

Aus der Medizinischen Klinik II, Kardiologie und Pulmonologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin  
Campus Benjamin Franklin

DISSERTATION

**Immunohistologische Detektion von  
Parvovirus B19 (B19V) Kapsid-Proteinen und  
B19V-spezifische Antikörper-Profile bei Patienten mit  
akuter Myokarditis und dilatativer Kardiomyopathie**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Titus Mbah Sabi  
aus Ambo (Kamerun)

**Gutachter:**

- 1. Prof. Dr. med. H.-P. Schultheiß**
- 2. Prof. Dr. med. M. Pauschinger**
- 3. Priv.-Doz. Dr. med. U. Landmesser**

**Datum der Promotion: 20.11.2009**

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	i
Abkürzungen.....	1
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>2</b>
1.1 Historie, Definition und Ätiologien der Myokarditis .....	2
1.2 Klassifikation der Kardiomyopathien .....	8
1.3 Akute Myokarditis, DCM und DCMi .....	10
1.4 Pathogenese der inflammatorischen Kardiomyopathie (DCMi) .....	12
1.5 Epidemiologie der Parvovirus B19 (B19V) Infektionen .....	13
1.6 Parvovirus B19 (B19V) .....	14
1.7 Immunmodulatorische Therapiestrategien bei der DCMi.....	16
1.8 Immunhistologische Detektionsverfahren der DCMi .....	19
1.9 Zielsetzungen der Promotionsarbeit .....	21
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>23</b>
2.1 Patienten.....	23
2.2 Entnahme und Prozessierung der Endomyokardbiopsien für die anti-B19V VP1/VP2 Immunhistologie .....	24
<b>2.2.1 Material und Reagenzien zur Herstellung von Gefrierschnitten aus                 EMBs .....</b>	<b>25</b>
<b>2.2.2 Prozedere.....</b>	<b>25</b>
2.3 Immunhistochemie auf B19V-VP1/VP2 in EMBs .....	26
<b>2.3.1 Material und Reagenzien für die immunhistochemische Färbung</b>	<b>26</b>
<b>2.3.2 Immunhistologische Färbungsreaktion .....</b>	<b>27</b>
2.4 Überprüfung der Spezifität des B19V-VP1/VP2 Antikörpers an pB19-M20 infizierten HEK293T Zellen .....	28

2.5	Quantifizierung der B19V-Immunhistologie mittels farbkodierter digitaler Bildanalyse (DBA).....	29
2.6	B19V Genom-Nachweis in EMBs mittels nPCR und qPCR.....	30
2.7	Serologische Untersuchung zur Detektion von B19V spezifischen IgG und IgM mittels RecomLine® blots .....	31
2.8	Statistische Analyse.....	34
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>35</b>
3.1	Demographische und klinische Daten der AMC- und DCM-Patienten .....	35
3.2	Nachweis von B19V-Genomen in EMBs mittels nPCR.....	37
3.3	Charakterisierung der humoralen B19V-Antwort bei AMC- und DCM-Patienten – Assoziation zum nPCR Nachweis von B19V Genomen in EMBs und Assoziation zur klinischen Verdachtsdiagnose .....	37
3.4	Bestimmung des Infektionsstadiums auf der Basis der humoralen anti-B19V Immun-Antwort .....	41
3.5	Demographische und klinische Daten der DCM-Patientengruppe für die immunhistologische B19V Proteinexpressionsuntersuchung.....	44
3.6	nPCR und qPCR Ergebnisse in EMBs.....	46
3.7	Immunhistologische anti-B19V-VP1-/VP2 Färbung in EMBs .....	46
3.8	Anti-B19V-Immunofluoreszenz in pB19-M20 transfizierten 293T Zellen....	51
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>53</b>
4.1	Immunhistochemie (IHC) auf B19V Proteine in EMBs .....	54
4.2	Prävalenz von B19V-Genomen in EMBs von ACM- und DCM-Patienten..	56
4.3	Anti-B19V-IgM und -IgG bei gesunden Kontrollprobanden.....	56
4.4	Anti-B19V-IgM Antwort bei AMC- und DCM-Patienten .....	57
4.5	Anti-B19V-IgG-Antwort bei AMC- und DCM-Patienten .....	58
4.6	Anti-B19V-humorale Immunantwort-Muster für die Bestimmung des Infektionsstadiums. ....	59

<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>61</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>63</b>
<b>7</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>79</b>
7.1	Publikationen in peer reviewed Journalen .....	79
7.2	Publizierte Abstracts von Vorträgen.....	80
7.3	Danksagung.....	81
7.5	Erklärung .....	83

## Abkürzungen

AMC	akute Myokarditis
AF	<i>area fraction</i>
AV	Adenovirus
B19V	Parvovirus B19
DCM	dilatative Kardiomyopathie
DCMi	inflammatorische Kardiomyopathie
DBA	digitale Bildanalyse
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EBV	Epstein-Barr Virus
EMBs	Endomyokardbiopsien
EV	Enterovirus
IHC	Immunhistochemie
HEK	<i>human embryonic kidney</i>
HHV-6	humanes Herpesvirus Typ 6
HRPO	Meerrettich-Peroxidase ( <i>horseradish peroxidase</i> )
LV	linker Ventrikel
LVEF	linksventrikuläre Ejektionsfraktion
LVEDD	linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser
mab	monoklonale Antikörper ( <i>monoclonal antibody</i> )
MC	Myokarditis
nPCR	<i>nested</i> Polymerase-Ketten-Reaktion
NS1	<i>non-structural protein 1</i> (B19V nicht-strukturelles Protein 1)
PCR:	Polymerase-Ketten-Reaktion
qPCR	quantitative Polymerase-Ketten-Reaktion
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )

## 1 Einleitung

### 1.1 Historie, Definition und Ätiologien der Myokarditis

Die Herzmuskelentzündung wurde als wichtige Ursache für eine Herzinsuffizienz bereits durch Sénag und Corvisart angenommen (1, 2). Mit der Entwicklung von mikroskopischen Techniken und von histologischen Untersuchungsmethoden im 19. Jahrhundert wurde die pathogenetische Differenzierung der Herzinsuffizienz möglich. Rudolph Virchow unterschied eine parenchymatöse und interstitielle Entzündung des Herzens, und bemerkte, dass der von ihm gefundene Entzündungsprozess eine bedeutsame Ursache bei der Herzdilatation darstellt (3). Die Herzmuskelentzündung ist traditionell durch den Begriff "Myokarditis" belegt, welcher von Sobernheim 1837 erstmals eingeführt wurde, und somit die entzündliche myokardiale Schädigung als eigenständige Erkrankung abgrenzte (4).

Die Myokarditis wurde hier als eine kardiale Entzündung, die in unterschiedlichem Umfang die Myozyten, das interstitielle und perivaskuläre Bindegewebe sowie koronare Arteriolen, Kapillaren und, selten die großen epikardialen Herzkranzarterien einbezieht, beschrieben (4). Romberg stellte 1891 die Beziehung zu infektiösen Erkrankungen wie z.B. Typhus und Scharlach her (5), und Fiedler beschrieb 1897 das Wesen der isolierten idiopathischen interstitiellen Myokarditis (6). Eine virusbedingte infektiöse Ätiologie der kongestiven Herzinsuffizienz wurde erstmals 1967 von Braimbridge angenommen (7).

Die Myokarditis wird in den westlichen Ländern meistens durch kardiotope Viren verursacht. Viren bestehen aus Nukleinsäuren (DNA oder RNA) und besitzen keinen eigenen Stoffwechsel. Daher benötigen sie Wirtszellen für die eigene Vermehrung. In diesem Sinne können kardiotope Viren Herzmuskelzellen befallen, und benutzen die infizierten Zellen für ihre Multiplikation. Die häufigsten Viren sind Parvovirus B19 (B19V), das humane Herpes Virus Typ 6 (HHV6), Enteroviren (EV; v.a. Coxsackievirus B3), Adenovirus (ADV), Epstein-Barr-Virus (EBV), Hepatitis C-Virus (HCV), Cytomegalie-Virus (CMV), Polioviren und Influenza- und Rubellaviren (8-17). Eine Mono- oder Koinfektion mit mehreren Viren ist möglich, wobei das B19V mit 50% das am häufigsten nachweisbare Virus darstellt (9, 12, 16, 17). Eine Myokarditis

kann gelegentlich auch durch Bakterien, Parasiten und Pilze verursacht werden (18). Darüber hinaus sind toxisch bedingte Myokarditiden sowie Immunerkrankungen (z.B. Autoimmunerkrankungen wie systemische Kollagenosen) bekannt, die eine Myokarditis auslösen können (s. Tabelle 1).

Kühl et al. beschrieben eine Virusgenom-Prävalenz von 71% bei erwachsenen Patienten mit der klinischen Präsentation einer akuten Myokarditis (AMC). B19V war in diesem Patientenkollektiv neben HHV6, EV, EBV und ADV bei 50 % der Patienten das am häufigsten nachweisbare Virus, teilweise als Mehrfachinfektion mit den anderen o.g. Viren (Abbildung 1) (13). In einer weiteren Publikation beschrieben Kühl et al. eine ähnlich hohe Prävalenz und Verteilung von Virusgenomen in EMBs bei Patienten mit der klinischen Verdachtsdiagnose einer DCM (9).



**Tabelle 1: Hauptsächliche bekannte Ätiologien der Myokarditis (modifiziert von Schumacher et al. (19))**

Viren	Enteroviren (Coxsackieviren B1-B5; Coxsackieviren A4, A16; Echoviren 9, 22; Polioviren), Parvovirus B19, Adenoviren, Humanes Herpesvirus 6, Epstein-Barr-Virus, Humanes Zytomegalievirus, Influenzavirien, Mumpsvirus, Herpes-simplex-Virus, Varicella-Zoster-Virus, Masernvirus, Rötelnvirus, Hepatitis-B-Virus, Hepatitis-C-Virus, Humanes Immundefizienz-Virus
Bakterien	Borrelia burgdorferi (Lyme-Karditis), Staphylokokken, Pseudomonas, Proteus, Klebsiellen, Pneumokokken, Mykobakterien (Tbc), Meningokokken, Mycoplasm pneumoniae
Pilze	Candida, Aspergillen
Protozoen	Trypanosoma cruzi („Chagas disease“), Toxoplasma gondii
Immunreaktionen	Autoimmunmyokarditis, Rheumatische Karditis, Arzneimittelüberempfindlichkeit (Antibiotika, Diuretika, Antikonvulsiva), Systemischer Lupus erythematodes, Riesenzellmyokarditis, Sarkoidose, Hypereosinophile Myokarditis, Kawasaki-Syndrom, Transplantatabstoßung
Toxine	Corynebakterium diphtheriae (Exotoxin), Anthrazykline, Amphetamine, Katecholamine, Kokain, Alkohol

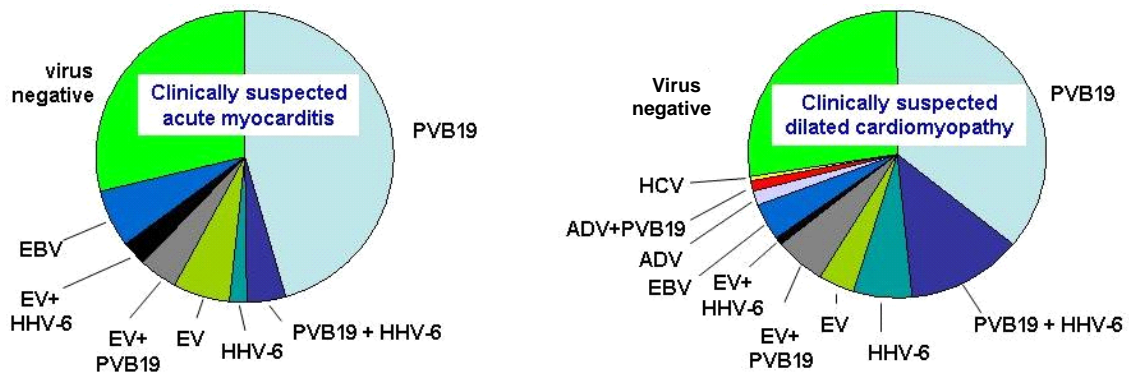
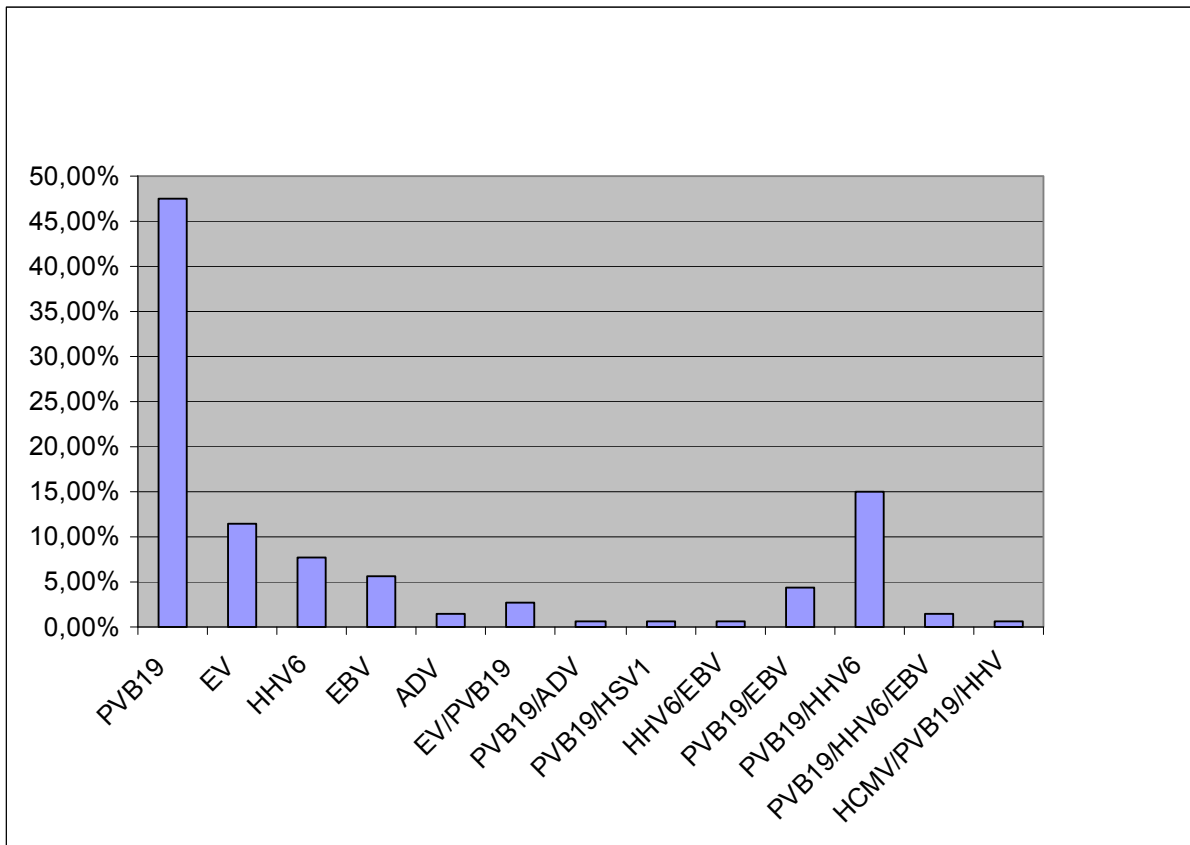


Abbildung 1: Häufigkeit der Nachweisbarkeit unterschiedlicher kardiotoxischer Viren in EMBs von AMC- und DCM-Patienten (9, 13).

Interessanterweise ist das Erregerspektrum in EMBs von pädiatrischen Patienten mit AMC und DCM ähnlich wie bei den adulten Patienten, wie von Schumacher et al. Beschrieben (s. Abbildung 2; (19)).



**Abbildung 2: Spektrum viraler Infektionen in Myokardproben von 330 Kindern und Jugendlichen - Viruspositiv n=141 (43%), Virusnegativ n=189 (57%) - bei histologisch gesicherter Myokarditis und dilatativer Kardiomyopathie (modifiziert von Schumacher et al. (19))**

Aus dieser Gegenüberstellung der Nachweisbarkeit von Virusgenomen in EMBs von AMC- und DCM-Patienten konnte angenommen werden, dass die Viruspersistenz ein entscheidender Faktor für die Entstehung der DCM aus der AMC heraus darstellen könnte. Diese Grundannahme wurde in einer weiteren wegweisenden Arbeit durch dieselbe Arbeitsgruppe bestätigt, in der gezeigt werden konnte, dass bei DCM-Patienten mit einer EMBs-gesicherten Viruspersistenz über 6 Monate eine progrediente Einschränkung der linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF) unter konstanter Herzinsuffizienz-Medikation dokumentiert wurde, während DCM-Patienten, die eine EMBs-gesicherte Viruselimination über diese Zeit aufwiesen, eine signifikante Verbesserung unter konstanter Herzinsuffizienz-Medikation zu

verzeichnen war. Diese Patienten wurden keiner zusätzlichen immunmodulatorischen Therapie unterzogen (20).

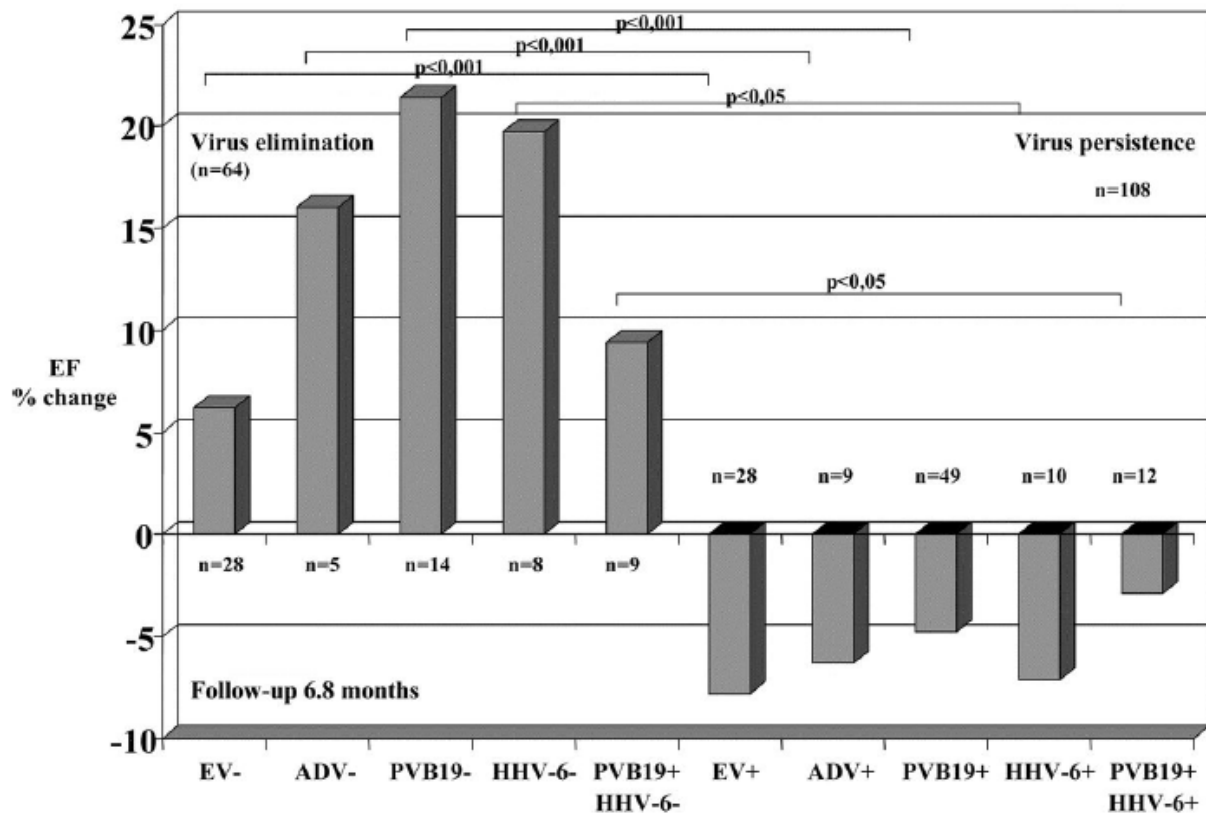


Abbildung 3. DCM-Patienten mit einer Viruselimination 6 Monate nach der initialen EMB Diagnostik zeigt eine Verbesserung der der LVEF, während DCM-Patienten mit einer Viruspersistenz eine progrediente Abnahme der LVEF vorweisen (20).

Diese Untersuchungen legten erstmalig nahe, dass das aus Tiermodellen stammende Konzept der Interaktion zwischen der kardiotropen Virusinfektion und der antiviralen Immunantwort prinzipiell auch im chronischen Stadium der humanen DCM gültig sein könnten (10, 13, 21, 22).

## 1.2 Klassifikation der Kardiomyopathien

Die Kardiomyopathien werden entsprechend der 1996 von der WHO (*World Heart Organization*) / ISFC (*International Society and Federation of Cardiology*) Task Force on the Definition and Classification of Cardiomyopathies publizierte Klassifikation (23) nach morphologischen, pathophysiologischen und funktionellen Kriterien unterteilt in:

Dilatative Kardiomyopathie (DCM)

Hypertrophe Kardiomyopathie (HCM)

Restriktive Kardiomyopathie (RCM)

Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie (ARVC)

Nichtklassifizierbare Kardiomyopathie (z.B. *non-compaction myocardium*).

Zu den spezifischen Kardiomyopathien werden sekundäre Herzmuskelerkrankungen gezählt, die mit herzspezifischen oder systemischen Erkrankungen assoziiert sind. Spezifische Kardiomyopathien sind demzufolge nicht mehr als „idiopathisch“ angesehen, sondern werden maßgeblich durch die zugrundeliegende Bedingung / Erkrankung verursacht, in deren Rahmen sie als „spezifisch“ klassifiziert werden. Diese entscheidende Neuerung im Vergleich zu der WHO-Klassifikation für Kardiomyopathien aus dem Jahre 1980, in der lediglich die Kardiomyopathie-Hauptformen beschrieben, und allesamt als primäre oder idiopathische Erkrankungen angesehen worden waren (24), basierte auf den enormen Wissenszuwachs hinsichtlich der Pathogenese der Kardiomyopathien. In diesem Zusammenhang ist der Progress auf dem Gebiet der Myokarditis und der sogenannten postmyokarditischen DCM zu sehen.

