999). "Apoptosis-what is it? Significance in coronary heart disease and myocardial infarct."

Herz 24(3): 196-210.

Hopf H., Kunkel B. et al. (1990) Kardiomyopathie. Frankfurt, Hoechst

Kandolf R. (1993). "Molecular biology of viral heart disease."

Herz 18(4): 238-44.

Kandolf R. (1998). "Enteroviral myocarditis and dilated cardiomyopathy."

Med Klin 93(4): 215-22.

Kandolf R., Ameis D. et al. (1987). "In situ detection of enteroviral genomes in myocardial cells by nucleic acid hybridization: an approach to the diagnosis of viral heart disease."

Proc Natl Acad Sci U S A 84(17): 6272-6.

Kandolf R., Klingel K. et al. (1993). "Molecular pathogenesis of enterovirus-induced myocarditis: virus persistence and chronic inflammation."

Intervirology 35(1-4): 140-51.

Kanoh M., Takemura G. et al. (1999). "Significance of myocytes with positive DNA in situ nick end-labeling (TUNEL) in hearts with dilated cardiomyopathy: not apoptosis but DNA repair."

Circulation 99(21): 2757-64.

Kerr J. F., Wyllie A. H. et al. (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics."

Br J Cancer 26(4): 239-57.

Krammer P. H. (2000). "Apoptose." Deutsches Ärzteblatt 97: 1481-1488.

Lacks S. A. (1981). "Deoxyribonuclease I in mammalian tissues. Specificity of inhibition by actin."

J Biol Chem 256(6): 2644-8.

Linß und Halbhuber. (1991). Histologie und mikroskopische Anatomie, Jena  
Georg Thieme Verlag.

Löllgen, H. (1990) Kardiopulmonale Funktionsdiagnostik. Wehr / Baden.

Verlag der Ciba-Zeitschriften, S.35 - 47

- Maisch B. (1998). "Classification of cardiomyopathies according to the WHO/ISFC Task Force-more questions than answers?." *Med Klin* 93(4): 199-209.
- Maisch B. (1999). "How cardiac cells die-necrosis, oncosis and apoptosis." *Herz* 24(3): 181-8.
- Maisch B., Portig I. et al. (2000). "Definition of inflammatory cardiomyopathy (myocarditis): on the way to consensus. A status report." *Herz* 25(3): 200-9.
- Mallat Z., Tedgui A. et al. (1996). "Evidence of apoptosis in arrhythmogenic right ventricular dysplasia." *N Engl J Med* 335(16): 1190-6.
- Martin R., Schafer M. et al. (1982). "Enzymatic cleavage prior to antibody incubation as a method for neuropeptide immunocytochemistry." *Histochemistry* 74(4): 457-67.
- Meinl E., Fickenscher H. et al. (1998). "Anti-apoptotic strategies of lymphotropic viruses." *Immunol Today* 19(10): 474-9.
- Narula J., Haider N. et al. (1996). "Apoptosis in myocytes in end-stage heart failure." *N Engl J Med* 335(16): 1182-9.
- Narula J., Hajjar R. J. et al. (1998). "Apoptosis in the failing heart." *Cardiol Clin* 16(4): 691-710.
- Narula J., Kharbanda S. et al. (1997). "Apoptosis and the heart." *Chest* 112(5): 1358-62.
- Negoescu A., Lorimier P. et al. (1996). "In situ apoptotic cell labeling by the TUNEL method: improvement and evaluation on cell preparations." *J Histochem Cytochem* 44(9): 959-68.
- Nicholson D.W. und Thornberry N. A. (1997). "Caspases: killer proteases." *Trends Biochem Sci* 22(8): 299-306.
- Olivetti G., Abbi R. et al. (1997). "Apoptosis in the failing human heart." *N Engl J Med* 336(16): 1131-41.

- Olivetti G., Capasso J. M et al. (1990). "Side-to-side slippage of myocytes participates in ventricular wall remodeling acutely after myocardial infarction in rats."  
Circ Res 67(1): 23-34.
- Orrenius S. (1996). Molekulare Medizin- Was uns der Zelltod lehrt.  
Campus-Verlag Frankfurt am Main.
- Osterziel K. J. und Dietz R. (2000). "Current status of therapy of chronic heart failure."  
Internist (Berl) 41(2 Pt 1): 137-44.
- Pankuweit S., Hufnagel G. et al. (1998). "Cardiotropic DNA viruses and bacteria in the pathogenesis of dilated cardiomyopathy with or without inflammation."  
Med Klin 93(4): 223-8.
- Pankuweit S., Jobmann M. et al. (1999). "Cell death in inflammatory heart muscle diseases- apoptosis or necrosis?."  
Herz 24(3): 211-8.
- Payne C. M., Bernstein C. et al. (1995). "Apoptosis overview emphasizing the role of oxidative stress, DNA damage and signal-transduction pathways."  
Leuk Lymphoma 19(1-2): 43-93.
- Polzar B., Nowak E. et al. (1989). "The complex of actin and deoxyribonuclease I as a model system to study the interactions of nucleotides, cations and cytochalasin D with monomeric actin."  
Eur J Biochem 182(2): 267-75.
- Richardson P., McKenna W. et al. (1996). "Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of cardiomyopathies ."  
Circulation 93(5): 841-2.
- Riede U. R. und Schäfer H. E. (1995). Allgemeine und spezielle Pathologie.  
Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart.
- Rudel T. (1999). "Caspase inhibitors in prevention of apoptosis."  
Herz 24(3): 236-41.
- Salvesen G. S. und Dixit V. M. (1997). "Caspases: intracellular signaling by proteolysis."  
Cell 91(4): 443-6.