Die DCM ist durch eine häufig progrediente linksventrikuläre oder biventrikuläre Dilatation charakterisiert, verbunden mit einer Beeinträchtigung der systolischen und diastolischen Ventrikelfunktion. In histologischen Untersuchungen zeigen sich in Endomyokardbiopsien (EMBs) von DCM-Patienten neben allgemeinen Aspekten der Herzinsuffizienz (Fibrose, Hypertrophie, Verlust von Kardiomyozyten etc.) auch ein variables Ausmaß einer chronischen Herzmuskelentzündung (25). Unter Berücksichtigung der zwischenzeitlich gesicherten pathogenetischen Bedeutung

einer chronischen Herzmuskelentzündung für die DCM wurde in der aktuell gültigen Klassifikation der *WHO Task Force on the Definition and Classification of Cardiomyopathies* vom Jahre 1995 die „inflammatorische Kardiomyopathie“ (DCMi) eingeführt. Diese spezifische Kardiomyopathie ist durch eine Herzinsuffizienz mit Nachweis einer intramyokardialen Entzündung definiert (23). Bereits in dieser Klassifikation wurde vorweggenommen, dass infolge der ungleich höheren Sensitivität und Spezifität immunhistologischer Verfahren diese gegenüber den tradierten histologischen „Dallas Kriterien“ vorzuziehen sind. Es werden immunologisch bedingte und infektiöse Formen der DCMi unterschieden. In der westlichen Welt herrscht die virusinduzierte bzw. -assoziierte DCMi vor. In dieser Klassifikation wurden die DCMi und die genetisch bedingte DCM getrennt klassifiziert.

Eine im Jahr 2003 von der *American Heart Association* (AHA) etablierte Definition sieht vor, eine Herzmuskelerkrankung als „primär“ zu bezeichnen, bei der das Herz allein oder hauptsächlich involviert ist. Bei einer „sekundären“ Erkrankung ist die myokardiale Dysfunktion ein Teil einer systemischen Erkrankung (26). Diese Klassifikation ist auch nicht eindeutig, weil viele als primär definierte Kardiomyopathien eine extra-kardiale Manifestation zeigen können, während die Pathologie vieler als sekundär definierter Kardiomyopathien das Herz hauptsächlich betreffen können.

Daraufhin wurde im Jahre 2007 eine neue Klassifikation der Kardiomyopathien von der *European Society of Cardiology* (ESC) eingeführt (27, 28). Diese Klassifikation sollte eine klinisch vorteilhaftere Einteilung für die Diagnose und das klinische Management von Kardiomyopathie-Patienten auf der Basis der zwischenzeitlich neuen wegweisenden Publikationen darstellen. Hierbei sind Kardiomyopathien als Herzmuskelerkrankungen definiert, bei denen der Herzmuskel strukturelle und funktionelle Abnormitäten aufweist, die sich nicht durch eine koronare Herzerkrankung, eine arterielle Hypertonie, eine Herzklappenerkrankung, eine kongenitale Herzerkrankung oder sonstige sekundäre Faktoren (z.B. endokrine Erkrankungen wie Hyperthyreose, systemische Kollagenosen etc.) erklären lassen, was den vorangegangenen Kardiomyopathie-Klassifikationen der WHO entspricht. Eine wesentliche Neuerung ist, dass die Interaktion zwischen genetischer Grundlage und erworbenen ursächlichen Faktoren aufgenommen wurde.

Beispiele für familiäre/genetische DCM sind Mutationen der Sarkomer-Proteine, der zytoskeletalen Gene, von nukleären Membrangenen, oder von mitochondrialen Gene. Es wird aber auch Bezug auf eine Reihe offenbar noch nicht bekannter Gene bei familiärer DCM genommen. Als Auslöser für nicht-familiären Ursachen der DCM werden allen voran die Myokarditis und die Viruspersistenz, ferner das Kawasaki-Syndrom, das Churg-Strauss-Syndrom, Alkohol, eine DCM auslösende Medikamente (vor allem Chemotherapeutika), und Tachykardiomyopathien angeführt (27).

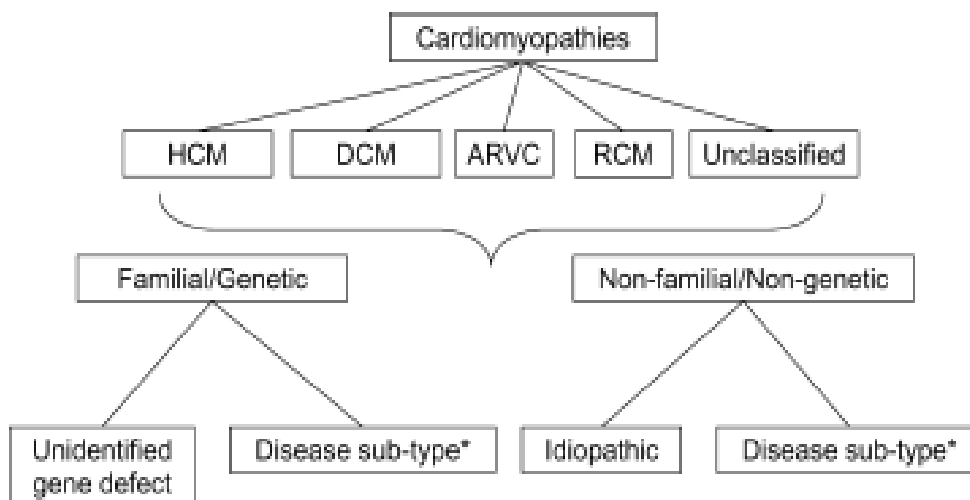


Abbildung 4: Zusammenfassung der Klassifikation der *ESC Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases* für Kardiomyopathien (27). HCM: hypertrophe Kardiomyopathien; DCM: dilatative Kardiomyopathien; ARVC: arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathien; RCM: Restriktive Kardiomyopathien.

### 1.3 Akute Myokarditis, DCM und DCMi

Kardiotrope Viren sind in der westlichen Welt die hauptsächlichen Auslöser einer akuten Myokarditis und der sich daraus entwickelnden DCM bzw. DCMi. Die meisten Myokarditis-Patienten können sich an eine vorangegangene grippeähnliche Infektion der oberen Luftwege oder des Gastrointestinaltrakts erinnern. Es ist bislang nicht

eindeutig geklärt, weshalb diese ubiquitär vorkommenden Viren bei nur wenigen Individuen eine myokardiale Beteiligung bzw. eine Infektion auslösen, und wie die AMC bei den meisten Individuen weitestgehend klinisch folgenlos ausheilt, während es bei anderen Patienten zu einer Manifestation einer DCM, DCMi mit oder ohne Viruspersistenz kommt (8, 10, 29). Eine genetische Prädisposition wird lange angenommen. Infolge einer Kreuzantigenität von viralen und myokardialen Strukturen können sekundäre Immunphänomene auftreten, die über die initial antivirale Immunantwort hinaus geht (30-35). Die initiale Infektion induziert nach HLA-restringierter Antigenprozessierung und –präsentation eine Aktivierung des Immunsystems gegen Virusproteine, wobei auch Antikörper gegen kryptische myokardiale Antigene entstehen können. Die dabei gebildeten Zytokine können unmittelbar kardiodepressiv und proarrhythmogen wirken. Die proinflammatorischen Zytokine induzieren diverse Zelladhäsionsmoleküle, die die Migration von gegen virale Proteine gerichteten Effektorzellen in das Myokard vermitteln. Hierdurch kann es zur immunvermittelten Myozytolyse kommen, die als Ursache der manchmal bei akuten Myokarditiden nachweisbaren Troponin- und CK-Erhöhung sowie auch der infarktähnlichen Repolarisationsstörungen und der pektanginösen Beschwerdesymptomatik führen können (13, 36).

Kann das Virusgenom vom Organismus rasch und effektiv eliminiert werden, heilt die Myokarditis rasch aus, da der infektiöse Auslöser nach der Viruselimination fehlt. Bei Viruspersistenz oder Induktion einer gegen kryptische kardiale Antigene gerichteten Autoimmunität kann es zu einer Persistenz der intramyokardialen Entzündung kommen, die einen zunehmenden Verlust kontraktile Elemente nach sich zieht (9, 13, 20). Beide Mechanismen führen letztendlich über eine „chronische Myokarditis“ zur Entwicklung einer inflammatorischen Kardiomyopathie, die aus der rein klinischen Diagnostik als DCM imponiert, wenn nicht zusätzlich eine immunhistologische und virologische EMBs-Diagnostik vorgenommen wird.

In den letzten zwei Jahrzehnten kam es zu bedeutenden Fortschritten in der Aufklärung der Pathogenese der Myokarditis durch die Einführung von im Vergleich zu den histologischen Dallas Kriterien weitaus sensitiveren immunhistologischen Diagnostik-Kriterien zur Erfassung der DCMi, sowie von molekularbiologischen Nachweisverfahren von Virusgenomen in EMBs. Letztlich konnten diese neuen Erkenntnisse eine Parallelität zu den auf tierexperimentellen Einsichten über den



Verlauf der AMC zur DCMi aufdecken. Diese fokussieren sich auf die Interaktion zwischen der Virusinfektion und der primär antiviralen, und sekundär antikardialen Immunantwort (10, 21, 30, 37, 38). Die Analyse der Einflüsse von genetischen Faktoren bei der humanen DCMi bleibt im Vergleich zu den tierexperimentellen Einblicken hingegen ungleich komplexer, und ist sicherlich im Gegensatz zu den tierexperimentellen Modellen in der weitaus überwiegenden Anzahl der DCM-Patienten nicht monogen (39).

#### **1.4 Pathogenese der inflammatorischen Kardiomyopathie (DCMi)**

Bei der idiopathischen DCM ist die Ätiologie der Erkrankung unbekannt. Man geht aber davon aus, dass sich bei einem entscheidenden Teil der Patienten das Krankheitsbild der idiopathischen DCM infolge einer durchgemachten Myokarditis, die primär nicht erkannt wurde, entwickelt (8, 10, 29, 30, 37). Dieser ätiopathogenetische Zusammenhang wird durch den Nachweis einer chronischen (virusassoziierten) Entzündung bei bis zu 60% der DCM-Patienten nahegelegt (21, 40, 41). Aufgrund dieser Befunde wurde die neue spezifische Kardiomyopathie-Entität der „inflammatorischen Kardiomyopathie“ (DCMi) definiert. Diese ist durch den histologischen/immunhistologischen Nachweis einer intramyokardialen Entzündung und/oder den molekularbiologischen Nachweis einer myokardialen Virusinfektion charakterisiert (23). Die molekularen Mechanismen der Viruspersistenz bzw. der Virus-assoziierten sowie immunvermittelten Myokardschädigung sind bisher nicht detailliert geklärt. Prinzipiell lassen sich direkt Virus-vermittelte und sekundäre, durch das Virus bedingte Mechanismen unterscheiden. So können z.B. Virusproteine der Coxsackieviren (Protease 2A) direkt durch Spaltung von Dystrophin zu einem Verlust der Integrität des Zytoskeletts führen (42). Auch bei einer nicht-replizierenden Infektion mit niedriger Kopienzahl sind virusinduzierte zytopathische Effekte nachweisbar (43). Als Folge der Virusinfektion kann aber eine chronische myokardiale Entzündungsreaktion resultieren. Hierbei wird durch die Präsentation von Virusfremdproteinen (44) das Immunsystem gegen diese Fremdantigene aktiviert. Das primäre Ziel der antiviralen Entzündungsreaktion ist die effektive Viruselimination, so dass aus einer akuten Herzmuskelentzündung nicht zwingend eine chronische myokardiale Entzündung resultieren muss (10). Sekundär kann sich

aber die virusinduzierte Immunantwort – wahrscheinlich bei gegebener genetischer Prädisposition – z.B. über ein molekulares Mimikry gegen körpereigene Herzmuskelproteine richten (35, 45). Bei Ausbildung einer postviralen Autoimmunität verselbständigt sich somit die Immunreaktion und persistiert unabhängig von dem Verlauf der Virusinfektion. Andererseits kann eine Viruspersistenz über die primär antivirale Immunität eine anti-kardiale Immunität aufrecht erhalten (10, 21, 31, 38, 46). Weiterhin spielen die durch den Immunprozess freigesetzten kardiodepressiv wirkenden Zytokine eine pathogenetisch wichtige Rolle (47-49). Die Zytokin-induzierte Expression von Zelladhäsionsmolekülen (CAMs) auf dem Gefäßendothel vermittelt die Migration von Immunzellen in das Myokard und begünstigt so den dynamischen Entzündungsprozess (40). Zytotoxische T-Lymphozyten (CTLs) und Komplement-vermittelte Immunprozesse sind für den durch Myozytolyse bedingten kontinuierlichen Verlust an kontraktilelementen verantwortlich (50).

Es ist bisher nicht geklärt, ob diese für die myokardiale CBV-Infektion geltenden Pathomechanismen auf alle kardiotropen Viren übertragbar sind. Der beschriebene Vaskulotropismus von B19V sowie die Assoziation mit endothelialer Dysfunktion bei DCMi (51-53) lassen vermuten, dass zumindest für das B19V ein von den CBV unterschiedliches Infektionsmuster und letztlich auch andere, bislang unbekannt Pathomechanismen vorherrschen.

### **1.5 Epidemiologie der Parvovirus B19 (B19V) Infektionen**

Parvovirus B19 (B19V) Infektionen kommen weltweit vor. Fälle können sporadisch oder gruppiert auftreten. Die B19V Replikation findet im Knochenmark statt. Man geht davon aus, dass die Übertragung der Infektion von Person zu Person über die Atemwege erfolgt, und auch die Übertragung von Blutprodukten scheint eine nicht unwichtige Rolle zu spielen (54). Die Anzahl der Menschen mit messbarem Titer von B19V-spezifischem IgG nimmt mit zunehmendem Alter zu. Gemessen an dem Vorkommen von B19V-IgG beträgt die Durchseuchungsrate mit B19V bei Kindern im Vorschulalter etwa 5-10%. Bei Erwachsenen finden sich bei mehr als 70% messbare Titer von B19-spezifischen IgG-Antikörpern (55, 56). Bei ca. 30-40% schwangerer

Frauen besteht ein Mangel an B19-IgG-Antikörpern. Sie und auch die ungeborenen Kinder können somit von einer B19V-Infektion gefährdet sein (57-59).

### 1.6 Parvovirus B19 (B19V)

Parvovirus B19 (B19V) wurde erstmals 1975 von Yvonne Cossart als pathogenes Agens einer humanen Infektion beschrieben. Sie beobachtete eine abnorme Reaktion eines Spenderserums in einer Hepatitis-B-Reihenuntersuchung in Position 91 auf der Platte B (60). B19V ist mit einem breiten Spektrum von menschlichen Erkrankungen und Befall verschiedener Organsysteme assoziiert worden: Neben dem Erythema infectiosum (61) sind in den letzten zwei Dekaden zunehmend weitere Erkrankungen des Kindes- und Erwachsenenalters beschrieben worden, unter anderem hämatopoetische Erkrankungen (Anämie, aplastische Anämie, Thrombozytopenie, Panzytopenie), Hydrops fetalis, Spontanabort, Hepatitis, Arthropathie, Vaskulitis, neurologische Erkrankungen, *chronic fatigue* Syndrom, angeborene Herzerkrankungen und die Myokarditis (AMC/DCM) bzw. DCMi (13, 16, 62-65).

Das B19V ist ein Einzelstrang-DNA-Virus mit einem linearen Genom von ca. 5,1 Kb Länge. B19V ist Mitglied der Gruppe der Erythroviren innerhalb der Parvoviridae-Familie, in der es den einzigen humanpathogenen Erreger darstellt. Parvoviren produzieren kleine Kapside mit einem Durchmesser von ca. 25 nm. Das Virusgenom kodiert drei Proteine: Die zwei strukturellen Proteine, die viralen Proteine 1 und 2 (VP1 ca. 84 kDa und VP2 ca. 58 kDa) entstehen aus alternativem *splicing*. VP1 unterscheidet sich von VP2 nur durch 226 zusätzliche Aminosäuren am aminoterminalen Ende. Der größte Anteil des Viruskapsids besteht zu 95% aus dem VP2, während das VP1 nur mit 5% an den 60 Capsomeren beteiligt ist. VP1 hat eine Calcium-abhängige Phospholipase A2 (PLA2) enzymatische Aktivität, und vermittelt damit den Viruseintritt in die Zielzellen (66). Während einer aktiven Infektion wird ein drittes Protein gebildet, das NS1 (*non-structural protein 1*). Dieses ist an der Virusreplikation beteiligt und hat ein zytotoxisches Potential durch die Induktion von Apoptose (67, 68). VP1 enthält einen Anteil, das aus der Oberfläche der Zelle herausragt und als Funktion die Interaktion mit dem zellulären Rezeptor hat. Als zellulärer Rezeptor des B19V wurde das Glycosphingolipid Globosid

(Globotetraosylceramid, Gb4Cer) identifiziert (69). Das Globosid ist auf erythroiden Vorläuferzellen und Erythrozyten vorhanden und stellt das Blutgruppen-Antigen-P dar. Der Rezeptor ist für die Infektion notwendig, so dass Individuen ohne P-Phänotyp eine natürliche Immunität gegen B19V besitzen (54). Das P-Antigen ist auch auf anderen Zellen wie endothelialen Zellen und fetalen myokardialen Zellen vorhanden (70, 71). *In vivo* Studien zeigten, dass für die Bindung von B19V an Zielzellen, Gb4Cer nicht alleine ausreicht, sondern  $\alpha v_5\beta_1$ -Integrine als Co-Rezeptoren für den B19V-Eintritt in die Zielzellen benötigt (72-74).

Die antivirale Immunantwort auf eine B19V-Infektion lässt sich auf die T-Zell-vermittelte und die humorale Immunantwort unterteilen (65, 75, 76). Aus serologischen Untersuchungen ist bekannt, dass NS1-spezifische Antikörper in der chronischen, aber nicht in der akuten Erkrankungsphase detektierbar sind (77, 78). Andererseits indizieren Anti-VP-Antikörper das akute Infektionsstadium bzw. die Rekonvaleszenz nach einer akuten Infektion. Insbesondere die Anti-VP-2 Antikörper scheinen für die Kreuzreaktivität mit humanen Proteinen verantwortlich zu sein (79).

Die humorale Antwort von B19V Infektionen kann durch gut charakterisierte neutralisierende monoklonale Antikörper charakterisiert werden. Es gibt 4 monoklonale Antikörper (mab) gegen B19V; mab 1424 spezifisch für NS1, mab 1418-1 spezifisch für VP1, mab 1418-16 spezifisch für VP1, mab 860-55D spezifisch für VP2 (*major capsid protein*). VP1 und VP2 spezifische mab haben bei einer Konzentration von 0,08  $\mu\text{g/ml}$  bzw 0,75  $\mu\text{g/ml}$  die Fähigkeit, 50 % der B19V-Infektionen zu neutralisieren. NS1 spezifische mab hat eine schwache neutralisierende Tätigkeit und erforderte eine Konzentration von 47,7  $\mu\text{g/ml}$  für eine 50 % Neutralisation (80-83). Humane mabs mit starker neutralisierender Tätigkeit können für die Immuntherapie von chronisch B19V-infizierten Patienten und akut infizierten schwangeren Frauen eingesetzt werden (82).

Neben molekularbiologischen Methoden können gegen B19V-Proteine gerichtete Antikörper zur immunhistologischen Diagnostik der B19V-Infektion eingesetzt werden (65, 84). Die kommerziell erhältlichen Antikörper sind jedoch gegen die VP1 und VP2 Proteine gerichtet, während derzeit keine diagnostischen anti-NS1-Antikörper erhältlich sind.

## 1.7 Immunmodulatorische Therapiestrategien bei der DCMi

„Die Herzmuskelentzündung ist schwierig zu diagnostizieren, und selbst wenn sie diagnostiziert werden sollte, kann sie dann effektiver behandelt werden?“ Dieses Zitat von Jean Baptiste Sénag, Arzt von Louis XV aus dem Jahre 1772 (1), sollte noch mehr als zwei Jahrhunderte Bestand haben, ehe moderne diagnostische Verfahren eine ätiopathogenetische Differenzierung der inflammatorischen Kardiomyopathie ermöglichten und die Grundlage für rationale Therapiekonzepte bildeten, die sich in aktuellen randomisierten Studien als effektiv erwiesen haben, und auf deren Basis nunmehr Multicenter-Studien initiiert wurden, deren Ergebnisse abgewartet werden sollten, bevor diese therapeutischen Prinzipien möglicherweise in „*evidence based medicine*“ transferieren werden.

Die Erfolge einer medikamentösen immunsuppressiven Therapie (Corticosteroide, häufig kombiniert mit Cyclosporin oder Azathioprin) waren in publizierten Einzelfällen von widersprüchlichen Resultaten. Die negativen Ergebnisse der randomisierten multizentrischen amerikanischen Myokarditis-Immunsuppressions-Studie zeigten, dass bei nach den Dallas-Kriterien gesicherter Myokarditis eine immunsuppressive Therapie keinen signifikanten Vorteil hinsichtlich der Mortalität und Herzinsuffizienz-Symptomatik erzielte (85). Dies ist hauptsächlich auf folgende Faktoren zurückzuführen (86):

- 1) Die mit den histologischen Dallas-Kriterien assoziierten diagnostischen Probleme (s.o.) lassen keine hinreichend hohe Sensitivität und Spezifität der Diagnose der intramyokardialen Entzündungsreaktion im Sinne einer DCMi zu (21, 41, 87-89).
- 2) Bei den in dieser Studie eingeschlossenen Patienten wurde nicht der Spontanverlauf der Myokarditis abgewartet, so dass in der Kontrollgruppe eine hohe Spontanremissionsrate zu verzeichnen war (8, 21, 90-92).
- 3) Patienten mit einer bioptisch gesicherten Viruspersistenz wurden von dieser Studie nicht ausgeschlossen (13, 20, 21, 87).

Unter Einsatz der immunhistologischen Kriterien für eine erhöhte T-lymphozytäre Infiltration und/oder verstärkte CAMs-Expression nach Ausschluss einer Viruspersistenz und einer Spontanremission bei DCM-Patienten (somit Ausschluss von AMC) berichtete eine immunsuppressive Pilotstudie mit Corticosteroiden positive Effekte auf die Entwicklung der Herzinsuffizienz-Symptomatik und der Hämodynamik und führte zu einer Abnahme der lymphozytären Infiltration sowie der CAMs-

Expression (HLA class I und HLA DR) (93). Kürzlich wurden in einer randomisierten Immunsuppressions-Studie über 3 Monate mit Corticosteroiden und Azathioprin ein positive Langzeit-Effekte über 2 Jahre bei Patienten mit endomyokardbiotisch nachgewiesener verstärkter Expression von CAMs (HLA class I und HLA DR) im Sinne einer inflammatorischer Kardiomyopathie (n=84) demonstriert, gleichwohl hinsichtlich der primären Studienendpunkte (Tod, Herztransplantation und Rehospitalisierung) und Herzinsuffizienz-Symptomatik (41). Diese Studie demonstrierte erstmalig, dass eine 3-monatige immunsuppressive Therapie ausreichend ist (im Gegensatz zu den häufig angewandten 6-Monats-Therapien), um positive Langzeit-Effekte, bezogen auf hämodynamische Parameter, die linksventrikuläre Diameter und auf die subjektive Herzinsuffizienz-Symptomatik, über 2 Jahre nach Beendigung der Therapie zu erzielen. Eine signifikante Verbesserung dieser Parameter war 2 Jahre nach Studienbeginn bei 72% der immunsuppressiv Behandelten versus 21% in der Placebo-Studiengruppe zu verzeichnen. Teleologisch betrachtet wurde durch diese Studie auch die Hypothese bestätigt, dass eine verstärkte CAMs-Expression für die verlässliche Diagnostik einer intramyokardialen Entzündung und Selektion von Patienten, die von einer immunsuppressiven Therapie profitieren, hinreichend sensitiv und spezifisch ist (94), und erbringt eine valide Grundlage für die Hypothese, dass eine koordinierte CAMs-Induktion als hinreichend sensitives und spezifisches Charakteristikum der DCMi darstellt, auch ohne eine begleitende Bestätigung einer pathologisch erhöhten immunkompetenten Infiltration, da diese Prozesse eng miteinander assoziiert sind (Zytokininduktion, CAMs-Induktion und transendotheliale Migration von immunkompetenten Zellen).