Sanger J. W., Mittal B. et al. (1984). "Analysis of myofibrillar structure and assembly using fluorescently labeled contractile proteins."

J Cell Biol 98(3): 825-33.

Saraste A. (1999). "Morphologic criteria and detection of apoptosis."

Herz 24(3): 189-95.

Saraste A. und Pulkki K. (2000). "Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis."

Cardiovasc Res 45(3): 528-37.

Saraste A., Pulkki K. et al. (1999). "Cardiomyocyte apoptosis and progression of heart failure to transplantation."

Eur J Clin Invest 29(5): 380-6.

Schonian U., Crombach M. et al. (1995). "Cytomegalovirus-associated heart muscle disease."

Eur Heart J 16 Suppl O: 46-9.

Schwartz K. und Mercadier J. J. (1996). "Molecular and cellular biology of heart failure."

Curr Opin Cardiol 11(3): 227-36.

Sigusch H. H., Reinhardt D. et al. (1998). "Clinical picture and differential diagnosis of cardiomyopathy and myocarditis."

Med Klin 93(4): 236-9.

Simon (1999). "Der programmierte Zelltod."

Cardio News Nr 4.

Tei C. (1995). "New non-invasive index for combined systolic and diastolic ventricular function."

J Cardiol 26(2): 135-6.

Tei C., Ling L. H. et al. (1995). "New index of combined systolic and diastolic myocardial performance: a simple and reproducible measure of cardiac function--a study in normals and dilated cardiomyopathy."

J Cardiol 26(6): 357-66.

Teiger E., Than V. D. et al. (1996). "Apoptosis in pressure overload-induced heart hypertrophy in the rat."

Clin Invest 97(12): 2891-7.

---

Yamamura T., Nakamura H. et al. (1999). "Fas expression and apoptosis correlate with cardiac dysfunction in patients with dilated cardiomyopathy."

Jpn Circ J 63(3): 149-54.

Yamani M. H., van de Poll S. W. et al. (2000). "Fluorescence spectroscopy of endomyocardial tissue post-human heart transplantation: does it correlate with histopathology?"

J Heart Lung Transplant 19(11): 1077-1080.

Yao M., Keogh A. et al. (1996). "Elevated DNase I levels in human idiopathic dilated cardiomyopathy: an indicator of apoptosis?"

J Mol Cell Cardiol 28(1): 95-101.

Zoog S. J., Bertin J. et al. (1999). "Caspase inhibition by baculovirus P35 requires interaction between the reactive site loop and the beta-sheet core."

J Biol Chem 274(37): 25995-6002.



## Vielen Dank:

Mein besonder Dank gilt meinem Hochschullehrer und Doktorvater Prof. Dr. G. F. Jirikowski für die Möglichkeit, meine Dissertation in seinem Labor anzufertigen. Sein reges Interesse, seine vielfältige Unterstützung und ständige Bereitschaft zu fachlichen Diskussionen sowie seine Arbeitsweise haben mich sehr beeindruckt und mir viel geholfen. Auch die großen Freiräume und Möglichkeiten der Verwirklichung eigener Ideen bei der Durchführung haben diese Arbeit geprägt.

Ein besonders herzlicher Dank richtet sich an meinen Betreuer Dr. U. Lotze für die kritische Auseinandersetzung mit den Ergebnissen dieser Arbeit und die ständige Bereitschaft zur Diskussion inhaltlicher Aspekte. Mein Dank gilt ebenso seiner Geduld bei dem mühevollen Lektorat dieser Arbeit.

Prof. Dr. Figulla danke ich für die Zusammenarbeit, Unterstützung und interessanten Gespräche, bei denen ich viele Anregungen für diese Arbeit finden konnte.

Herzlich danken möchte ich auch Dr. A. Aschoff für die Zusammenarbeit und die anregenden Diskussionen.

Hervorheben möchte ich auch die Zusammenarbeit mit Frau E. Günther für Ihre vielfältige technische Unterstützung und die Betreuung bei meinen ersten Gehversuchen in der Immunhistochemie.

Ganz besonders herzlich möchte ich mich bei H. Hinkel und E. Hinkel für die vielseitige Hilfe, den Anregungen und das kritische Lektorat dieser Arbeit bedanken.

Einen besonderen Dank möchte ich meinen Eltern und Geschwistern aussprechen, die mich in allen Phasen meiner Ausbildung unterstützt haben und immer für mich da waren. Ganz besonders danken möchte ich auch meiner Freundin Heike, die durch Ihren moralischen und tatkräftigen Beistand, Ihre Geduld und Zuspruch das Gelingen dieser Arbeit wesentlich unterstützte.