Ein weiteres immunsuppressives Verfahren, die Immunadsorption, zeigte in einer randomisierten Studie positive hämodynamische Effekte bei DCM-Patienten (95). Der Wirkmechanismus der Immunadsorption beschränkt sich wahrscheinlich nicht nur auf die Elimination von Autoantikörpern, sondern könnte auch die Elimination von zirkulierenden immunkompetenten Faktoren wie Zytokine oder lösliche CAMs bedingen. Diese Effekte könnten gemeinschaftlich dafür verantwortlich sein, dass es unter Immunadsorption zu einer biotisch nachweisbaren Abnahme der T-lymphozytären Infiltration und Abnahme der Expression von endothelialen CAMs kommt (96). Eine multizentrische Studie steht noch aus, um dieses Konzept als

allgemein akzeptiertes Therapieverfahren bei DCM einzuführen. Es ist bislang nicht geklärt, ob die Viruspersistenz bei diesem therapeutischen Konzept berücksichtigt werden sollte.

Ergebnisse der Immunsuppressions-Studie von Frustaci et al. bei immunhistologisch gesicherter DCMi bestätigen die tierexperimentellen Beobachtungen, dass eine Immunsuppression bei Viruspersistenz kontraindiziert ist und mit einer weiteren Verschlechterung der Kontraktilität, Herzinsuffizienz-Symptomatik und einer schlechteren Prognose assoziiert ist (97). Die Grundüberlegung ist hierbei, dass eine Immunsuppression die antivirale Aktivität des Immunsystems hemmt und somit eine Viruspersistenz fördert (98). Die antivirale Effizienz des Zytokins Interferon wurde in vitro und in vivo demonstriert (99, 100). In einer Pilotstudie wurden 22 DCM-Patienten mit nachgewiesener enteroviraler (n=14) und adenoviraler Persistenz (n=8) mit  $18 \times 10^6$  IU subkutan verabreichten Interferon- $\beta$  pro Woche über 6 Monate behandelt. In den hiernach untersuchten Verlaufsbiopsien war kein virales Genom mehr nachweisbar. Unter dieser Interferon- $\beta$ -vermittelten Elimination viralen Genoms wurde auch ein signifikanter ( $p < 0,001$ ) Anstieg der LVEF von 44% auf 53% verzeichnet, gefolgt von einer signifikanten Abnahme des linksventrikulären enddiastolischen Diameters von 67 auf 62 mm sowie einer Verbesserung der Herzinsuffizienz-Symptomatik. Diese vorteilhaften Effekte waren auch 6 Monate nach Beendigung der antiviralen Interferon- $\beta$  Therapie an (101). Diese präliminären Ergebnisse sind mit den Erkenntnissen aus Tierexperimenten vereinbar, die zeigen, dass mit der Etablierung einer immunvermittelten Viruselimination (entweder spontan oder durch pharmakologische Unterstützung) die antivirale Immunreaktion idealerweise auch unterbrochen wird, und lediglich eine geringgradige interstitielle Fibrose ohne nachhaltige Einschränkung der ventrikulären Kontraktilität verbleibt (10). Die Ergebnissen dieser Pilotstudie gaben Anlass, die multizentrische, randomisierte BICC-Studie (*Bioferon® In Patients with Chronic Viral Cardiomyopathy*) zu initiieren.

Die therapeutischen Erfolge der Immunglobulin-Therapie bei DCMi Patienten sind noch nicht hinreichend geklärt. Die erste randomisierte Studie bei AMC Patienten konnte keine signifikanten Effekte vorweisen (91). Dies ist möglicherweise wiederum auf die hohe Spontanremissionsrate der Kontrollkohorte zu sehen, und unterstreicht, dass der natürliche Verlauf der AMC abgewartet werden muss, und erst bei sich

abzeichnender Chronifizierung der linksventrikulären Funktionseinschränkung, Dilatation und Herzinsuffizienz-Symptomatik eine immunmodulatorische Therapie erwogen werden sollte (92). Derzeit wird eine randomisierte Studie bei Patienten mit DCMi und B19V Nachweis durchgeführt, deren Ergebnisse aber noch ausstehen (102, 103).

### **1.8 Immunhistologische Detektionsverfahren der DCMi**

Die immunhistochemische Diagnostik besitzt ein hohes diagnostisches Potential, das weit über die Möglichkeiten einer rein histologischen Analyse hinausgeht. Die Immunhistochemie ist als Verfahren besser als andere Nachweismethoden, weil sie unter Verwendung spezifischer Antikörper in der Lage ist, sowohl gering ausgeprägte Antigene sensitiv zu erfassen und zu quantifizieren, als auch qualitative Aussage über das Expressionsmuster und Lokalisation des zu nachweisenden Antigens zu machen (40, 104). Immunhistologisch gefärbte Gewebsschnitte eignen sich auch zur Quantifizierung der Proteinexpression, visuell semiquantitativ oder quantitativ, z.B. mittels farbkodierter digitaler Bildanalyse (DBA) (29, 40, 48, 52, 88, 104-106). Die Immunhistochemie bietet auch die Möglichkeit, über Verwendung fluoreszierender Marker unter Einsatz der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie Kolo-kalisation verschiedener Antigene aufzuzeigen (107).

Für den Nachweis der entsprechenden Antigene sind monoklonale und auch polyklonale Antikörper einsetzbar. Während polyklonale Antikörper das Produkt mehrerer verschiedener Plasmazellen darstellen, werden monoklonale Antikörper von einem Plasmazellklon als Reaktion auf ein Antigen ausgeschüttet. Letztere heben sich insbesondere durch ihre weitreichende Homogenität sowie leichte Charakterisierbarkeit hervor.

In der Systematik der Immunhistochemie unterscheidet man die direkte und die indirekte Farbmethode. Bei der direkten Methode wird das Antigen mit Hilfe eines spezifischen und Enzym-konjugierten Antikörpers detektiert.

Bei der indirekten Methode bindet ein spezifischer unkonjugierter Primärantikörper, der mit einem enzymgekoppelten Sekundärantikörper reagiert. Zu der indirekten Färbemethode gehört die Avidin-Biotin-Komplex- (ABC) Methode, die eine hohe Sensitivität besitzt (108). Darüber hinaus bietet die EnVision® Technik eine bis zum



ca. 80fache Signalampifikation, ohne das mit der ABC-verbundene Problem der unspezifischen Hintergrund-Markierung durch endogene Avidin- und Biotin-Expression des Gewebes, deren Blockierung vor der Färbereaktion nicht immer vollständig gelingt, zu erkaufen. Diese EnVision® Technik bedient sich polymergekoppelter Sekundärantikörper, die auf den Polymeren ca. 80 Enzyme (z.B. Meerrettich-Peroxidase / HRPO) tragen, und somit zur Signalampifikation des präzipitierten Chromogens beitragen (48, 109, 110).

### **1.9 Zielsetzungen der Promotionsarbeit**

Die Zielstellung dieser Studie war einerseits, die humorale Immunantwort gegen B19V (B19V) Proteine bei Patienten mit der klinischen Präsentation einer AMC oder DCM zu charakterisieren.

Andererseits sollte der immunhistologische Nachweis von B19V-Proteinen und deren Expressionsmustern in EMBs von DCM-Patienten, sowie die Assoziation mit nPCR-Standard-Nachweisen von B19V-Genomen aufgearbeitet werden.

Diese Untersuchungen sollten die diagnostische Wertigkeit der Charakterisierung der humoralen B19V-Immunantwort sowie die immunhistologischen Detektierbarkeit von B19V Proteinen in EMBs von AMC und DCM Patienten für die Einteilung des B19V Infektionsstadiums (humorale B19V-Immunantwort) und die myokardiale B19V Proteinexpression ergründen.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Patienten

Für die Charakterisierung der humoralen B19V-Immuntwort wurden Seren und EMBs von 62 Patienten mit dem klinischen Verdacht auf AMC und DCM untersucht. DCMi-Patienten, die aufgrund einer Verlaufsuntersuchung biopsiert wurden, und DCMi-Patienten, die sich unter einer immunmodulatorischen Therapie (antivirale Interferon- $\beta$  oder immunsuppressive Therapie) befanden, wurden aus dieser Studie ausgeschlossen. Im Detail wurden 33 Patienten mit der klinischen Verdachtsdiagnose einer AMC mit plötzlich auftretenden Symptomen wie Angina pectoris oder Dyspnoe mit signifikant erhöhten myokardialen Ischämie markern (Troponin T und/oder Kreatininkinase/Kreatininkinase-MB / CK/CK-MB) und/oder neu aufgetretene EKG-Veränderungen (ST-Strecken-Hebungen oder T-Wellen-Negativierung). Die meisten AMC-Patienten berichten über eine vorangegangene Episode grippeähnlicher Symptomatik. Patienten mit der klinischen Verdachtsdiagnose DCM (n=29) waren durch lang bestehende Herzinsuffizienz-Symptome (Belastungsdyspnoe; > 6 Monate), eine ausgeprägte LV-Dysfunktion (LVEF<45%) und/oder LV-Dilatation charakterisiert. Die demographischen und klinischen Parameter der Patienten sind in der Tabelle 2 zu entnehmen. Der Beginn der Krankengeschichte wie in Tabelle 2 angegeben beinhaltet den Anfang der Herzinsuffizienz-Symptomatik oder Angina pectoris und die vorangegangene grippeähnliche Symptomatik.

Des Weiteren wurden die Seren von 16 gesunden hinsichtlich Alters und Geschlechts (31% weiblich,  $44 \pm 14$  Jahre) *gematchten* gesunden Kontrollprobanden ohne anamnestischen Hinweis auf eine akute oder chronische Infektionserkrankung, eine Autoimmunerkrankung oder sonstige chronische Erkrankung auf anti-B19V-Antikörper untersucht.

In einer zweiten Gruppe von 30 DCM-Patienten wurden EMBs neben dem nPCR Nachweis von Virusgenomen immunhistochemisch mittels Antikörper-Färbemethoden auf die B19V Proteinexpression in EMBs untersucht. Eine Kontroll-Patientengruppe von gesunden Probanden konnte infolge ethischer Restriktionen nicht zum Vergleich in diesem Teilgebiet herangezogen werden.

Eine koronare Herzkrankheit wurde in allen Patientengruppen mittels Koronarangiographie ausgeschlossen, ebenso wie weitere mögliche sekundäre Ursachen von LV-Dysfunktion (z.B. valvuläre Herzkrankheit, arterieller Hypertonus und Diabetes mellitus). Die Studie wurde von der Ethik-Kommission der Charité – Universitätsmedizin Berlin im Rahmen des Sonderforschungsbereiches Transregio 19 (SFB TR19) "Inflammatorische Kardiomyopathie – Molekulare Pathogenese und Therapie" genehmigt. Die schriftliche Zustimmung von allen Patienten und gesunden Kontrollprobanden, die an dieser Studie teilnahmen, lag vor. Diese Arbeit ist in Übereinstimmung mit der "Deklaration des Weltärztebundes zu Ethischen Grundsätzen für die medizinische Forschung am Menschen von Helsinki" (111).

## **2.2 Entnahme und Prozessierung der Endomyokardbiopsien für die anti-B19V VP1/VP2 Immunhistologie**

Die Prozedur der EMBs-Entnahme aus dem rechtsventrikulären Septum und die geringen, zu diagnostischen Zwecken vertretbaren periprozeduralen Risiken erfolgte nach publizierten Verfahren durch interventionell erfahrene Kardiologen des CharitéCentrums 11 am Campus Benjamin Franklin der Charité – Universitätsmedizin Berlin (9, 13, 20, 89, 101, 112). Die Vena und Arteria femoralis wurden in nach Lokalanästhesie mit Hilfe der Seldinger-Technik punktiert. Es erfolgte die Sondierung der unteren Hohlvene, des rechten Vorhofs und des rechten Ventrikels, sowie die retrograde Sondierung der Aorta und des linken Ventrikels, eine Druckregistrierung und die Darstellung der anatomischen Verhältnisse unter Fluoroskopie und biplane Ermittlung der LVEF. Anschließend erfolgten nach Ausschluss von koronarer Herzkrankheit und andere mögliche Ursachen einer LV-Dysfunktion (z.B. arterieller Hypertension, valvuläre Herzerkrankungen, metabolische Krankheiten), die Entnahme von EMBs aus dem rechtsventrikulären Septum mittels eines flexiblen Biotoms (Cordis, Hilden). Die EMBs wurden unmittelbar nach der Entnahme in Tissue Tec® (SLEE, Mainz) eingebettet. Nach Einbettung in Tissue Tec®, wurden die EMBs in Flüssigstickstoff gekühltem Methylbutan schockgefroren und bei -80°C tiefgefroren bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert (13, 20, 40, 112).

### **2.2.1 Material und Reagenzien zur Herstellung von Gefrierschnitten aus EMBs**

Tissue Tek, O.C.T. Compound, Sakura, Niederlande

Methylbutan, Merck, Darmstadt, Deutschland

Flüssigstickstoff, Messer-Griesheim, Deutschland

Poly-L-Lysin, Sigma, Darmstadt, Deutschland

Aceton, Merck, Darmstadt, Deutschland

Objektträger 76 x 26 x 1 mm, Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland

Kryostat Jung CM 3000, Leica, Bensheim, Deutschland

Super Pap Pen, Immunotech, Marseille, Frankreich

### **2.2.2 Prozedere**

Um die Proben weiter zu verarbeiten wurden sie aus der -80°C Lagerung einschließlich der Tissue Tek® Umhüllung entnommen und direkt in 5 µm dicken Kryoschnitten geschnitten.

Die 5 µm dicken Schnitte wurden bei -30°C am Kryostaten Jung CM 3000 (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Bensheim, Deutschland) angefertigt. Die Schneidetemperatur (Kammertemperatur und ggf. Objekttemperatur) wurde eingestellt und alle für die Objektpräparation benötigten Arbeitsmittel in den Kryostaten gelegt. Nachdem der Messerhalter eingebaut und das Messer im Kryostaten vorgekühlt wurde (vor Aufnahme des Schneidebetriebes wurden alle Teile des Kryostaten im Minusbereich temperiert), wurde die Objektplatte in die Objektplattenaufnahme am Objektkopf geklemmt, die Objektplatte orientiert und fixiert. Das Messer wurde dann in den Messerhalter geklemmt und die Inklinationwinkel am Messerhalter auf 4-6° eingestellt und das Messer zur Probe ausgerichtet. Die Proben wurden dann manuell angeschnitten, anfänglich mit ca. 20 µm Schnittdicke, bis relevantes EMBs-Material zur Darstellung kam, und dann auf 5 µm Schnittdicke verringert. Erforderlichenfalls wurde der Gewebsblock nachjustiert, und dann wurden die seriellen 5 µm dicken EMBs Kryoschnitte angefertigt. Die 5µm dicken EMBs-Kryoschnitte wurden auf beschichteten Objektträgern aufgebracht. Die Objektträger wurden für 5 Minuten mit 10%-igem Poly-L-Lysin beschichtet, um eine

bessere Haftung des Gewebes auf der Glasfläche zu gewährleisten. Die Fixierung erfolgte über 10 Minuten in eiskaltem Aceton mit anschließender Lufttrocknung.

### **2.3 Immunhistochemie auf B19V-VP1/VP2 in EMBs**

Die in Poly-L-Lysin beschichteten Objektträger mit den fixierten Gewebeschnitten wurden beschriftet und blind untersucht. Die Färbung wurde wie in der Literatur beschrieben durchgeführt (40, 110). Es wurde ein monoklonaler Antikörper gegen ein gemeinsames Epitop auf den VP1 und VP2 Strukturproteinen von B19V, Aminosäure 328-34 des VP2 Capsids (Klon R92F6; Novocastra, Newcastle, UK), in 1:20 Verdünnung verwendet. Als sekundärer Antikörper wurde ein EnVision® Peroxidase-konjugierter *rabbit-anti-mouse* Antikörper (DakoCytomation, Hamburg, Deutschland) eingesetzt (109). Die IHC Färbung wurde mit 3-Amino-Ethylcarbazole (Merck, Darmstadt, Deutschland) als chromogenem Substrat visualisiert. Die Objektträger wurden anschließend, mit Hämatoxin gegengefärbt und mit Kaiser's Glyceringelatine® (Merck, Darmstadt, Deutschland) blasenfrei montiert. Das Prozedere wurde für alle Proben gleichermaßen und parallel wie unten beschrieben durchgeführt.

#### **2.3.1 Material und Reagenzien für die immunhistochemische Färbung**

Deckgläser 24 x 50 mm (Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland)

Kaiser's Glyceringelatine® (Merck, Darmstadt, Deutschland)

EnVision<sup>+</sup> system (DakoCytomation, Hamburg, Deutschland)

25x PBS (*phosphate buffered saline*): 200 g NaCl, 5 g KCl, 6,25 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ :

33,75  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$  in 800 ml Aqua dest. auf 1 l Aqua dest., pH auf 7,3 adjustiert

0,2 M Na-Acetat: Na-Acetat-Trihydrat (MG 136,08 g/mol): 27,2 g ad 1 Liter Aqua dest.

0,2 M Essigsäure: 11 ml Essigsäure (96 – 100%) auf 1 Liter Aqua dest.

Carbazol-Färbelösung: 1 Küvette ~ 200 ml Küvette ~ 200 ml; 50 mg 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) in 10 ml NN-Dimethylformamid (Merck, Darmstadt,

Deutschland) in einer Glasküvette unter der Dunstabzugshaube aufgelöst; in einem Glasgefäß; 35 ml 0,2M Na-Acetat, 15 ml 0,2M Essigsäure, 150 ml Aqua dest. Mischen. Diese Reaktionslösung und 100 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in die Küvette mit AEC geben, die das aufgelöste AEC enthält und das Schiffchen mit den zu färbenden Präparaten in die Küvette legen. 12 Minuten in Dunkelheit färben schütteln.

### **2.3.2 Immunhistologische Färbungsreaktion**

5 Min. Blockade der endogenen Peroxidase 0,5 ml 30% Wasserstoffperoxid / 199,5 ml PBS Puffer

2 x 5 Minuten waschen im PBS-Puffer

Inkubation mit dem Primärantikörper Clone R92F6 (a.a. 328-344 of VP2) 1:50 (PBS-Puffer / 10 % FCS) 70µl auf das Schnittfeld geben; Vorsicht! Schnitte nicht zerkratzen!! Für 45 Minuten inkubieren.

2 x 5 Minuten waschen im PBS-Puffer

Inkubation mit dem Sekundärantikörper (EnVision® Mouse/Rabbit, gebrauchsfertig) 70µl auf das Schnittfeld pipetieren für 30 Minuten

2 x 5 Minuten waschen im PBS-Puffer

Färbelösung: 150 ml dest. Wasser +35 ml Na Acetat 0,2 molar +15 ml Essigsäure 0,2 molar

Substratlösung: Carbazol 50 mg pro Küvette (unterm Abzug abwiegen!!) in 10 ml Dimethylformamid lösen (schwenken!) dann 200 ml Färbelösung zugeben im Dunkeln 100 µl 30% Wasserstoffperoxid zugeben, dann Schnitte im Dunkeln (unter einer Kiste) für 12 Minuten inkubieren

2 x 5 Minuten waschen im PBS-Puffer (Reste der Lösung als Gift-Abfall entsorgen!)

Gegenfärbung: Schnitte in eine Küvette mit Hämatoxylin für 30 Min. geben

waschen 1 x in kaltem Leitungswasser, dann ca. 6 x Wasser wechseln (10 Minuten in warmem Wasser bläuen)

Eindecken: Schnitte mit 2 x 100 µl Glyceringelatine (auf 40°C erwärmt) und Deckgläsern 24 x 50 mm blasenfrei eindecken.



#### **2.4 Überprüfung der Spezifität des B19V-VP1/VP2 Antikörpers an pB19-M20 infizierten HEK293T Zellen**

Die Spezifität der verwendeten Anti-B19V Antikörper wurde auf B19V Plasmid pB19-M20 transfizierten HEK293T (*human embryonic kidney cells 293T*) Zellen untersucht. HEK293 T Zellen wurden in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco BRL, Karlsruhe, Deutschland) angereichert mit 10% FBS (*fetal bovine serum*; Gibco BRL, Karlsruhe, Deutschland) und 1% Penicillin/Streptomycin (PAA, Pasching, Deutschland) kultiviert. Die Plasmid-Transfektion erfolgte mittels einer Calciumphosphat Transfektion. Die Zellen wurden in 4 mm Zellkulturschalen mit einer Dichte von  $3 \times 10^5$  Zellen pro Schale inkubiert. Die Transfektion erfolgte mit 3  $\mu\text{g}$  Plasmid pro Schale in Anwesenheit von DMEM, angereichert mit 10% FBS und 1% Penicillin/Streptomycin für 48 Stunden. Nach einer dreimaligen Waschung in PBS-Puffer erfolgte das Permeabilisieren mit 1 ml TBS Lösung, welche 4% Formaldehyd und 0,5% Triton X 100 beinhaltet.

Diese kultivierten Zellen wurden mit anti-B19V monoklonalen Maus-Antikörpern in einer 1:20 Dilution in PBS/10%FBS für 1 Stunde inkubiert. Nach 2maligem Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation mit einem Biotin-markierten Anti-Maus-Sekundärantikörper (Dianova, Hamburg, Deutschland) in einer 1:400 Dilution für 45 Minuten. Hiernach erfolgte die Inkubation mit Cy3-konjugiertem Streptavidin in einer Dilution von 1:500 (Dianova, Hamburg, Deutschland) für 30 Minuten. Nach 2xmaligem Waschen à 5 Minuten mit PBS erfolgte die Zellkern-Färbung mit 100 ml 0,5 mg/ml DAPI (Sigma, Deisenhofen, Deutschland). Die so markierten Zellen wurden auf Objektträgern ausgesät und mit Glyceringelatine und Deckgläsern mittels Fluoromount-Gt (Southern Biotech, Birmingham, AL, USA) gedeckelt. Nicht transfizierte HEK293T Zellen dienten als Kontrolle und wurden mit dem gleichen Protokoll gefärbt.

Repräsentative Bilder der Fluoreszenz-Färbungen wurden unter Verwendung eines Olympus BX60 Immun-Fluoreszenz-Mikroskops (Olympus, Hamburg, Germany) erfasst.

## 2.5 Quantifizierung der B19V-Immunhistologie mittels farbkodierter digitaler Bildanalyse (DBA)

Die Quantifizierung von immunhistochemisch gefärbten Antigenen ist aufgrund der Interobserver-Variabilität stark eingeschränkt. Die in dieser Arbeit verwendete farbkodierte Bildanalyse (DBA) ist für die reproduzierbare, exakte und objektive Quantifizierung von immunhistologischen Präparaten von EMBs aber auch von tierexperimentellen Herzen und weiteren Organen (50, 88, 106, 107, 113-116).

Die hier verwendete Anfertigung von Kryoschnitten ist essentiell zur besseren Präservierung der Zielantigene ermöglicht eine genauere Quantifizierung von Infiltraten als eine Formalin-/Paraffinfixierung mit dem Nachteil einer höheren Artefakt-Anfälligkeit (117).

Die Expression der Anti-B19V-Antikörper wurde flächenspezifisch (AF: *area fraction* / Flächenfraktion) quantifiziert. Die AF beschreibt den prozentualen Anteil an spezifisch angefärbten Flächen in Bezug auf die Gesamtfläche des Herzmuskelgewebes. Alle Präparate wurden lichtmikroskopisch bei 200x Vergrößerung ohne Kenntnis der Gruppenzugehörigkeit ausgewertet und mit dem farbkodierten digitalen Bildanalyseverfahren für B19V Immunreaktivität quantifiziert (107).

Die Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Schnitte wurde lichtmikroskopisch mit Hilfe eines LEICA DMRD-Mikroskops (Leica; Bensheim, Deutschland) durchgeführt. Das über eine Sony 3-Chip Videokamera (Sony 3CCD/*color-red-green-blue*/RGB Videokamera, Tokyo, Japan) unter Verwendung eines Leica C-mount Adapters (0,35 Vergrößerung) mit einer Matrox Comet 24-bit Farb-Grafikkarte eingefangene Bild wurde mittels des auf der Plattform von LUCIA G (V 3.52ab, Nikon, Düsseldorf, Deutschland) konzipierten DBA Programms prozessiert. Die DBA erfolgte mit Hilfe der eigens programmierten Makros standardisiert in drei Stufen in Anlehnung an vorangegangene Publikationen (29, 88, 106, 107).

Digitale Erfassung sowie Schärfung und Kontrastierung des mikroskopischen Live-Bildes Einblendung der Messfläche

Erkennung und manuelles Umrahmen der Bildfläche, die das Bildanalyseprogramm bei seinen Messungen berücksichtigen soll. Artefakt-Flächen wurden nicht umrahmt.

## Erkennung und Berechnung der immunhistochemischen Färbung

Die ermittelte Fläche der immunhistochemischen Färbung wurde in ein prozentuales Verhältnis zur reinen Myokardfläche gesetzt, um die Flächenfraktion der Anti-B19V-VP1/2 Antigen-exprimierenden Strukturen im Myokard zu kalkulieren. Die Makros wurden so programmiert, dass nach dem manuellen Festlegen der Messfläche die dritte Stufe der farbkodierten Bildanalyse automatisch abläuft, ohne die Möglichkeit der Einflussnahme auf die ablaufenden Messungen (halb-automatischer Modus).

## **2.6 B19V Genom-Nachweis in EMBs mittels nPCR und qPCR**

Die Sensitivität der PCR ist klassischen virologischen Methoden sowie der in-situ Hybridisierung überlegen, obgleich erstere nicht zur Charakterisierung des zellulären Infektionsmusters herangezogen werden kann (51, 65). Hierbei wird bevorzugt die PCR im *nested primer design* (*nested PCR/nPCR*) angewendet, die eine höhere Spezifität und Sensitivität der PCR ermöglicht. Neuere Entwicklung zeigen auf, dass eine Quantifizierung der Viruslast sowie die Bestimmung des B19V-Genotyps entscheidende zusätzliche diagnostische Aussagen ermöglichen können (118).

Der B19V Genom-Nachweis in EMBs wurde mittels nPCR nach publizierten Methoden durchgeführt (9, 13, 20). In Kürze sind diese Methoden wie folgt beschrieben: Nach DNA-Extraktion von EMBs wurden zwei PCR-Reaktionen mit B19V spezifischen Primern durchgeführt, woraus ein Amplifikat mit 290 bp in der ersten Amplifikation (PCR round) und 173 bp in der zweiten Amplifikation entstand. Bei positiven PCR-Ergebnissen wurde die Spezifität der Amplifikate (PCR Produkte) mittels automatischer Sequenzierung bestätigt und ein Vergleich mit dem archivierten B19V-Genom (*NCBI Genbank accession No. AY386330*) durchgeführt. Eine negative Kontroll-Amplifikation wurde jeweils simultan durchgeführt, um Kontaminationsrisiken auszuschließen. Eine PCR-Amplifikation für Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase Gene (GAPDH) wurde parallel als Positiv-Kontrolle durchgeführt, um die erfolgreiche Extraktion von Nukleinsäure von EMBs zu sichern.

Die Primer und Proben für die B19V quantitative real-time PCR für die Quantifizierung von B19V Viruskopien (qPCR; Taqman 7900HT, Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) wurden auf dem B19V-VP1/2 offenen Leseraster (ORF,

open reading frame) konstruiert. B19V-DNA-Plasmide in unterschiedlichen Dilutionen (3.5 bis  $3.5 \times 10^4$  Genome pro qPCR) wurden parallel quantifiziert, um das Quantifizierungssystem zu standardisieren. B19V infiziertes Knochenmarksgewebe diente als Positiv-Kontrolle ( $8 \times 10^5$  B19V Genom Äquivalenten pro Mikrogramm Nukleinsäure). Ein qPCR der ATP Synthase-6 Gene (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) diente als Positiv-Kontrolle im Sinne eines *housekeeping* Gens für die erfolgreiche DNA-Extraktion und PCR.

## **2.7 Serologische Untersuchung zur Detektion von B19V spezifischen IgG und IgM mittels recomLine® blots**

Antikörper gerichtet gegen Nativ- und Denaturierte B19V Proteine (VP1, VP2 und NS1) wurden in Seren von den 62 Patienten mit dem Verdacht auf AMC und DCM analysiert. Die Analyse wurde mittels Western Blot Assays in Anlehnung an den Bedienungsanleitung des Herstellers (recomLine® blots; Mikrogen GmbH, München, Deutschland) durchgeführt. Diese Streifen-Immunoassays mit rekombinant produzierten Antigenen zum Nachweis von IgG- und IgM-Antikörpern gegen das humane B19V besitzen eine beschriebene hohe Sensitivität und Spezifität. Dieses Verfahren ist hervorragend zur Charakterisierung der B19V-Immunantwort geeignet, weil sie auch die Möglichkeit der einfachen und klaren Interpretation bietet, die Test-Ergebnisse durch leicht ablesbare Banden anzulesen. Außerdem ist ein sicherer Nachweis durch die im Streifen integrierte cut-off-Kontrolle und den getrennten Nachweis von sowohl IgG- und IgM-Antikörpern möglich.

### *Testprinzip und –durchführung :*

Erste Inkubation: Die recomLine Teststreifen (mit B19V Antigenen beladen) wurden mit jeweils 20 µl Serum-Proben für 60Min in einer Schale inkubiert.

3 x waschen

Zweite Inkubation: Dem Ansatz wurden Wasserstoffperoxid / HRPO- (horseradish-peroxidase) konjugierte anti-human Antikörper IgG- oder IgM-spezifisch zugegeben und für 45 Min inkubiert.

3 x waschen

Dritte Inkubation: 5 – 10 Min nach Zugabe der Färbelösung entstand in Positiv-HRPO Reaktionen dunkel unlösliche Farbbanden an den mit Antikörper besetzten Stellen der Teststreifen.

In Kontroll-Teststreifen für Positiv-Konjugat-Reaktionen entstand die Farbbanden an allen entsprechenden Stellen der Teststreifen. Die Quantifizierung von alle Blots wurde mit Hilfe des Digitalbildanalyse Systems von Mikrogen GmbH (München, Deutschland) durchgeführt.

Die Reaktivität der Serum-Antikörper gegen die rekombinanten Antigene wurden durch den Vergleich mit einer *cut-off* Kontrolle evaluiert.

Reaktivitäten stärker als oder äquivalent zur der *cut-off* Kontrolle Farbbanden wurden als positiv evaluiert, und Proben, woraus schwächer Reaktionen oder gar keine Reaktion entstand wurden als negativ evaluiert.

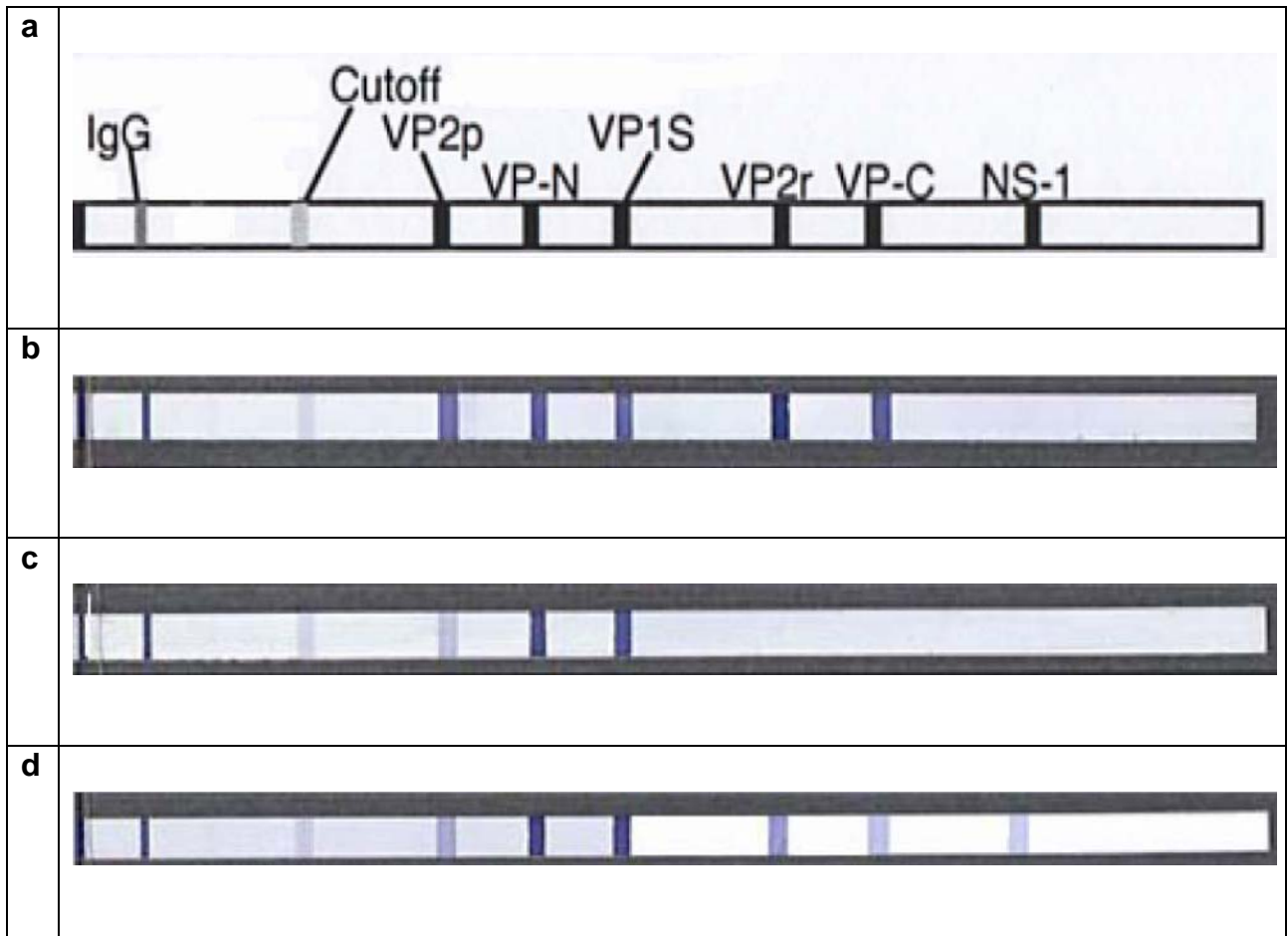
Auf der Basis der Bandenmuster und der Aviditätsbestimmung der B19V Antikörper in den Seren war eine Klassifikation der Infektionsstatus möglich. Eine Klassifikation in kürzlich zurückliegende, länger zurückliegende und reaktivierende/persistierende Infektionsstadien wurde wie in der Literatur beschrieben durchgeführt (119, 120):

Kürzlich zurückliegendes Infektionsstadium: Nachweis von Antikörper gegen VP1-spezifische IgG und IgG gegen linear/denaturiertes VP2 Protein.

Persistierendes / reaktivierendes Infektionsstadium: Anwesenheit von Antikörpern gegen VP1-spezifische IgG, lineare/denaturierte und native Epitope in VP2 in Kombination mit Antikörper gegen B19V NS1.

Länger zurückliegende / vergangenes Infektionsstadium: Nachweis von VP1-spezifischen IgG und IgG gegen native VP2 Kapside, in der Abwesenheit von IgG gegen linear/denaturierte VP2 Epitope Antikörpern.

Negativ: Keine anti-B19V Antikörper



**Abbildung 5:** Repräsentative Ergebnisse der B19V IgG recomLine® Blots. Die IgG Banden links auf jedem Teststreifenbeispiel gelten als positive Reaktionskontrollen.

- a) Kontroll-Teststreifen, auf dem alle detektierbaren B19V IgG Antikörper angezeigt werden.
- b) Beispiel eines Patienten-Serumprofils, das eine akute B19V indiziert.
- c) Beispiel eines Patienten-Serumprofils, das mit einer vergangenen B19V Infektion vereinbar ist.
- d) Patienten-Serumprofil, das eine persistierende/ reaktivierende B19V Infektion indiziert.

## 2.8 Statistische Analyse

Die statistische Analyse erfolgte unter Verwendung der *JMP Statistical Discovery Software* (Version 5.1; SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA). Die qualitativen Daten wurden mit dem  $\chi^2$ -test (chi-Quadrat-Test; Pearson's Korrelationskoeffizient) verglichen. Ordinaldaten wurden mit kontinuierlichen Daten mittels Wilcoxon-Kruskal-Wallis-Test und ANOVA untersucht. Eine statistische Signifikanz wurde bei einem p-Wert  $<0,05$  angenommen.

### **3 Ergebnisse**

#### **3.1 Demographische und klinische Daten der AMC- und DCM-Patienten**

Die Studiengruppe beinhaltete 46 Männer und 16 Frauen. Das Durchschnittsalter der Patienten war  $44,8 \pm 16,6$  Jahre. Die AMC-Patientengruppe war signifikant jünger als die DCM-Patienten. Die LVEF war signifikant mehr eingeschränkt bei DCM-Patienten ( $33,6 \pm 10,4\%$ ) im Vergleich zu AMC-Patienten ( $55,0 \pm 18,4\%$ ). Die LV-Dilatation war signifikant höher bei DCM-Patienten im Vergleich zu den AMC-Patienten. Die Dauer der Krankengeschichte inklusive der Dauer der vorangegangenen grippeähnlichen Symptomatik war signifikant kürzer bei AMC-Patienten im Vergleich zu der DCM-Gruppe. Patienten mit der klinischen Verdachtsdiagnose einer AMC hatten häufig eine Akutes-Koronar-Syndrom ähnliche Präsentation (eine koronare Herzkrankheit wurde in allen Patientengruppen mittels Koronarangiographie ausgeschlossen), während DCM-Patienten hauptsächlich durch chronische Herzinsuffizienz-Symptome charakterisiert waren. Die demographischen und klinischen Daten sind der Tabelle 2 zu entnehmen.



**Tabelle 2: Demographische und klinische Daten der untersuchten AMC- und DCM-Patienten**

	<b>AMC (n=33)</b>	<b>DCM (n=29)</b>
<b>Alter (Jahre)</b>	34,3±15,6*	52,6±11,6
<b>Geschlecht (Männer / Frauen)</b>	26/7	19/9
<b>Dauer der Vorgeschichte (Monate)</b>	0,5±0,6*	18,5±29,0
<b>LVEF (%)</b>	55,0±18,4	33,6±10,4*
<b>LVEDD (mm)</b>	53,8±7,2	61,5±6,8*
<b>LVESD (mm)</b>	37,1±11,2	49,2±7,6*
<b>Dyspnoe, n (%)</b>	14 (42,4%)	23 (79,3%)
- in Ruhe	9 (27,2%)	0
- unter Belastung	4 (12,1%)	21 (72,4%)
<b>Angina, n (%)</b>	26 (78,7%)	7 (24,1%)
- in Ruhe	23 (69,7%)	0
- unter Belastung	3 (9,0%)	7 (24,1%)
<b>Kardiale Dekompensation, n (%)</b>	5 (15,1%)	10 (34,4%)
<b>ST-Streckenhebung, n (%)</b>	13 (39,3%)	0
<b>T-Negativierung, n (%)</b>	6 (18,1%)	0
<b>Kreatininkinase Positiv, n (%)</b>	10 (30,3%)	0
<b>Maximale Kreatininkinase, U/L</b>	141,0±302,2	-
<b>Maximale Kreatininkinase MB, U/L</b>	13,4±31,8	-
<b>Troponin T positiv, n (%)</b>	12 (36,3%)	0
<b>Vorangegangene grippale Erkrankung, n (%)</b>	14 (42,4%)	1 (3,4%)
<b>Arrhythmien, n (%)</b>	4 (12,1%)	15 (51,7%)
- supraventrikuläre Tachykardie	1 (3,0%)	8 (27,5%)
- Vorhofflimmern	0	4 (13,7%)
- Vorhofflattern	1 (3,0%)	1 (3,4%)
- ventrikuläre Tachykardie	3 (9,0%)	7 (24,1%)
- Bradykardien	0	0
<b>AV-Block</b>	0	1 (3,4%)
<b>Linksschenkelblock</b>	0	1 (3,4%)

\*: p<0,05.

### 3.2 Nachweis von B19V-Genomen in EMBs mittels nPCR

B19V Genome wurden in EMBs von n=36/62 Patienten (58,1%) mittels nPCR nachgewiesen. Unter Berücksichtigung der klinischen Verdachtsdiagnose waren B19V Genome bei n=21 (63,6%) der AMC-Patienten, und bei n=15 (51,7%) der DCM-Patienten nachweisbar. Hervorzuheben war die Monoinfektion mit B19V DNA, die bei n=28 Patienten beobachtet wurde. Eine Dreifachinfektion mit B19V, HHV-6 und EV wurde bei 8 AMC-Patienten beobachtet. Eine HHV-6 Monoinfektion wurde weiterhin bei 3 Patienten nachgewiesen, und eine Monoinfektion mit EV bei n=2 Patienten. EV-RNA wurde bei n=1 (3%) der AMC-Patienten und bei n=1 (3,4%) der DCM-Patienten nachgewiesen. HHV-6 positive EMBs wurden bei n=1 (3%) der AMC-Patienten und bei n=2 (6,0%) der DCM-Patienten nachgewiesen (Tabelle 3).

**Tabelle 3: Prävalenz kardiotroper Virusinfektionen mittels nPCR in EMBs**

PCR	AMC	AMC	DCM	DCM
	B19V positiv	B19V negativ	B19V positiv	B19V negativ
<b>B19V</b>	13 / 39,3%	-	15 / 51,7%	-
<b>HHV6</b>	0	1 / 3,0%	0	2 / 6,9%
<b>EV</b>	0	1 / 3,0%	0	1 / 3,4%
<b>B19V+HHV6</b>	3 / 9,0%	0	0	0
<b>B19V+EV</b>	2 / 6,0%	0	0	0
<b>B19V+HHV6+EV</b>	3 / 9,0%	0	0	0

### 3.3 Charakterisierung der humoralen B19V-Antwort bei AMC- und DCM-Patienten – Assoziation zum nPCR Nachweis von B19V Genomen in EMBs und Assoziation zur klinischen Verdachtsdiagnose

IgM Antikörper gegen VP1 und VP2 wurden ausschließlich bei n=6 (18,1%) der AMC-Patienten, und nicht bei DCM-Patienten gefunden ( $p < 0,05$ ). Von den AMC-Patienten mit B19V spezifischem IgM, hatten n=4 (19,0%) einen positiven nPCR-Nachweis für B19V Genome in EMBs und n=2 (16,0%) hatten einen negativen

nPCR-Nachweis, wobei diese Ergebnisse statistisch nicht als unterschiedlich zu betrachten sind, am ehesten aufgrund der niedrigen Zahl der IgM-positiven Patienten, die sich aus dieser Screening-Untersuchung ergeben hat. In diesen 6 Patienten, wurden nur VP2- und VP1-spezifische IgM Antikörper detektiert, nicht aber IgM gegen denaturierte VP2 Proteine.

In Seren von gesunden Probanden wurden keine IgM-Antikörper nachgewiesen. Anti-B19V IgG wurde in n=10/16 (62,5%) der Patienten festgestellt. In allen dieser 10 Patientenseren wurden sowohl VP1-spezifische IgG als auch VP2-spezifischer IgG detektiert. Bei einem Patienten (6,3%), wurden IgG-Antikörper gegen VP-NS1 beobachtet. Es wurden bei diesem Patienten keine anti-B19V-IgG gegen linear/denaturierte VP1/VP2 nachgewiesen. Diese Konstellation passt zu einem vorangegangenen Infektionsstadium.

Während die globale Seroprävalenz von VP1-/VP2-spezifischem IgG keinen signifikanten Unterschied in den unterschiedlichen Patientengruppen zeigte, wurde eine signifikant hohe Prävalenz von IgG gegen linear/denaturierte VP1/VP2 in der AMC-Patientengruppe beobachtet im Vergleich zur der DCM-Patientengruppe und den Kontrollen. Andererseits war die Prävalenz von NS1-spezifischen IgG signifikant höher in der DCM- verglichen mit der AMC-Patientengruppe und den Kontrollen (Tabelle 4).

Es wurde eine statistisch signifikante Assoziation zwischen der Prävalenz von B19V-spezifischen IgG und dem positivem nPCR-Nachweis von B19V DNA in EMBs beobachtet. Detailliert betrachtet wurden IgG Antikörper gegen VP1- und VP2-Proteine bei n=48 (97,9%) der Patienten mit positivem B19V Genom in EMBs detektiert, während bei Patienten ohne B19V-Genom in EMBs eine IgG-Seroprävalenz von n=16 (48,5%) beobachtet ( $p < 0,0001$ ).

Die genaue Analyse der Patientengruppen zeigte in Betrachtung der klinischen Verdachtsdiagnose eine B19V-Seropositivität n=20 (95,2%) der AMC-Patienten und bei allen DCM-Patienten n=15 (100%). Eine positive IgG-Antwort wurde bei n=6 (50,0%) der AMC- und n=6 (42,8%) der DCM-Patienten ohne detektierbare B19V DNA in EMBs beobachtet.

In beiden Patienten-Untergruppen wurde eine ähnlich hohe Nachweisbarkeit der VP1- und VP2-spezifischen IgG beobachtet. In den Seren der AMC-Patienten wurde eine signifikant höhere Frequenz von IgG gegen denaturierte Kapsid-Protein

detektiert (n=12 / 36,3%) im Vergleich zu den DCM-Patienten (n=2 / 6,8%; p=0,0056). NS1-spezifische IgG wurden mit einer signifikant höheren Frequenz bei DCM n=8 (27,5%) im Vergleich zu den AMC-Patienten n=2 (6,0%) beobachtet (p=0,0215).

Die genauere Analyse von IgG zeigte signifikant höhere Frequenzen von IgG gegen VP1, VP2 und die linear/denaturierte Form von VP1 und VP2 bei Patienten mit myokardialen B19V Nachweis im Vergleich zu den Patienten ohne nPCR Nachweis von B19V Genomen. Hinsichtlich der NS1-spezifischen IgG wurde ein signifikanter Unterschied der myokardialen Infektion bei AMC- und DCM-Patienten beobachtet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

**Tabelle 4: Prävalenz von Epitop-spezifischen anti-B19V-Antikörpern im Vergleich zu nPCR-Nachweis von B19V in EMBs von AMC- und DCM-Patienten**

	AMC alle Patienten	AMC PCR B19V positive	AMC PCR B19V negative	DCM alle Patienten	DCM PCR B19V positive	DCM PCR B19V negative
IgG	26/33 (78,7%)	20/21 (95,2%)*	6/12 (50,0%)	21/29 (72,4%)	15/15 (100%)*	6/14 (42,8%)
VP1 spezifische IgG	25/33 (75,7%)	19/21 (90,4%)*	6/12 (50,0%)	21/29 (72,4%)	14/15 (93,3%)*	7/14 (50,0%)
VP2 Partikel spezifische IgG	25/33 (75,7%)	20/21 (95,2%)*	5/12 (41,6%)	20/29 (68,9%)	15/15 (100%)*	5/14 (35,7%)
IgG gegen lineare/denaturierte VP1/VP2	12/33 (36,3%)§	10/21 (47,6%)	2/12 (16,6%)	2/29 (6,8%)	0	2/14 (14,2%)
IgG VP-NS1	2/33 (6,0%)	1/21 (4,7%)	1/12 (8,3%)	8/29 (27,5%)§	4/15 (26,6%)	4/14 (28,5%)
IgM	6/33 (18,1%)§	4/21 (19,0%)	2/12 (16,6%)	0	0	0
IgM VP1	6/33 (18,1%)§	4/21 (19,0%)	2/12 (16,6%)	0	0	0
VP2 Partikel spezifische IgM	6/33 (18,1%)§	4/21 (19,0%)	2/12 (16,6%)	0	0	0

n.s.: nicht signifikant

§: signifikante Unterschiede ( $P < 0,05$ ) in den verschiedenen Patientengruppen basierend auf der klinischen Verdachtsdiagnose

\*: signifikante Unterschiede ( $P < 0,05$ ) zwischen den Patienten in den verschiedenen Patientengruppen basierend auf der nPCR-Nachweis von B19V in EMBs

Es wurde keine Altersabhängigkeit der nPCR Nachweise von B19V Genomen in den EMBs beobachtet. B19V-IgM-positive Patienten waren signifikant jünger ( $p=0,0024$ ), in Übereinstimmung mit dem signifikant jüngeren Durchschnittsalter der AMC-Patientengruppe, in der ausschließlich anti-B19V IgM detektiert wurden. Es war jedoch keine Altersabhängigkeit der anti-B19V IgM Seroprävalenz innerhalb der AMC Gruppe zu beobachten ( $p<0,05$ ). Die anti-B19V IgG Seroprävalenz war tendentiell, aber nicht statistisch signifikant höher bei über 60-jährigen Patienten (Tabelle 5).

**Tabelle 5: Altersabhängige Frequenz der nPCR-B19V-Genom-Nachweise in EMBs und der Seroprävalenz von anti-B19V IgM und IgG Antikörpern bei den AMC- und DCM-Patienten**

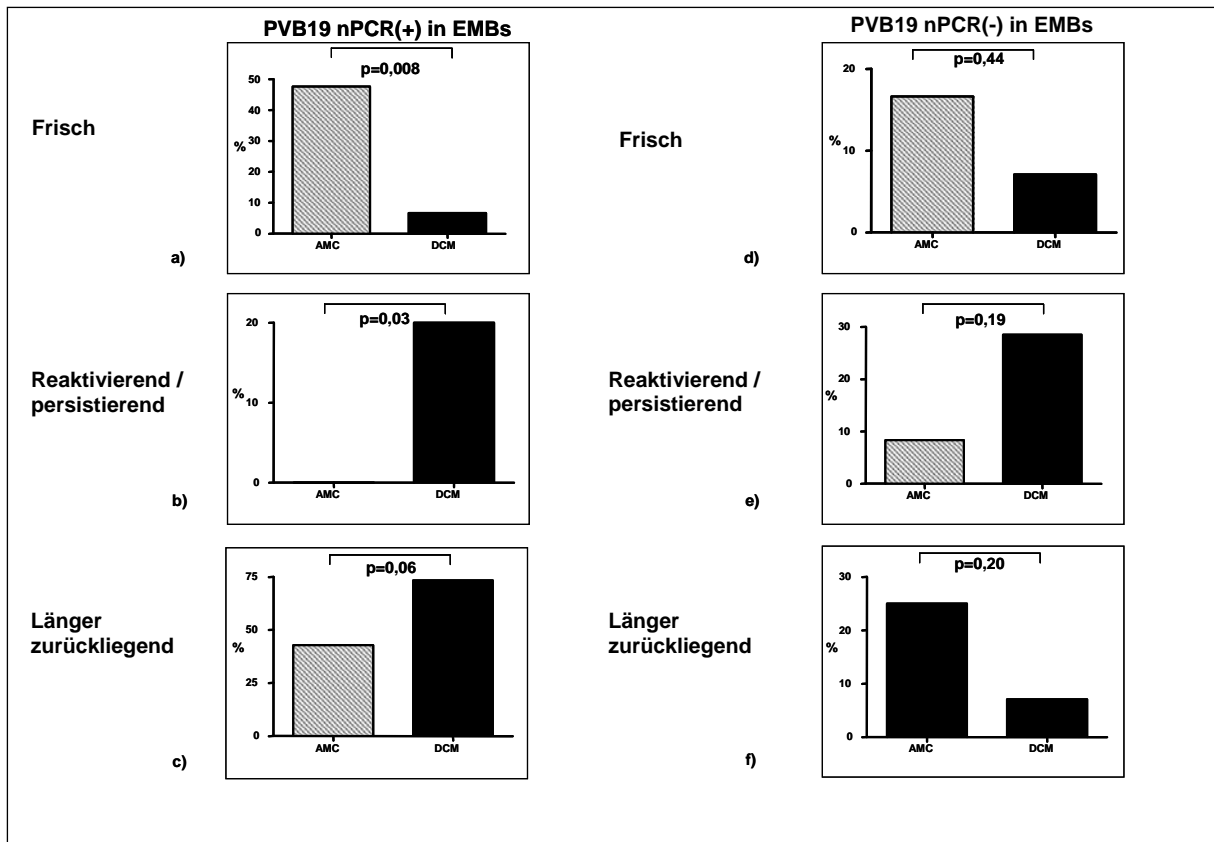
Alter (Jahre)	n	nPCR B19V positiv in EMBs	B19V IgM positiv	B19V IgG positiv
<25	13 / 20,9%	9 / 69,2%	4 / 30,7% *	10 / 79,9%
25-40	19 / 25,8%	10 / 62,5%	2 / 12,5% *	12 / (75,0%)
41-60	22 / 35,4%	10 / 45,4%	0	14 / 63,6%
>60	11 / 17,7%	7 / 63,6%	0	11 / 100%

\*:  $p<0,05$  im Vergleich zu Patienten >40 Jahre.

### 3.4 Bestimmung des Infektionsstadiums auf der Basis der humoralen anti-B19V Immun-Antwort

Ein Vergleich der Klassifizierung der B19V-spezifischen-IgG-Mustern in den unterschiedlichen klinischen Patientengruppen zeigt eine Diskrepanz zu den nPCR-Genomnachweisen von B19V in EMBs. Dabei zeigte sich bei AMC-Patienten mit B19V-Genomnachweis in den EMBs die Frequenz der Antikörper, die für eine kürzlich stattgehabte B19V-Infektion sprechen, signifikant erhöht ( $p=0,008$ ) im Vergleich zu DCM-Patienten (Abbildung 6a). Diese Signifikanz wurde bei Patienten

ohne nPCR-Genomnachweis von B19V in EMBs nicht beobachtet (Abbildung 6e). Reaktivierende/persistierende B19V-humorale Antwortprofile wurden mit einer höheren Signifikanz bei DCM- ( $p=0,03$ ) Patienten im Vergleich zu den AMC-Patienten nachgewiesen. Auch wurde diese höhere Signifikanz nicht in den entsprechenden Patientengruppen ohne nPCR Genomnachweis in EMBs beobachtet (Abbildung 6b, f). IgG-Muster mit lange zurückliegender Infektion zeigten eine höhere Frequenz in der DCM-Gruppe als in der AMC-Patientengruppen ( $P=0.06$ ) mit myokardialer B19V-Infektion. Im Gegensatz dazu fand sich zwischen AMC- und DCM-Patienten ohne virale DNA in EMBs kein signifikanter Unterschied in den Frequenzen von IgG-Mustern, die spezifisch für lang zurückliegende B19V Infektionen sind.



**Abbildung 6:** Klassifikation des Infektionsstadiums auf der Basis der anti-B19V humoralen Immun-Antwortprofile, unterteilt nach dem B19V Genomnachweis in EMBs mittels nPCR. Die Abbildung zeigt die Häufigkeit/Frequenz der anti-B19V humoralen Antwort bei AMC- und DCM-Patienten mit myokardialer B19V Infektion (a, b, c) und bei den AMC- und DCM-Patienten ohne nPCR-Nachweis von B19V in den EMBs (d, e, f). Die p-Werte entsprechen den Vergleichen der verschiedenen Patientengruppen.



### **3.5 Demographische und klinische Daten der DCM-Patientengruppe für die immunhistologische B19V Proteinexpressionsuntersuchung**

Diese Studiengruppe beinhaltete 23 Männer und 7 Frauen. Das Durchschnittsalter der Patienten war  $48,4 \pm 14,4$  Jahre. Die durchschnittliche LVEF betrug  $34,9 \pm 18,2\%$ . Die Anamnesedauer betrug  $14,8 \pm 25,7$  Monate (die Dauer der vorangegangenen grippeähnliche Symptomatik eingeschlossen). Diese Patienten mit dem klinischen Verdacht DCM hatten hingegen chronische Symptome. Die demographischen und klinischen Daten sind in Tabelle 6 zu entnehmen.

**Tabelle 6: Demographische und klinische Daten der DCM-Patienten für die immunhistologische B19V Proteinexpressionsuntersuchungen in EMBs.**

<b>Patientenzahl</b>	30
<b>Alter(Jahre)</b>	48,4±14,4
<b>Sex, M / F</b>	23/7
<b>Dauer der Symptome (Monate)</b>	14,8±25,7
<b>LVEF (%)</b>	34,9±18,2
<b>LVEDD (mm)</b>	67,0±7,3
<b>Dyspnoe</b>	29
- in Ruhe	5
- unter Belastung	24
<b>Angina pectoris</b>	13
- in Ruhe	7
- unter Belastung	6
<b>Kardiale Dekompensation</b>	10
<b>Arrhythmien</b>	13
- Vorhofflimmern	4
- Vorhofflattern	1
- ventrikuläre Tachykardie	1
<b>Atrioventrikulärer Block</b>	1
<b>Linksschenkelblock</b>	1

LVEF: linksventrikuläre Ejektionsfraktion

LVEDD: linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser

### 3.6 nPCR und qPCR Ergebnisse in EMBs

Positive Ergebnisse für nPCR-Nachweise von Virusgenomen in EMBs wurden bei 15 (50%) der Patienten beobachtet. Die entsprechende Anzahl der Viruskopien in den EMBs mit positiven nPCR Ergebnisse wurde mittels qPCR quantifiziert. Die mittlere B19V Viruskopienanzahl betrug  $409,1 \pm 559,8$  Viruskopien/ $\mu\text{g}$  myokardialer Nukleinsäuren, mit einer Bandbreite von 21 bis 1.680 B19V Viruskopien pro  $\mu\text{g}$  myokardialer Nukleinsäure.

### 3.7 Immunhistologische anti-B19V-VP1-/VP2 Färbung in EMBs

Die immunhistochemische Färbung von EMBs ohne Einsatz des primären anti-B19V-VP1/VP2 Antikörpers zeigte keine unspezifische Kreuz-Reaktivität (Abbildung 8a), was eine Kreuzreaktivität des Sekundärantikörpers und der immunhistologischen Detektionsmethode mit myokardialem Gewebe ausschließt. Bei 16/53% der EMBs war die immunhistologische B19V Färbung negativ (Abbildung 8b). Eine positive anti-B19V-IHC-Färbung wurde bei 14 (46,7%) der untersuchten EMBs beobachtet (Abbildung 8 c, d, e). Der Vergleich mit den nPCR-Ergebnissen der EMBs zeigte, dass 12/40% der Patienten mit positiven nPCR-B19V-Genomnachweis auch eine positive B19V-IHC-Färbung aufwiesen, während bei den Patienten mit negativen B19V-nPCR-Egebnissen die anti-B19V-Immunoreaktivität nur bei  $n=2/6,7\%$  zu beobachten war. Hierbei ergibt sich eine hohe statistische Signifikanz von  $p=0,0003$ . Den nPCR-B19V-Genomnachweis als „Goldstandard“-Methode eingesetzt, zeichnete sich -B19V-Immunhistologie mit einer Sensitivität von 80% und einer Spezifität von 86% aus. Aus diesen Ergebnissen resultierte ein positiver prädiktiver Wert von 85,7% und ein negativer prädiktiver Wert von 81,2% (Tabelle 7).

**Tabelle 7: Statistischer Vergleich des nPCR-B19V Genomnachweises in EMBs mit dem immunhistologischen Nachweis einer B19V-IHC VP1/VP2 Proteinexpression**

	<b>anti-B19V-IHC übereinstimmend mit den nPCR Ergebnissen</b>	<b>anti-B19V-IHC nicht übereinstimmend mit den nPCR Ergebnissen</b>
<b>nPCR<sup>+</sup> (n=15)</b>	n=12 (=80% richtig positive)	n=3 (=20% falsch negative)
<b>nPCR<sup>-</sup> (n=15)</b>	n=13 (=86,7% richtig negative)	n=2 (=13,3% falsch positive)

**Sensitivität: 80,0%**  
**Spezifität: 86,0%**  
**Positiver prädiktiver Wert: 85,7%**  
**Negativer prädiktiver Wert: 81,2%**

Die DBA quantifizierte AF von B19V-IHC war mit einer Signifikanz von  $p=0,0087$  mit dem nPCR-B19V-Genomnachweis signifikant assoziiert (Abbildung 7a).

Ferner war die B19V-Viruslast signifikant höher in EMBs mit positiver anti-B19V-IHC-Färbung im Vergleich zu EMBs ohne anti-B19V Immunreaktivität ( $p=0,0008$ ) (Abbildung 7b). Eine signifikante, aber schwache lineare Korrelation zwischen der B19V-Viruslast und der DBA quantifizierten AF der IHC-Färbung wurde beobachtet ( $R^2=0,15$ ;  $p=0,034$ ). In allen Proben mit positiver B19V-IHC-Färbung war die B19V Immunreaktivität in interstitiellen Zellen zu beobachten (Abbildung 8c). Zudem wurde in einer Probe B19V-Immunoreaktivität in Endothelzellen beobachtet (Abbildung 8d) sowie in 4 Fällen in Kardiomyozyten (Abbildung 8e). Diese 5 Fälle waren allesamt positiv für den nPCR-B19V-Genomnachweis. Diese fünf Fälle mit zusätzlichen

Endothelzellen und/oder Kardiomyozyten-anti-B19V-IHC-Färbung zeigten jedoch keine signifikant höhere B19V-Viruslast im Vergleich zu den anderen Fällen ( $p < 0,05$ ).

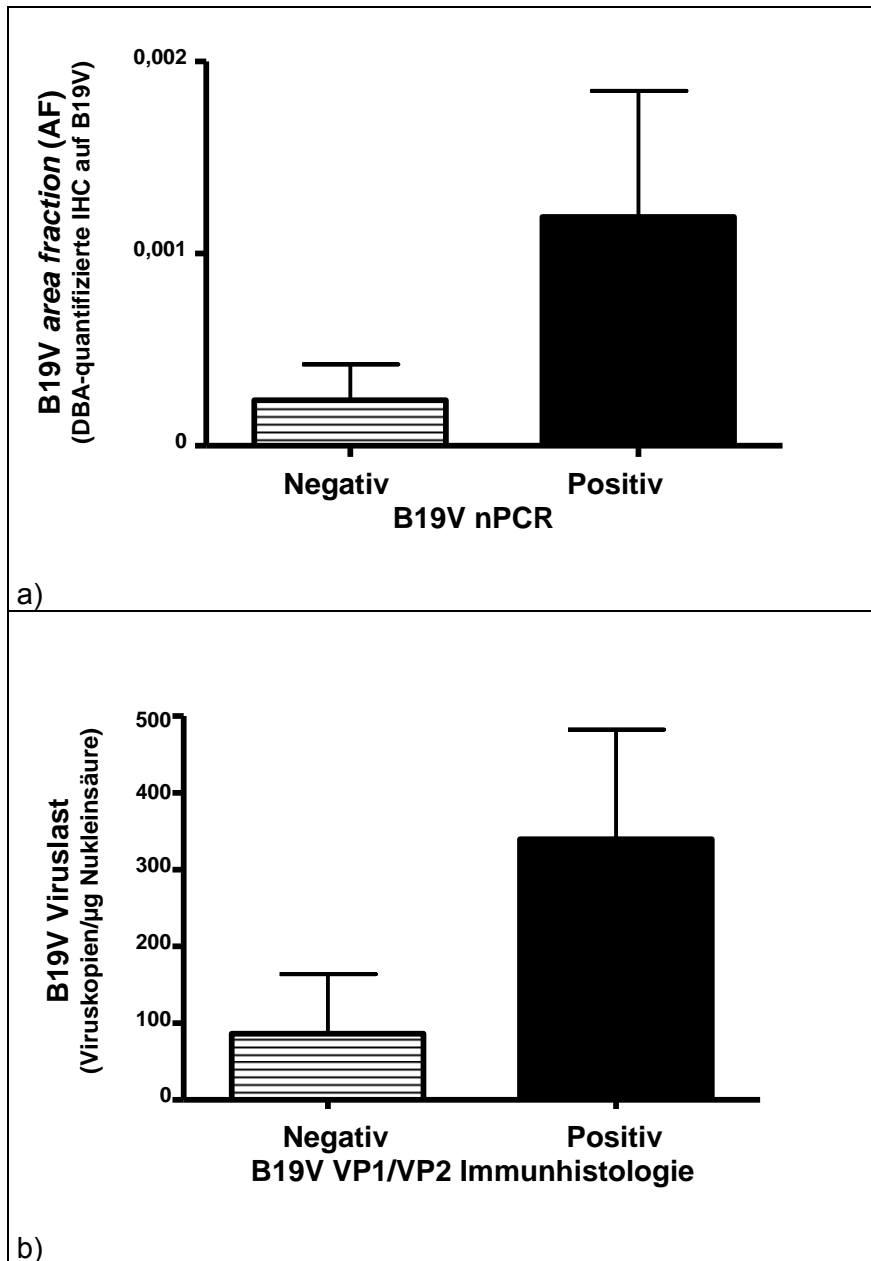
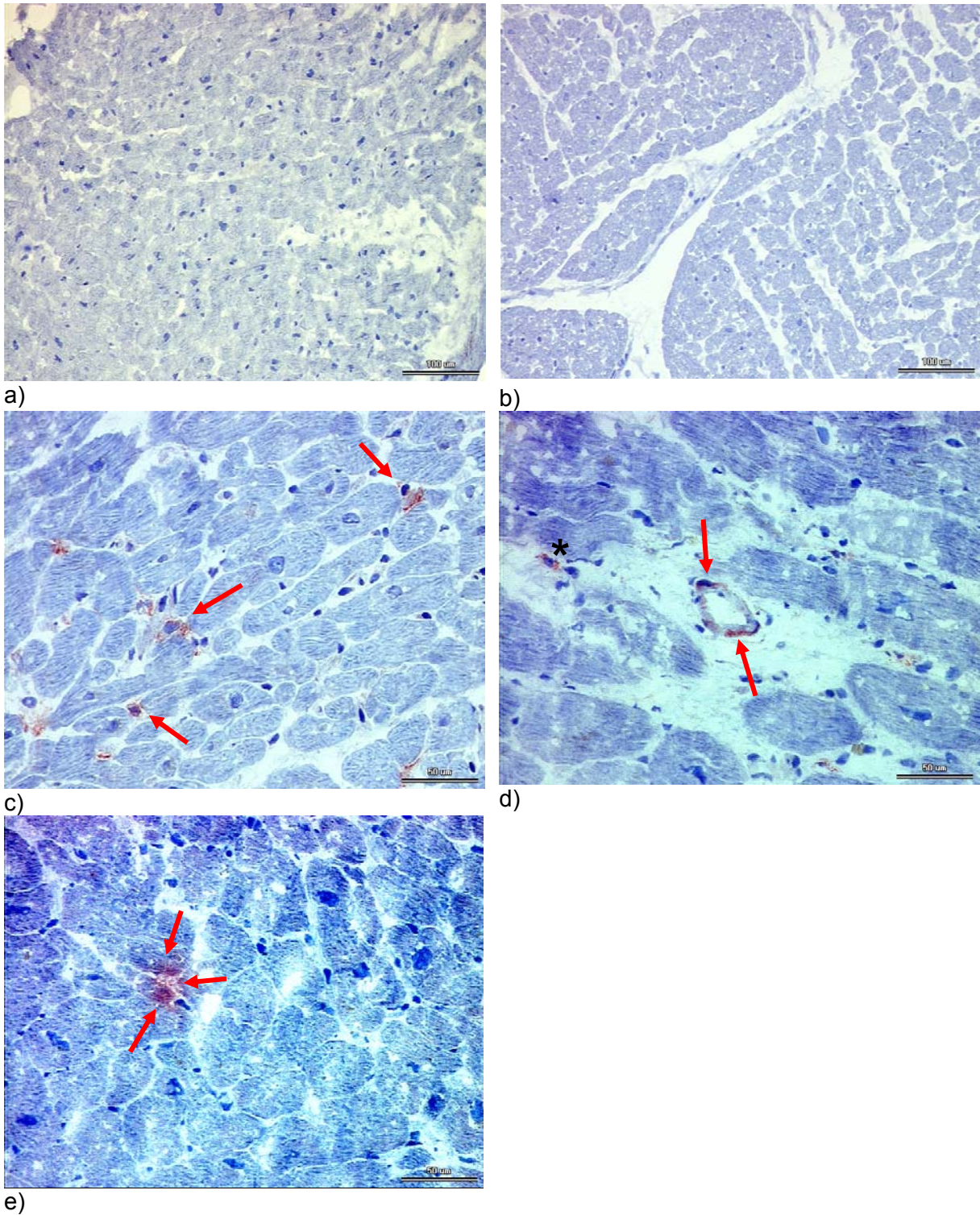


Abbildung 7a: Vergleich der anti-B19V-VP1/-VP2-IHC mittels DBA-Quantifizierung (Area Fraction / AF) und dem B19V-nPCR-Genomnachweis in EMBs ( $p=0,0087$ )

Abbildung 7b: Vergleich der anti-B19V-VP1/-VP2-IHC mit der qPCR ermittelten B19V-Viruslast (Viruskopien pro  $\mu$ g myokardiale Nukleinsäure);  $p=0,0008$



**Abbildung 8: Repräsentative Aspekte der anti-B19V-IHC in EMBs.**

**a) Negativkontrolle ohne B19V-Antikörper (x200).**

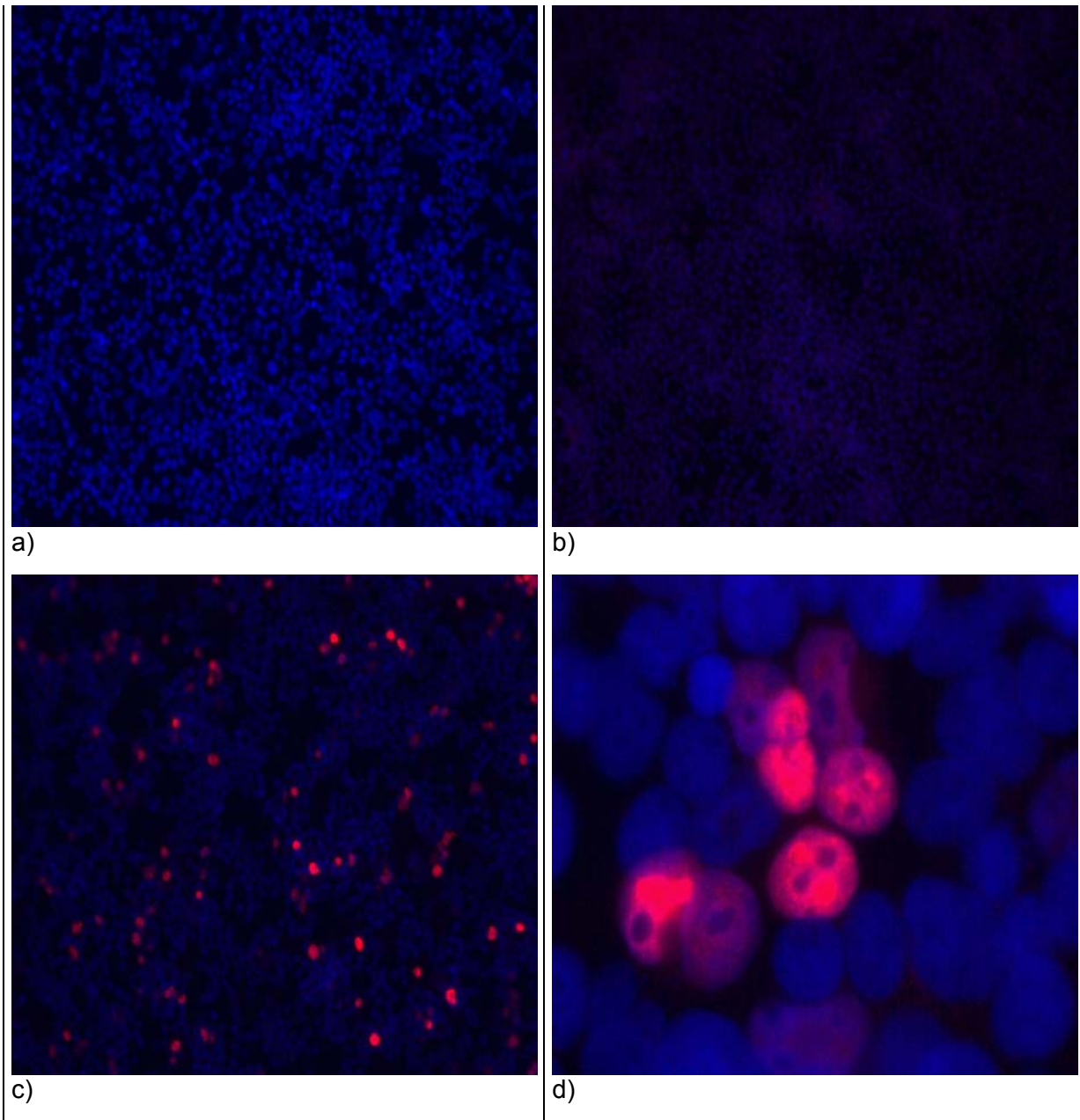
**b) Negative B19V-IHC in einer EMB mit negativem B19V-nPCR-Ergebnis (x200).**

- c) Positive VP1/VP2-IHC-Färbung von interstitiellen Zellen (Pfeile; x400).**
- d) Positive B19V-IHC-Färbung von Endothelzellen (Pfeile) und in interstitiellen Zellen (Stern; x400).**
- e) Positive B19V-VP1/VP2 IHC von Kardiomyozyten (Pfeil: x400).**

### **3.8 Anti-B19V-Immunofluoreszenz in pB19-M20 transfizierten 293T Zellen.**

Die immunhistochemische Färbung von HEK293T Zellen ohne Einsatz des primären anti-B19V-VP1/VP2 Antikörpers ergab keine Reaktivität (Abbildung 9a), was die Spezifität dieses Detektionsverfahrens an den gleichsam kultivierten Zellen bestätigt. Ähnlicherweise wurde keine Fluoreszenz in den nicht mit pB19-M20 transfizierten Zellen beobachtet (Abbildung 9b). Im Gegensatz hierzu war eine deutliche Fluoreszenz in den perinukleären Regionen des Zytoplasmas bei den pB19-M20 HEK293T transfizierten Zellen vorhanden (Abbildung 9c, d).





**Abbildung 9: B19V-VP1/VP2 Fluoreszenz-Färbung in HEK293T Zellen.**

- a) Negativkontrolle unter Auslassung des B19V-Antikörpers.
- b) Nicht transfizierte 293T-Zellen (x100).
- c) Positive anti-B19V-VP1/VP2-Fluoreszenz auf pB-M20 transfizierten 293T Zellen (x100).
- d) Anti-B19V-VP1/VP2-Fluoreszenz auf pB19-M20 transfizierten 293T Zellen (x1.000), die die perinukleäre Lokalisation von B19V im Zytoplasma aufzeigen.

## 4 Diskussion

Die DCMi stellt eine spezifische Kardiomyopathie-Entität dar, die durch den immunologischen Nachweis einer intramyokardialen Entzündung und/oder den molekularbiologischen Nachweis von kardiotropen Viren in Endomyokardbiopsien definiert ist (23).

B19V ist das häufigste bekannte Virus, das in EMBs sowohl von Erwachsenen als auch von Kindern und Jugendlichen mit der klinischen Verdachtsdiagnose einer akuten Myokarditis (AMC) sowie einer dilatativen Kardiomyopathie (DCM) nachgewiesen wird.

Während für die myokardiale enterovirale / Coxsackievirus Infektion zahlreiche Publikationen zu entscheidenden Einblicken in die Viruspathogenese und das myokardiale Infektionsmuster geführt haben (121, 122), sind für die myokardiale B19V Infektion bei AMC und DCM viele Fragen nicht hinreichend geklärt.

Nachdem das B19 Virus erstmals 1974 von Cossart (60) beschrieben wurde, galt es als pathogener Erreger zahlreicher humaner Infektionen - unter anderem des Erythema infectiosum und des Hydrops fetalis u.a.. In den letzten ca. 10 Jahren erschienen mehrere Publikationen über eine Assoziation zwischen einer B19V Infektion und der AMC bzw. DCM, (123-127). Wie bei den anderen bekannten Myokarditis-auslösenden Virusinfektionen wurde in diesen Arbeiten das Vorliegen einer Entzündung durch histologische (Dallas-Klassifikation) und immunhistologische Untersuchungen der EMBs erfasst, und die B19V Infektion zumeist über PCR Methoden, in Einzelfällen über eine zusätzliche *in situ* Hybridisierung. Wang et al. berichtet, durch Verwendung der *in situ* Hybridisierung die Lokalisation von B19 DNA in Zellkernen von Kardiomyozyten nachgewiesen zu haben (64). Letztlich kann jedoch weder mittels nPCR von B19V-Genomen, noch mittels *in situ* Hybridisierung, das B19V Infektionsstadium klar definiert werden, noch kann eine latente von einer aktiven Virusinfektion und/oder -replikation unterschieden werden.

In dieser Arbeit konzentrierten wir uns einerseits auf die diagnostische Bedeutung der humoralen anti-B19V-Antwort auf der Basis von diskriminierenden Antikörper-Mustern, deren Assoziation zu dem klinischen Verdachts-B19V-Infektionsstadium bei anderen Infektionen mit B19V beschrieben wurde. Wir verwendeten diese

Antikörper-Nachweistechiken und allgemein gültige klinische Untersuchungs-Algorithmen bei Patienten (8, 11, 40, 41, 112, 128). Ein Hauptziel dieser Untersuchung war die mögliche Rolle für die Unterteilung der vorliegenden Infektionsstadien.

Ein weiteres Ziel der Untersuchungen im Rahmen meiner Doktorarbeit war die Analyse der möglichen diagnostischen Bedeutung von immunhistologisch detektierbarer B19V-Expression in EMBs von DCM-Patienten, unter statistischer Gegenüberstellung mit dem nPCR Nachweis von B19V Genomen in den EMBs.

Die Untersuchung der myokardialen Entzündung konnte in anderen Arbeiten keine signifikante Assoziation zwischen nPCR-B19V-Genom-Nachweis und der zellulären intramyokardialen Entzündung nachweisen - auch unter Verwendung sensitiver immunhistologischer Techniken, diagnostischer Kriterien und auch kardialer MRT-Untersuchungen (9, 13, 128, 129), so dass wir uns bei diesen Untersuchungen auf den Vergleich der humoralen B19V-Antwort und dem immunhistologischen B19V-Proteinexpressionsnachweis mit dem nPCR-Nachweis in EMBs beschränkten.

#### **4.1 Immunhistochemie (IHC) auf B19V Proteine in EMBs**

Als Immunhistochemie (IHC) wird in der biomedizinischen Forschung eine Methode bezeichnet, mit der die Proteinexpression unter Einsatz von Antikörpern visualisiert werden können. Mittels immunhistochemischer Untersuchungen wurde von anderen Arbeitsgruppen eine hohe Sensitivität und Spezifität für enterovirale VP1 Expression verglichen mit den PCR-Ergebnissen für enterovirales bzw. Coxsackievirus-Genom nachgewiesen (44, 130). In der vorliegenden Arbeit konnten wir ebenfalls unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers des Klons R92F6 eine hohe Sensitivität und Spezifität für anti-B19V-Immunhistochemie im Vergleich zu nPCR-Ergebnissen bestätigen. Der verwendete Antikörper ist bei anderen Erkrankungen gut charakterisiert worden (84, 131-134).

Für die Spezifitätsüberprüfung dieses Antikörpers kamen in unseren Untersuchungen humane embryonale Nierenepithelzellen der Linie HEK293T, die mit dem B19V Plasmid pB19-M20 transfiziert wurden, zur Anwendung. Diese Ergebnisse stellen nach unserem Literaturstudium die erste Quelle für den experimentellen *in vitro*

Nachweis über die Spezifität des verwendeten monoklonalen Antikörpers dar. Zusätzlich zu der Korrelation zwischen der anti-B19V immunhistochemischen Färbung und den n-PCR-Ergebnissen, impliziert die Assoziation mit der B19V-Viruslast eine mögliche molekularbiologische Relevanz der myokardialen B19V-Protein-Expression. Aus unseren IHC-Untersuchungen lässt sich dokumentieren, dass die hauptsächlichlichen Zielzellen der myokardialen B19V-Infektion in EMBs von DCM-Patienten interstitielle Zellen sind. Es ist von anderen Studien bekannt, dass eine Plethora von Immunzellen mögliche Zielzellen einer B19V Infektion darstellen, z.B. Granulozyten, Makrophagen, dendritische Zellen, T- und B-Lymphozyten (65, 135).

Im Einklang mit experimentellen *in situ* Hybridisierungs-Vorarbeiten von Wang et al. konnten wir Kardiomyozyten mit positiver B19V immunhistochemischer Färbung in vier Fällen beobachten (64). Diese Beobachtung wäre gemäß unserer Literaturrecherche der erstmalige Hinweis, dass Kardiomyozyten von adulten Menschen von B19V infiziert werden können. Da die Expression der B19V-Proteine auf Kardiomyozyten bei unseren Untersuchungen deutlich weniger häufig vorzufinden war als auf interstitiellen Zellen, stellt dieses Expressionsmuster möglicherweise einen aggressiveren Infektionstyp dar, dem letztlich möglicherweise ein prognostischer Charakter zugesprochen werden könnte. Es wäre in diesem Zusammenhang vorstellbar, dass dieser Infektionstypus zu einer direkten LV-Dysfunktion beitragen kann, wie beispielsweise eine NS1-assoziierte Phospholipase A2 Aktivität, und der hierdurch induzierten Apoptose (136).

Um die molekularbiologische, klinische und prognostische Relevanz des immunhistochemischen Nachweises der B19V-Protein-Expression in EMBs bei AMC- und DCM-Patienten einzuschätzen sind weitere prospektive Untersuchungen notwendig. Dies ist besonders bedeutsam, um den natürlichen Verlauf der Infektion (Verbesserung versus Verschlechterung der linksventrikulären Funktion, Elimination versus Persistenz der B19V Protein-Expression) besser zu erklären. Diese immunhistochemischen Voruntersuchungen könnten die Ausgangslage für weiterführende Untersuchungen darstellen, die auf eine Differenzierung zwischen biologisch aktiven und latenten B19V myokardialen Infektionen abzielen. Die wesentliche Bedeutung einer derartigen Differenzierung bei B19V Infektionen wird auch von weiteren Autoren, auch speziell im Zusammenhang der DCMi, diskutiert,

da der alleinige molekularbiologische PCR-Nachweis von B19V Genomen offenbar im Zusammenhang mit nicht-kardialen Erkrankungen nicht alleinig ausreichend ist, um erkrankte von gesunden Individuen zu unterscheiden (51, 59, 137, 138).

#### **4.2 Prävalenz von B19V-Genomen in EMBs von ACM- und DCM-Patienten**

Mittels hochsensitiver, spezifischer und publizierter nPCR-Methoden wurden B19V-Genome in EMBs bei 36/62 (58,06%) der untersuchten Patienten bestätigt. Diese B19V-Prävalenz bei den Patienten unserer Untersuchungen ist vergleichbar mit der anderer Publikationen (17, 129). Es gab keinen signifikanten Häufigkeitsunterschied zwischen AMC- und DCM-Patienten, was ebenfalls mit den bereits publizierten Studien im Einklang ist. Somit ist das Patienten-Kollektiv in dieser Arbeit als repräsentativ zu betrachten. Diese Einblicke bestätigen, dass die nPCR-Ergebnisse eine sinnvolle Unterscheidung des B19V-Akuitätsstadiums nicht ermöglichen. Ferner ist die vergleichbare Prävalenz der B19V myokardialen Infektion bei AMC- und DCM-Patienten in Übereinstimmung mit der Hypothese, dass die Persistenz von B19V möglicherweise eine wichtige Rolle für die Transition von der AMC zur DCM spielt (20).

#### **4.3 Anti-B19V-IgM und -IgG bei gesunden Kontrollprobanden**

In den Seren der untersuchten gesunden, hinsichtlich Alters und Geschlechts gleich verteilten Kontrollprobanden, wurden keine IgM-Antikörper bestätigt. Anti-B19V-IgG wurden bei 62,5% dieser Patienten nachgewiesen. Es wurden keine anti-B19V-IgG gegen lineare/denaturierte VP1/VP2 beobachtet, was mit einem vergangenen Infektionsstadium vereinbar ist. Bei einem Patienten (6,3%) wurden IgG gegen VP-NS1 als Marker für eine persistierende B19V-Infektion beobachtet. Die Daten dieser relativ kleinen und hinsichtlich Alters und Geschlechts *gematchten* Kontrollprobanden-Kohorte sind konsistent mit den von Pfrepper et al. erhobenen Daten, welche ein anti-B19V-IgM nur bei 1% und anti-B19V-IgG bei 68% der 100 untersuchten gesunden Kontrollprobanden (Altersdurchschnitt: 35 Jahre)

dokumentierten (120). Da unsere Ergebnisse bei den 16 Kontrollprobanden mit denen von Pfrepper et al. bei 100 Kontrollprobanden übereinstimmend sind, verzichteten wir aus ökonomischen Gründen auf einen Ausbau unserer Untersuchungen bei der Kontroll-Patienten-Kohorte, zumal eine epidemiologisch aussagekräftige Erhebung durch Pfrepper et al. bereits veröffentlicht worden ist (120).

#### 4.4 Anti-B19V-IgM Antwort bei AMC- und DCM-Patienten

VP1- und/oder VP2-spezifische IgM-Antikörper, die für eine akute oder kürzlich zurückliegende Infektion sprechen, wurden nur bei AMC-Patienten nachgewiesen - aber weder bei gesunden Kontroll-Probanden noch bei DCM-Patienten. Die Abwesenheit von B19V-spezifischen IgM bei Patienten mit dem klinischen Verdacht auf AMC ist in Übereinstimmung mit der Annahme, dass anti-B19V-IgM-Antwort am wahrscheinlichsten in früheren Infektionsstadien detektierbar ist, also bei der AMC hinsichtlich des hier untersuchten Krankheitsbildes, nicht aber im späteren Erkrankungsstadium, der DCM (62). Diese Annahme könnte eine Herangehensweise darstellen, um eine akute myokardiale B19V-Infektion von einer nicht-akuten, chronischen B19V Infektion des Myokards zu unterscheiden. Es ist noch nicht richtig geklärt, warum eine IgM-Antwort nur bei einem Bruchteil der AMC-Patienten mit myokardialem B19V-Genom-Nachweis detektierbar ist. Nichtsdestotrotz ist davon auszugehen, dass aufgrund der Durchschnittsdauer der Krankheitsgeschichte bei AMC-Patienten ( $0,5 \pm 0,6$  Monate), die akute Phase der B19V-Infektion möglicherweise nicht rechtzeitig erfasst wurde. Außerdem kann der akute Beginn der jedwelcher myokardialen Virusinfektion oft subklinisch sein, so dass er meistens verpasst wird (10). Ferner ist bekannt, dass bei der B19V-assoziierten akuten Arthritis klinisch fassbare Symptome, wie der Hautausschlag, nicht unmittelbar bei der akuten Virusinfektion auftreten, sondern einige Tage oder Wochen danach (59), so dass generell bei B19V assoziierten akuten Erkrankungen die unmittelbar akute Infektion verpasst werden kann. Bei 2 AMC-Patienten wurde eine IgM-Antwort detektiert, obwohl ein negatives PCR-Ergebnis für B19V in den EMBs vorlag. Dies ist möglicherweise auf einen *sampling error* (Probenfehler) bei der nPCR Diagnostik von B19V in EMBs zurückzuführen. Während der *sampling error* bei der histologischen

Evaluation der aktiven oder *borderline* Myokarditis von Bedeutung ist, und auch gut untersucht worden ist (139), sind detaillierte *sampling error* Analysen für den nPCR Nachweis von B19V-Genomen in EMBs bis jetzt nicht beschrieben worden.

Die signifikante Assoziation zwischen dem Alter der Patienten und der anti-B19V Prävalenz ist möglicherweise so zu erklären, dass die AMC-Patienten-Gruppe, in der anti-B19V-IgM ausschließlich detektiert wurde, signifikant jünger war (Tabelle 2). Dadurch, dass anti-B19V-IgM-Antikörper nicht bei gesunden Kontrollen <40 Jahren detektiert wurden, können wir davon ausgehen, dass die Detektierbarkeit von anti-B19V-IgM kein natürliches Phänomen bei jüngeren Patienten ist, sondern krankheitsassoziiert ist. In diesem Zusammenhang sollte nicht unerwähnt bleiben, dass die AMC häufiger bei Patienten <40 Jahren vorkommt als bei älteren Patienten. Um die Prävalenz von anti-B19V-IgM-Antikörpern mittels B19V RecomLine® Blots bei gesunden Probanden klar zu definieren, ist jedoch eine auf einer größeren Patientenzahl basierende Untersuchung notwendig, was aber über das Maß dieser Arbeit hinaus gehen würde. Dies ist in der Arbeit von Pfrepper et al. (120) an 100 Individuen unternommen worden, und ist konsistent mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Daher haben wir uns nicht zuletzt aus ökonomischen Gesichtspunkten in dieser Arbeit eine repräsentative Kohorte von gesunden Kontroll-Probanden beschränkt.

#### **4.5 Anti-B19V-IgG-Antwort bei AMC- und DCM-Patienten**

VP1- und/oder VP2-spezifische IgG-Antikörper korrelieren signifikant mit der Detektierbarkeit von B19V-Genomen in EMBs. Eine ähnliche Assoziation zwischen der ELISA-Analyse von B19V-IgG und dem hochsensitiven nPCR Nachweis von B19V-Genomen wurde in einer Vorarbeit beschrieben, jedoch ohne Unterscheidung der anti-B19V Antikörper-Profile (9).

Eine altersabhängige Steigerung der anti-B19V-IgG-Antikörper mittels ELISA-Technik bei DCM-Patienten ist in der Literatur beschrieben. Dies ist im Gegensatz zu dem myokardialen nPCR Nachweis von B19V-Genomen, bei dem solche Altersabhängigkeit nicht bestätigt werden konnte (9). In dieser Arbeit konnten wir ebenfalls keine Altersabhängigkeit des B19V-Genom-Nachweises mittels nPCR beweisen. Unter Verwendung von B19V-recomLine® Blots wurde in dieser Arbeit

eine statistisch nicht signifikante Tendenz zu einer höheren anti-B19V-IgG-Seroprävalenz bei Patienten über 60 Jahren beobachtet.

Antikörper gegen denaturierte VP2-Proteine (charakteristisch für eine kurz zurückliegende Infektion) wurden bei AMC-Patienten, nicht aber bei DCM-Patienten mit nPCR-Nachweis von B19V-Genomen in den EMBs nachgewiesen. Auch dieses ist mit dem Akuitätsstadium der AMC versus DCM vereinbar.

Anti-NS1-spezifische IgG-Antikörper wurden bei DCM- Patienten (27,5%) und weniger häufig bei AMC-Patienten (6,0%) beobachtet. Anti-NS1-spezifische-IgG-Antikörper traten im Rahmen von nicht-kardialen Erkrankungen vorzugsweise bei Patienten mit verlängerter B19V-Virämie und persistierender Infektion auf (51, 78). Auch diese Befunde sind mit dem Akuitätsstadium der AMC versus DCM Patienten vereinbar. Die B19V-NS1-Expression ist mit einer Gewebe- und Zerstörung durch Apoptose und direkte Zytotoxizität verbunden (62, 140).

#### **4.6 Anti-B19V-humorale Immunantwort-Muster für die Bestimmung des Infektionsstadiums.**

Bei Patienten mit positiven nPCR-Ergebnissen für B19V-Genome in EMBs wurden Antikörper-Muster, die für eine kurz zurückliegende Infektion sprechen (Anwesenheit von IgM und IgG gegen denaturierte VP2-Proteine), mit einer signifikant höheren Prävalenz bei AMC- im Vergleich zu DCM-Patienten beobachtet. Entsprechend der Klassifikation der B19V-spezifischen Humoralantwort, wurden persistierende/ reaktivierende Infektionsmuster bei DCM-Patienten beobachtet. Diese waren abwesend bei allen AMC-Patienten, bei denen positive n-PCR-Ergebnisse von B19V-Genomen in EMB nachgewiesen wurden.

Bei Betrachtung des Stadiums vergangener Infektionen gab es keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der B19V Viruslast in EMBs zwischen den verschiedenen klinischen Verdachtsgruppen (AMC und DCM). Zum Vergleich: lang zurückliegende Infektionsstadien wurden nur bei 7,1% der DCM-Patienten ohne nPCR-Nachweis von viralen Genomen in den EMBs beobachtet. Daraus können wir schlussfolgern, dass - obwohl die Humoralantwort eine signifikante Assoziation mit myokardialen B19V-Infektionen bei Patienten mit dem klinischen Verdacht auf AMC und DCM zeigt - die isolierten Ergebnisse der Humoralantwort keine Relevanz haben, insbesondere



bei Patienten ohne nPCR-Nachweis einer myokardialen B19V-Infektion. Unsere Daten zeigen auch, dass B19V-spezifische IgG bei 45,5% der Patienten ohne virales Genom im Myokard nachgewiesen wurden. Die Diskrepanz von anti-B19V humoralen Antwort Profilen bei Patienten ohne nachweisbare myokardiale B19V-Infektion lässt sich möglicherweise durch das weit verbreitete Vorkommen von B19V erklären, was für eine rezidivierende und häufige B19V-Exposition auch bei Erwachsenen verantwortlich sein könnte. Dies erklärt auch die mit dem Alter steigende Prävalenz von anti-B19V-IgG-Antikörpern im Serum (9). Dies ist wahrscheinlich eine Erklärung dafür, dass die Signifikanz von vergangenen IgG-Profilen bei DCM-Patienten im Vergleich zu AMC-Patienten nicht statistisch signifikant war ( $p=0,06$ ). Unsere Daten bestätigen die Annahme, dass der positive serologische Nachweis von B19V-spezifischen-IgG-Antikörpern nicht genügt, um eine myokardiale B19V-Infektion zu beweisen ohne den zusätzlichen Nachweis von B19V Genomen in EMBs. Eine hohe Detektierbarkeit von anti-B19V-IgG-Antikörpern bestand bei 63% der gesunden Kontroll-Probanden, mit einem Muster, das für vorangegangene Infektionsstadien spricht (ohne IgG gegen linearen/denaturierten VP1/VP2). Folglich hat der positive serologische Nachweis von B19V-spezifische Antikörpern und die Bestimmung des Infektionsstadiums keine klinische Relevanz zu myokardiale B19V-Persistenz vor allem in der Abwesenheit von B19V im Myokard.

Zusammenfassend ermöglicht die Untersuchung der B19V-spezifischen IgM- und IgG-Antikörper eine klinisch bedeutsame Unterteilung der Infektionsstadien bei Patienten mit myokardialer B19V-Infektion. Um die Bedeutung der B19V-spezifischen humoralen Immunantwort auf ein B19V-assoziiertes kardiales Ereignis genauer zu definieren, sind Verlaufs-Untersuchungen für das Monitoring des spontanen Verlaufs der Viruselimination und -persistenz notwendig (9, 141).

Darüber hinaus könnte die kritische Differenzierung/Unterscheidung der B19V-spezifischen Antikörper unter antiviralen Therapieregimes ebenfalls sehr hilfreich sein, um den dynamischen Vorgang der humoralen Immunantwort bei Patienten mit einer persistierenden B19V myokardialen Infektion besser zu verstehen (13).

## 5 Zusammenfassung

Die inflammatorische Kardiomyopathie (DCMi) stellt ein komplexes Krankheitsbild dar, welches durch vielfältige und verschiedene Ätiologien induziert und unterhalten werden kann. Der klinische Verlauf kann akut oder chronisch sein. Ein Progress von der akuten Myokarditis (AMC) zur chronischen dilatativen Kardiomyopathie (DCM) ist möglich, wenngleich die dafür wesentlich ausschlaggebenden Mechanismen nicht detailliert bekannt sind. Die akute Infektion durch kardiotope Viren, und die Viruspersistenz, scheinen nach der aktuellen Datenlage eine entscheidende Rolle zu spielen.

Das B19V wurde in mehreren unabhängigen Untersuchungen mittels hochsensitiver nPCR (nested PCR) Methoden als häufigstes Virus in den Endomyokardbiopsien (EMBs) von AMC- und DCM-Patienten nachgewiesen. Bislang waren jedoch detaillierte Kenntnisse über das B19V Infektionsmuster im Herzmuskelgewebe ausstehend. Des Weiteren ist die humorale Antwort gegen B19V in diesem Patientenkollektiv nicht eingehend untersucht worden.

In dieser Arbeit untersuchten wir einerseits die Bedeutung von B19V-spezifischen IgG- und IgM- Antikörpern gegen native VP2-Kapside und denaturierte VP1-, VP2- und NS1-Proteine bei Patienten mit dem klinischen Verdacht auf AMC und DCM, um die Differenzierung des viralen Infektionsstadiums bei diesen Patientenkollektiven zu ermöglichen. B19V-spezifische IgG- und IgM-Antikörper wurden mit Hilfe von „recomLine® Blots“ in den Seren von 62 (n=33 AMC- und n=29 DCM-) Patienten untersucht. Bei der Amplifikation von B19V-Genomen in EMB mittels nPCR wurden positive Ergebnisse bei 63,6% der AMC- und 51,7% der DCM-Patienten beobachtet. IgM-Antikörper wurden ausschließlich bei AMC-Patienten (18,1%) detektiert. Der B19V-nPCR Nachweis in EMBs war mit der Prävalenz von B19V-spezifischen IgGs in den Seren assoziiert ( $p < 0,0001$ ). Bei Patienten mit gesicherter myokardialer B19V-Infektion waren Antikörper-Profile für kurz zurückliegende Infektionen häufiger bei AMC- (47,6%) im Vergleich zu DCM- (6,7%) Patienten. Die Prävalenz reaktivierender/persistierender Profile war signifikant häufiger bei DCM- (20%) im Vergleich zu AMC- (0%) Patienten ( $p < 0,05$ ).

Des Weiteren untersuchten wir die Detektierbarkeit und das zelluläre Expressionsmuster von B19V-Protein in EMBs von DCM-Patienten mittels Immunhistochemie (IHC), und deren Assoziation mit dem etablierten nPCR-Nachweis von B19V-Genomen in EMBs. Die B19V-VP1/VP2-Expression wurde immunhistochemisch unter Verwendung des bei anderen B19V-assoziierten Erkrankungen gut charakterisierten Klons R92F6 in den EMBs von 30 DCM-Patienten bestimmt. Die Spezifität dieses Antikörpers wurde auf pB19-M20 transfizierten HEK293T Zellen untersucht. Es bestand eine signifikante Assoziation zwischen der positiven anti-B19V-IHC (46,6%) und nPCR-positivem B19V-Genom-Nachweis (50%) ( $p=0,003$ ). Im Vergleich zu den B19V-nPCR-Ergebnissen wurde eine Sensitivität von 80% und eine Spezifität von 86% für die anti-B19V-VP1/VP2 IHC beobachtet. Dies entsprach einem positiven prädiktiven Wert von 85,7% und einem negativen prädiktiven Wert von 81,2%. Das Expressionsprofil von IHC-detektierten B19V-Protein-exprimierenden Zellen umfasste in allen Fällen interstitielle Zellen, und nur in Einzelfällen Endothelzellen (1 Fall) und Kardiomyozyten (4 Fälle).

Aus dieser Studie können folgende Schlußfolgerungen gezogen werden:

B19V-IgM-Antikörper lassen sich grundsätzlich bei AMC-, aber nicht DCM-Patienten nachweisen. Die Detektion der B19V-Antikörper ermöglicht eine klinisch bedeutsame Bestimmung des Infektionsstadiums (akute versus chronisch und persistierende/reaktivierende) bei Patienten mit nachgewiesener myokardialer B19V-Infektion. Die immunhistochemische Detektion von B19V-VP1/VP2-Expression bei DCM-Patienten ist mit dem nPCR Genom-Nachweis signifikant assoziiert, und stellt daher eine valide Methode dar, um das B19V-Expressionsprofil in EMBs von AMC- und DCM-Patienten zu untersuchen

Auf der Basis dieser methodischen Grundlagen bleibt es künftigen Studien vorenthalten zu untersuchen, welche prognostische Bedeutung diese Detektions- und Charakterisierungsmethoden für den natürlichen Verlauf der DCMi (Viruselimination versus -persistenz), und für die Auswahl von immunmodulatorischen Therapieregimes bei DCMi-Patienten haben (Immunsuppression, antivirale Interferon-Therapie, Immunadsorption).

**6 Literaturverzeichnis**

1. Sénag JB. Cardiac inflammation is difficult to diagnose and even if diagnosed, can we then treat it more effectively? *physician to Louis XV 1772*.
2. Corvisart J. Essai sur les maladies et les lésions organique du coeur. *Gates J MMSS 1812*; 118 299-303.
3. Virchow R. Cellular pathology. London: Churchill, 1860.
4. Sobernheim J. Praktische Diagnostik der inneren Krankheiten mit vorzueglicher Ruecksicht auf pathologische Anatomie. *Hirschwald, Berlin 1837* 118.
5. Romberg E. Über die Erkrankung des Herzmuskels bei Typhus abdominalis, Scharlach und Diphtherie. *Dt. Arch. Klin. Med 1891*; 48 369.
6. Fiedler A. Über akute interstitielle Myokarditis; in Festschrift zur Feier des fünfzigjährigen Bestehens des Stadtkrankenhauses zu Dresden-Friedrichstadt. *Bäensch, Dresden 1897* pp. 3-24.
7. Braimbridge MV, Darracott S, Chayen J, Bitensky L, Poulter LW. Possibility of a new infective aetiological agent in congestive cardiomyopathy. *Lancet 1967*; 1 (7483):171-6.
8. D'Ambrosio A, Patti G, Manzoli A, Sinagra G, Di Lenarda A, Silvestri F, Di Sciascio G. The fate of acute myocarditis between spontaneous improvement and evolution to dilated cardiomyopathy: a review. *Heart 2001*; 85 (5):499-504.
9. Kühl U, Pauschinger M, Noutsias M, Seeberg B, Bock T, Lassner D, Poller W, Kandolf R, Schultheiss HP. High prevalence of viral genomes and multiple viral infections in the myocardium of adults with "idiopathic" left ventricular dysfunction. *Circulation 2005*; 111 (7):887-93.
10. Liu PP, Mason JW. Advances in the understanding of myocarditis. *Circulation 2001*; 104 (9):1076-82.
11. Angelini A, Calzolari V, Calabrese F, Boffa GM, Maddalena F, Chioin R, Thiene G. Myocarditis mimicking acute myocardial infarction: role of endomyocardial biopsy in the differential diagnosis. *Heart 2000*; 84 (3):245-50.

12. Pankuweit S, Moll R, Baandrup U, Portig I, Hufnagel G, Maisch B. Prevalence of the parvovirus B19 genome in endomyocardial biopsy specimens. *Hum Pathol* 2003; 34 (5):497-503.
13. Kühl U, Pauschinger M, Bock T, Klingel K, Schwimmbeck CP, Seeberg B, Krautwurm L, Noutsias M, Poller W, Schultheiss HP, Kandolf R. Parvovirus B19 infection mimicking acute myocardial infarction. *Circulation* 2003; 108 (8):945-50.
14. Pauschinger M, Bowles NE, Fuentes-Garcia FJ, Pham V, Kuhl U, Schwimmbeck PL, Schultheiss HP, Towbin JA. Detection of adenoviral genome in the myocardium of adult patients with idiopathic left ventricular dysfunction. *Circulation* 1999; 99 (10):1348-54.
15. Matsumori A, Yutani C, Ikeda Y, Kawai S, Sasayama S. Hepatitis C virus from the hearts of patients with myocarditis and cardiomyopathy. *Lab Invest* 2000; 80 (7):1137-42.
16. Mahrholdt H, Goedecke C, Wagner A, Meinhardt G, Athanasiadis A, Vogelsberg H, Fritz P, Klingel K, Kandolf R, Sechtem U. Cardiovascular magnetic resonance assessment of human myocarditis: a comparison to histology and molecular pathology. *Circulation* 2004; 109 (10):1250-8.
17. Mahrholdt H, Wagner A, Deluigi CC, Kispert E, Hager S, Meinhardt G, Vogelsberg H, Fritz P, Dippon J, Bock CT, Klingel K, Kandolf R, Sechtem U. Presentation, patterns of myocardial damage, and clinical course of viral myocarditis. *Circulation* 2006; 114 (15):1581-90.
18. Wilske B, Fingerle V. [Diagnosis of Lyme borreliosis. How to corroborate suspected borreliosis]. *MMW Fortschr Med* 2000; 142 (15):28-31.
19. Schumacher G, Hess J, Bühlmeier K. Klinische Kinderkardiologie; Diagnostik und Therapie der angeborenen Herzfehler. München: Springer, 2007.
20. Kühl U, Pauschinger M, Seeberg B, Lassner D, Noutsias M, Poller W, Schultheiss HP. Viral persistence in the myocardium is associated with progressive cardiac dysfunction. *Circulation* 2005; 112 (13):1965-70.
21. Noutsias M, Pauschinger M, Poller WC, Schultheiss HP, Kühl U. Immunomodulatory treatment strategies in inflammatory cardiomyopathy:

- current status and future perspectives. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2004; 2 (1):37-51.
22. Kühl U, Pauschinger M, Poller W, Schultheiss HP. Anti-viral treatment in patients with virus-induced cardiomyopathy. *Ernst Schering Res Found Workshop* 2006 (55):323-42.
23. Richardson P, McKenna W, Bristow M, Maisch B, Mautner B, O'Connell J, Olsen E, Thiene G, Goodwin J, Gyarfás I, Martin I, Nordet P. Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of cardiomyopathies. *Circulation* 1996; 93 (5):841-2.
24. Report of the WHO/ISFC task force on the definition and classification of cardiomyopathies. *Br Heart J* 1980; 44 (6):672-3.
25. Zee-Cheng CS, Tsai CC, Palmer DC, Codd JE, Pennington DG, Williams GA. High incidence of myocarditis by endomyocardial biopsy in patients with idiopathic congestive cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 1984; 3 (1):63-70.
26. Maron BJ, McKenna WJ, Danielson GK, Kappenberger LJ, Kuhn HJ, Seidman CE, Shah PM, Spencer WH, 3rd, Spirito P, Ten Cate FJ, Wigle ED. American College of Cardiology/European Society of Cardiology Clinical Expert Consensus Document on Hypertrophic Cardiomyopathy. A report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Clinical Expert Consensus Documents and the European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines. *Eur Heart J* 2003; 24 (21):1965-91.
27. Elliott P, Andersson B, Arbustini E, Bilinska Z, Cecchi F, Charron P, Dubourg O, Kuhl U, Maisch B, McKenna WJ, Monserrat L, Pankuweit S, Rapezzi C, Seferovic P, Tavazzi L, Keren A. Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the European Society Of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *Eur Heart J* 2008; 29 (2):270-6.
28. Kaski JP, Elliott P. The classification concept of the ESC Working Group on myocardial and pericardial diseases for dilated cardiomyopathy. *Herz* 2007; 32 (6):446-51.

29. Noutsias M, Pauschinger M, Poller WC, Schultheiss HP, Kühl U. Current insights into the pathogenesis, diagnosis and therapy of inflammatory cardiomyopathy. *Heart Fail Monit* 2003; 3 (4):127-35.
30. Schultheiss HP. Cardiomyopathy: a post-viral autoimmune disease? *Ann Med Interne (Paris)* 1992; 143 (6):387-90.
31. Schulze K, Becker BF, Schauer R, Schultheiss HP. Antibodies to ADP-ATP carrier--an autoantigen in myocarditis and dilated cardiomyopathy--impair cardiac function. *Circulation* 1990; 81 (3):959-69.
32. Haarmann CM, Schwimbeck PL, Mertens T, Schultheiss HP, Strauer BE. Identification of serotype-specific and nonserotype-specific B-cell epitopes of coxsackie B virus using synthetic peptides. *Virology* 1994; 200 (2):381-9.
33. Schwimbeck PL, Badorff C, Schultheiss HP, Strauer BE. Transfer of human myocarditis into severe combined immunodeficiency mice. *Circ Res* 1994; 75 (1):156-64.
34. Gauntt CJ, Arizpe HM, Higdon AL, Wood HJ, Bowers DF, Rozek MM, Crawley R. Molecular mimicry, anti-coxsackievirus B3 neutralizing monoclonal antibodies, and myocarditis. *J Immunol* 1995; 154 (6):2983-95.
35. Gauntt CJ, Higdon AL, Arizpe HM, Tamayo MR, Crawley R, Henkel RD, Pereira ME, Tracy SM, Cunningham MW. Epitopes shared between coxsackievirus B3 (CVB3) and normal heart tissue contribute to CVB3-induced murine myocarditis. *Clin Immunol Immunopathol* 1993; 68 (2):129-34.
36. Smith SC, Ladenson JH, Mason JW, Jaffe AS. Elevations of cardiac troponin I associated with myocarditis. Experimental and clinical correlates. *Circulation* 1997; 95 (1):163-8.
37. Schultheiss HP, Noutsias M, Kühl U, Lassner D, Gross U, Poller W, Pauschinger M. [Cardiomyopathies. Part I: classification - dilated cardiomyopathy.]. *Internist (Berl)* 2005; 46 (11):1245-58.
38. Maisch B, Ristic AD, Hufnagel G, Pankuweit S. Pathophysiology of viral myocarditis: the role of humoral immune response. *Cardiovasc Pathol* 2002; 11 (2):112-22.

39. Poller W, Kühl U, Tschoepe C, Pauschinger M, Fechner H, Schultheiss HP. Genome-environment interactions in the molecular pathogenesis of dilated cardiomyopathy. *J Mol Med* 2005.
40. Noutsias M, Seeberg B, Schultheiss HP, Kuhl U. Expression of cell adhesion molecules in dilated cardiomyopathy: evidence for endothelial activation in inflammatory cardiomyopathy. *Circulation* 1999; 99 (16):2124-31.
41. Wojnicz R, Nowalany-Kozielska E, Wojciechowska C, Glanowska G, Wilczewski P, Niklewski T, Zembala M, Polonaci L, Rozek MM, Wodniecki J. Randomized, Placebo-Controlled Study for Immunosuppressive Treatment of Inflammatory Dilated Cardiomyopathy : Two-Year Follow-Up Results. *Circulation* 2001; 104 (1):39-45.
42. Badorff C, Lee GH, Lamphear BJ, Martone ME, Campbell KP, Rhoads RE, Knowlton KU. Enteroviral protease 2A cleaves dystrophin: evidence of cytoskeletal disruption in an acquired cardiomyopathy. *Nat Med* 1999; 5 (3):320-6.
43. Wessely R, Henke A, Zell R, Kandolf R, Knowlton KU. Low-level expression of a mutant coxsackieviral cDNA induces a myocytopathic effect in culture: an approach to the study of enteroviral persistence in cardiac myocytes. *Circulation* 1998; 98 (5):450-7.
44. Li Y, Bourlet T, Andreoletti L, Mosnier JF, Peng T, Yang Y, Archard LC, Pozzetto B, Zhang H. Enteroviral capsid protein VP1 is present in myocardial tissues from some patients with myocarditis or dilated cardiomyopathy. *Circulation* 2000; 101 (3):231-4.
45. Carlquist JF, Menlove RL, Murray MB, O'Connell JB, Anderson JL. HLA class II (DR and DQ) antigen associations in idiopathic dilated cardiomyopathy. Validation study and meta-analysis of published HLA association studies. *Circulation* 1991; 83 (2):515-22.
46. Warraich RS, Noutsias M, Kazak I, Seeberg B, Dunn MJ, Schultheiss HP, Yacoub MH, Kuhl U. Immunoglobulin G3 cardiac myosin autoantibodies correlate with left ventricular dysfunction in patients with dilated



- cardiomyopathy: immunoglobulin G3 and clinical correlates. *Am Heart J* 2002; 143 (6):1076-84.
47. Hunter JJ, Chien KR. Signaling pathways for cardiac hypertrophy and failure. *N Engl J Med* 1999; 341 (17):1276-83.
48. Li J, Schwimmbeck PL, Tschöpe C, Leschka S, Husmann L, Rutschow S, Reichenbach F, Noutsias M, Kobalz U, Poller W, Spillmann F, Zeichhardt H, Schultheiss HP, Pauschinger M. Collagen degradation in a murine myocarditis model: relevance of matrix metalloproteinase in association with inflammatory induction. *Cardiovasc Res* 2002; 56 (2):235-47.
49. Matsumori A. Cytokines in myocarditis and cardiomyopathies. *Curr Opin Cardiol* 1996; 11 (3):302-9.
50. Noutsias M, Hohmann C, Pauschinger M, Schwimmbeck PL, Ostermann K, Rode U, Yacoub MH, Kühl U, Schultheiss HP. sICAM-1 correlates with myocardial ICAM-1 expression in dilated cardiomyopathy. *Int J Cardiol* 2003; 91 (2-3):153-61.
51. Bultmann BD, Klingel K, Sotlar K, Bock CT, Kandolf R. Parvovirus B19: a pathogen responsible for more than hematologic disorders. *Virchows Arch* 2003; 442 (1):8-17.
52. Tschöpe C, Bock CT, Kasner M, Noutsias M, Westermann D, Schwimmbeck PL, Pauschinger M, Poller WC, Kuhl U, Kandolf R, Schultheiss HP. High prevalence of cardiac parvovirus B19 infection in patients with isolated left ventricular diastolic dysfunction. *Circulation* 2005; 111 (7):879-86.
53. Vallbracht KB, Schwimmbeck PL, Kuhl U, Seeberg B, Schultheiss HP. Endothelium-dependent flow-mediated vasodilation of systemic arteries is impaired in patients with myocardial virus persistence. *Circulation* 2004; 110 (18):2938-45.
54. Brown KE, Hibbs JR, Gallinella G, Anderson SM, Lehman ED, McCarthy P, Young NS. Resistance to parvovirus B19 infection due to lack of virus receptor (erythrocyte P antigen). *N Engl J Med* 1994; 330 (17):1192-6.

55. Kerr S, O'Keeffe G, Kilty C, Doyle S. Undenatured parvovirus B19 antigens are essential for the accurate detection of parvovirus B19 IgG. *J Med Virol* 1999; 57 (2):179-85.
56. Cohen BJ, Buckley MM. The prevalence of antibody to human parvovirus B19 in England and Wales. *J Med Microbiol* 1988; 25 (2):151-3.
57. Hemauer A, Gigler A, Searle K, Beckenlehner K, Raab U, Broliden K, Wolf H, Enders G, Modrow S. Seroprevalence of parvovirus B19 NS1-specific IgG in B19-infected and uninfected individuals and in infected pregnant women. *J Med Virol* 2000; 60 (1):48-55.
58. Knoll A, Louwen F, Kochanowski B, Plentz A, Stussel J, Beckenlehner K, Jilg W, Modrow S. Parvovirus B19 infection in pregnancy: quantitative viral DNA analysis using a kinetic fluorescence detection system (TaqMan PCR). *J Med Virol* 2002; 67 (2):259-66.
59. Modrow S. Parvovirus B19: the causative agent of dilated cardiomyopathy or a harmless passenger of the human myocard? *Ernst Schering Res Found Workshop* 2006 (55):63-82.
60. Cossart YE, Field AM, Cant B, Widdows D. Parvovirus-like particles in human sera. *Lancet* 1975; 1 (7898):72-3.
61. Anderson MJ, Lewis E, Kidd IM, Hall SM, Cohen BJ. An outbreak of erythema infectiosum associated with human parvovirus infection. *J Hyg (Lond)* 1984; 93 (1):85-93.
62. Lehmann HW, Knoll A, Kuster RM, Modrow S. Frequent infection with a viral pathogen, parvovirus B19, in rheumatic diseases of childhood. *Arthritis Rheum* 2003; 48 (6):1631-8.
63. Murry CE, Jerome KR, Reichenbach DD. Fatal parvovirus myocarditis in a 5-year-old girl. *Hum Pathol* 2001; 32 (3):342-5.
64. Wang X, Zhang G, Liu F, Han M, Xu D, Zang Y. Prevalence of human parvovirus B19 DNA in cardiac tissues of patients with congenital heart diseases indicated by nested PCR and in situ hybridization. *J Clin Virol* 2004; 31 (1):20-4.
65. Young NS, Brown KE. Parvovirus B19. *N Engl J Med* 2004; 350 (6):586-97.

66. Astell CR, Chow MB, Ward DC. Sequence analysis of the termini of virion and replicative forms of minute virus of mice DNA suggests a modified rolling hairpin model for autonomous parvovirus DNA replication. *J Virol* 1985; 54 (1):171-7.
67. Hsu TC, Wu WJ, Chen MC, Tsay GJ. Human parvovirus B19 non-structural protein (NS1) induces apoptosis through mitochondria cell death pathway in COS-7 cells. *Scand J Infect Dis* 2004; 36 (8):570-7.
68. Chisaka H, Morita E, Yaegashi N, Sugamura K. Parvovirus B19 and the pathogenesis of anaemia. *Rev Med Virol* 2003; 13 (6):347-59.
69. Brown KE, Anderson SM, Young NS. Erythrocyte P antigen: cellular receptor for B19 parvovirus. *Science* 1993; 262 (5130):114-7.
70. von dem Borne AE, Bos MJ, Joustra-Maas N, Tromp JF, van't Veer MB, van Wijngaarden-du Bois R, Tetteroo PA. A murine monoclonal IgM antibody specific for blood group P antigen (globoside). *Br J Haematol* 1986; 63 (1):35-46.
71. Rouger P, Gane P, Salmon C. Tissue distribution of H, Lewis and P antigens as shown by a panel of 18 monoclonal antibodies. *Rev Fr Transfus Immunohematol* 1987; 30 (5):699-708.
72. Weigel-Kelley KA, Yoder MC, Chen L, Srivastava A. Role of integrin cross-regulation in parvovirus B19 targeting. *Hum Gene Ther* 2006; 17 (9):909-20.
73. Weigel-Kelley KA, Yoder MC, Srivastava A. Alpha5beta1 integrin as a cellular coreceptor for human parvovirus B19: requirement of functional activation of beta1 integrin for viral entry. *Blood* 2003; 102 (12):3927-33.
74. Weigel-Kelley KA, Yoder MC, Srivastava A. Recombinant human parvovirus B19 vectors: erythrocyte P antigen is necessary but not sufficient for successful transduction of human hematopoietic cells. *J Virol* 2001; 75 (9):4110-6.
75. Isa A, Kasprowicz V, Norbeck O, Loughry A, Jeffery K, Broliden K, Klenerman P, Tolfvenstam T, Bowness P. Prolonged activation of virus-specific CD8+T cells after acute B19 infection. *PLoS Med* 2005; 2 (12):e343.

76. Streitz M, Noutsias M, Volkmer R, Rohde M, Brestrich G, Block A, Klippert K, Kotsch K, Ay B, Hummel M, Kuhl U, Lassner D, Schultheiss HP, Volk HD, Kern F. NS1 specific CD8+ T-cells with effector function and TRBV11 dominance in a patient with parvovirus B19 associated inflammatory cardiomyopathy. *PLoS ONE* 2008; 3 (6):e2361.
77. Kerr JR, Cunniffe VS. Antibodies to parvovirus B19 non-structural protein are associated with chronic but not acute arthritis following B19 infection. *Rheumatology (Oxford)* 2000; 39 (8):903-8.
78. Lehmann HW, Kuhner L, Beckenlehner K, Muller-Godeffroy E, Heide KG, Kuster RM, Modrow S. Chronic human parvovirus B19 infection in rheumatic disease of childhood and adolescence. *J Clin Virol* 2002; 25 (2):135-43.
79. Lunardi C, Tiso M, Borgato L, Nanni L, Millo R, De Sandre G, Severi AB, Puccetti A. Chronic parvovirus B19 infection induces the production of anti-virus antibodies with autoantigen binding properties. *Eur J Immunol* 1998; 28 (3):936-48.
80. Arakelov S, Gorny MK, Williams C, Riggin CH, Brady F, Collett MS, Zolla-Pazner S. Generation of neutralizing anti-B19 parvovirus human monoclonal antibodies from patients infected with human immunodeficiency virus. *J Infect Dis* 1993; 168 (3):580-5.
81. Brown CS, Jensen T, Meloen RH, Puijk W, Sugamura K, Sato H, Spaan WJ. Localization of an immunodominant domain on baculovirus-produced parvovirus B19 capsids: correlation to a major surface region on the native virus particle. *J Virol* 1992; 66 (12):6989-96.
82. Gigler A, Dorsch S, Hemauer A, Williams C, Kim S, Young NS, Zolla-Pazner S, Wolf H, Gorny MK, Modrow S. Generation of neutralizing human monoclonal antibodies against parvovirus B19 proteins. *J Virol* 1999; 73 (3):1974-9.
83. Yoshimoto K, Rosenfeld S, Frickhofen N, Kennedy D, Hills R, Kajigaya S, Young NS. A second neutralizing epitope of B19 parvovirus implicates the spike region in the immune response. *J Virol* 1991; 65 (12):7056-60.

84. Chen S, Howard O. Images in clinical medicine. Parvovirus B19 infection. *N Engl J Med* 2004; 350 (6):598.
85. Mason JW, O'Connell JB, Herskowitz A, Rose NR, McManus BM, Billingham ME, Moon TE. A clinical trial of immunosuppressive therapy for myocarditis. The Myocarditis Treatment Trial Investigators. *N Engl J Med* 1995; 333 (5):269-75.
86. Maisch B, Camerini F, Schultheiss HP. Immunosuppressive therapy for myocarditis [letter; comment]. *N Engl J Med* 1995; 333 (25):1713; discussion 1714.
87. Frustaci A, Chimenti C, Calabrese F, Pieroni M, Thiene G, Maseri A. Immunosuppressive therapy for active lymphocytic myocarditis: virological and immunologic profile of responders versus nonresponders. *Circulation* 2003; 107 (6):857-63.
88. Noutsias M, Pauschinger M, Schultheiss HP, Kühl U. Advances in the immunohistological diagnosis of inflammatory cardiomyopathy. *Eur Heart J* 2002; Supplement 4 (I):I54-I62.
89. Noutsias M, Seeberg B, Schultheiss HP, Kühl U. Expression of cell adhesion molecules in dilated cardiomyopathy: evidence for endothelial activation in inflammatory cardiomyopathy. *Circulation* 1999; 99 (16):2124-31.
90. Gagliardi MG, Bevilacqua M, Bassano C, Leonardi B, Boldrini R, Camassei FD, Fierabracci A, Ugazio AG, Bottazzo GF. Long term follow up of children with myocarditis treated by immunosuppression and of children with dilated cardiomyopathy. *Heart* 2004; 90 (10):1167-71.
91. McNamara DM, Holubkov R, Starling RC, Dec GW, Loh E, Torre-Amione G, Gass A, Janosko K, Tokarczyk T, Kessler P, Mann DL, Feldman AM. Controlled trial of intravenous immune globulin in recent-onset dilated cardiomyopathy. *Circulation* 2001; 103 (18):2254-9.
92. Stanton C, Mookadam F, Cha S, McNamara D, Aukrust P, Wojnicz R, Bailey KR, Cooper LT. Greater symptom duration predicts response to immunomodulatory therapy in dilated cardiomyopathy. *Int J Cardiol* 2008; 128 (1):38-41.

93. Kühl U, Schultheiss HP. Treatment of chronic myocarditis with corticosteroids. *Eur Heart J* 1995; 16 (Suppl O):168-72.
94. Parrillo JE. Inflammatory cardiomyopathy (myocarditis) : which patients should be treated with anti-inflammatory therapy? *Circulation* 2001; 104 (1):4-6.
95. Felix SB, Staudt A, Dorffel WV, Stangl V, Merkel K, Pohl M, Docke WD, Morgera S, Neumayer HH, Wernecke KD, Wallukat G, Stangl K, Baumann G. Hemodynamic effects of immunoabsorption and subsequent immunoglobulin substitution in dilated cardiomyopathy: three-month results from a randomized study. *J Am Coll Cardiol* 2000; 35 (6):1590-8.
96. Staudt A, Schaper F, Stangl V, Plagemann A, Bohm M, Merkel K, Wallukat G, Wernecke KD, Stangl K, Baumann G, Felix SB. Immunohistological changes in dilated cardiomyopathy induced by immunoabsorption therapy and subsequent immunoglobulin substitution. *Circulation* 2001; 103 (22):2681-6.
97. Chimenti C, Calabrese F, Pieroni M, Verardo R, Thiene G, Maseri A, Frustaci A. Active lymphocytic myocarditis: Virologic and immunologic profile of responders versus non-responders to immunosuppressive therapy. *Circulation* 2001; 104 (17):II-559 (Abstract).
98. Kühl U, Pauschinger M, Schultheiss HP. [Etiopathogenetic differentiation of inflammatory cardiomyopathy. Immunosuppression and immunomodulation]. *Internist (Berl)* 1997; 38 (6):590-601.
99. Heim A, Grumbach I, Pring-Akerblom P, Stille-Siegener M, Müller G, Kandolf R, Figulla HR. Inhibition of coxsackievirus B3 carrier state infection of cultured human myocardial fibroblasts by ribavirin and human natural interferon-alpha. *Antiviral Res* 1997; 34 (3):101-11.
100. Horwitz MS, La Cava A, Fine C, Rodriguez E, Ilic A, Sarvetnick N. Pancreatic expression of interferon-gamma protects mice from lethal coxsackievirus B3 infection and subsequent myocarditis. *Nat Med* 2000; 6 (6):693-7.
101. Kühl U, Pauschinger M, Schwimmbeck PL, Seeberg B, Lober C, Noutsias M, Poller W, Schultheiss HP. Interferon-beta treatment eliminates cardiotropic viruses and improves left ventricular function in patients with myocardial

- persistence of viral genomes and left ventricular dysfunction. *Circulation* 2003; 107 (22):2793-8.
102. Pankuweit S, Funck R, Grimm W, Maisch B. [Diagnosis and treatment of inflammatory heart diseases: role of endomyocardial biopsy]. *Herz* 2006; 31 (4):361-5.
103. Karatolios K, Pankuweit S, Maisch B. Diagnosis and treatment of myocarditis: the role of endomyocardial biopsy. *Curr Treat Options Cardiovasc Med* 2007; 9 (6):473-81.
104. Kühl U, Noutsias M, Seeberg B, Schultheiss HP. Immunohistological evidence for a chronic intramyocardial inflammatory process in dilated cardiomyopathy. *Heart* 1996; 75 (3):295-300.
105. Noutsias M, Kühl U, Lassner D, Gross U, Pauschinger M, Schultheiss HP, Gutberlet M. Parvovirus B19-associated active myocarditis with biventricular thrombi - results of endomyocardial biopsy investigations and cardiac magnetic resonance imaging. *Circulation* 2007; 115 (13):e378-80.
106. Noutsias M, Pauschinger M, Ostermann K, Escher F, Blohm JH, Schultheiss H, Kühl U. Digital image analysis system for the quantification of infiltrates and cell adhesion molecules in inflammatory cardiomyopathy. *Med Sci Monit* 2002; 8 (5):MT59-71.
107. Noutsias M, Fechner H, de Jonge H, Wang X, Dekkers D, Houtsmuller AB, Pauschinger M, Bergelson J, Warraich R, Yacoub M, Hetzer R, Lamers J, Schultheiss HP, Poller W. Human coxsackie-adenovirus receptor is colocalized with integrins alpha(v)beta(3) and alpha(v)beta(5) on the cardiomyocyte sarcolemma and upregulated in dilated cardiomyopathy: implications for cardiotropic viral infections. *Circulation* 2001; 104 (3):275-80.
108. Bratthauer GL. The avidin-biotin complex (ABC) method. *Methods Mol Biol* 1994; 34 175-84.
109. Sabattini E, Bisgaard K, Ascani S, Poggi S, Piccioli M, Ceccarelli C, Pieri F, Fraternali-Orcioni G, Pileri SA. The EnVision++ system: a new immunohistochemical method for diagnostics and research. *Critical*

- comparison with the APAAP, ChemMate, CSA, LABC, and SABC techniques. *J Clin Pathol* 1998; 51 (7):506-11.
110. Noutsias M, Pauschinger M, Schultheiss HP, Kuhl U. Cytotoxic perforin+ and TIA-1+ infiltrates are associated with cell adhesion molecule expression in dilated cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail* 2003; 5 (4):469-79.
111. Rickham PP. Human Experimentation. Code of Ethics of the World Medical Association. Declaration of Helsinki. *Br Med J* 1964; 2 (5402):177.
112. Holzmann M, Nicko A, Kühl U, Noutsias M, Poller W, Hoffmann W, Morguet A, Witzenbichler B, Tschope C, Schultheiss HP, Pauschinger M. Complication rate of right ventricular endomyocardial biopsy via the femoral approach: a retrospective and prospective study analyzing 3048 diagnostic procedures over an 11-year period. *Circulation* 2008; 118 (17):1722-8.
113. Fechner H, Noutsias M, Tschoepe C, Hinze K, Wang X, Escher F, Pauschinger M, Dekkers D, Vetter R, Paul M, Lamers J, Schultheiss HP, Poller W. Induction of coxsackievirus-adenovirus-receptor expression during myocardial tissue formation and remodeling: identification of a cell-to-cell contact-dependent regulatory mechanism. *Circulation* 2003; 107 (6):876-82.
114. Tschöpe C, Walther T, Escher F, Spillmann F, Du J, Altmann C, Schimke I, Bader M, Sanchez-Ferrer CF, Schultheiss HP, Noutsias M. Transgenic activation of the kallikrein-kinin system inhibits intramyocardial inflammation, endothelial dysfunction and oxidative stress in experimental diabetic cardiomyopathy. *Faseb J* 2005; 19 (14):2057-9.
115. Ghadjar P, Coupland SE, Na IK, Noutsias M, Letsch A, Stroux A, Bauer S, Buhr HJ, Thiel E, Scheibenbogen C, Keilholz U. Chemokine receptor CCR6 expression level and liver metastases in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2006; 24 (12):1910-6.
116. Ghadjar P, Loddenkemper C, Coupland SE, Stroux A, Noutsias M, Thiel E, Christoph F, Miller K, Scheibenbogen C, Keilholz U. Chemokine receptor CCR6 expression level and aggressiveness of prostate cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2008.



117. Chander S, Talwar KK, Chopra P. Immunohistochemical characterisation and quantitative evaluation of lymphomononuclear cells in dilated cardiomyopathy-an endomyocardial biopsy study. *Indian Heart J* 1995; 47 (4):360-4.
118. Liefeldt L, Plentz A, Klempa B, Kershaw O, Endres AS, Raab U, Neumayer HH, Meisel H, Modrow S. Recurrent high level parvovirus B19/genotype 2 viremia in a renal transplant recipient analyzed by real-time PCR for simultaneous detection of genotypes 1 to 3. *J Med Virol* 2005; 75 (1):161-9.
119. Soderlund M, Brown CS, Spaan WJ, Hedman L, Hedman K. Epitope type-specific IgG responses to capsid proteins VP1 and VP2 of human parvovirus B19. *J Infect Dis* 1995; 172 (6):1431-6.
120. Pfrepper KI, Enders M, Motz M. Human parvovirus B19 serology and avidity using a combination of recombinant antigens enables a differentiated picture of the current state of infection. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2005; 52 (7-8):362-5.
121. Selinka HC, Wolde A, Sauter M, Kandolf R, Klingel K. Virus-receptor interactions of coxsackie B viruses and their putative influence on cardiotropism. *Med Microbiol Immunol* 2004; 193 (2-3):127-31.
122. Klingel K, Selinka HC, Huber M, Sauter M, Leube M, Kandolf R. Molecular pathology and structural features of enteroviral replication. Toward understanding the pathogenesis of viral heart disease. *Herz* 2000; 25 (3):216-20.
123. Brown KE, Young NS, Liu JM. Molecular, cellular and clinical aspects of parvovirus B19 infection. *Crit Rev Oncol Hematol* 1994; 16 (1):1-31.
124. Barton LL, Lax D, Shehab ZM, Keith JC. Congenital cardiomyopathy associated with human parvovirus B19 infection. *Am Heart J* 1997; 133 (1):131-3.
125. Cherry JD. Parvovirus infections in children and adults. *Adv Pediatr* 1999; 46 245-69.
126. Porter HJ, Quantrill AM, Fleming KA. B19 parvovirus infection of myocardial cells. *Lancet* 1988; 1 (8584):535-6.

127. Papadogiannakis N, Tolfvenstam T, Fischler B, Norbeck O, Broliden K. Active, fulminant, lethal myocarditis associated with parvovirus B19 infection in an infant. *Clin Infect Dis* 2002; 35 (9):1027-31.
128. De Cobelli F, Pieroni M, Esposito A, Chimenti C, Belloni E, Mellone R, Canu T, Perseghin G, Gaudio C, Maseri A, Frustaci A, Del Maschio A. Delayed gadolinium-enhanced cardiac magnetic resonance in patients with chronic myocarditis presenting with heart failure or recurrent arrhythmias. *J Am Coll Cardiol* 2006; 47 (8):1649-54.
129. Gutberlet M, Spors B, Thoma T, Bertram H, Denecke T, Felix R, Noutsias M, Schultheiss HP, Kühl U. Suspected chronic myocarditis at cardiac MR: diagnostic accuracy and association with immunohistologically detected inflammation and viral persistence. *Radiology* 2008; 246 (2):401-9.
130. Dettmeyer R, Baasner A, Schlamann M, Padosch SA, Haag C, Kandolf R, Madea B. Role of virus-induced myocardial affections in sudden infant death syndrome: a prospective postmortem study. *Pediatr Res* 2004; 55 (6):947-52.
131. Vadlamudi G, Rezuke WN, Ross JW, Cartun RW, Ackroyd R, Knibbs DR, Tsongalis GJ. The use of monoclonal antibody R92F6 and polymerase chain reaction to confirm the presence of parvovirus B19 in bone marrow specimens of patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Arch Pathol Lab Med* 1999; 123 (9):768-73.
132. O'Neill HJ, Coyle PV. Two anti-parvovirus B 19 IgM capture assays incorporating a mouse monoclonal antibody specific for B 19 viral capsid proteins VP 1 and VP 2. *Arch Virol* 1992; 123 (1-2):125-34.
133. Morey AL, Ferguson DJ, Fleming KA. Combined immunocytochemistry and non-isotopic in situ hybridization for the ultrastructural investigation of human parvovirus B19 infection. *Histochem J* 1995; 27 (1):46-53.
134. Loughrey AC, O'Neill HJ, Coyle PV, DeLeys R. Identification and use of a neutralising epitope of parvovirus B19 for the rapid detection of virus infection. *J Med Virol* 1993; 39 (2):97-100.

135. Takahashi Y, Murai C, Shibata S, Munakata Y, Ishii T, Ishii K, Saitoh T, Sawai T, Sugamura K, Sasaki T. Human parvovirus B19 as a causative agent for rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95 (14):8227-32.
136. Dorsch S, Liebisch G, Kaufmann B, von Landenberg P, Hoffmann JH, Drobnik W, Modrow S. The VP1 unique region of parvovirus B19 and its constituent phospholipase A2-like activity. *J Virol* 2002; 76 (4):2014-8.
137. Norja P, Hokynar K, Aaltonen LM, Chen R, Ranki A, Partio EK, Kiviluoto O, Davidkin I, Leivo T, Eis-Hubinger AM, Schneider B, Fischer HP, Tolba R, Vapalahti O, Vaheri A, Soderlund-Venermo M, Hedman K. Bioportfolio: lifelong persistence of variant and prototypic erythrovirus DNA genomes in human tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103 (19):7450-3.
138. Kindermann I, Kindermann M, Kandolf R, Klingel K, Bultmann B, Muller T, Lindinger A, Bohm M. Predictors of outcome in patients with suspected myocarditis. *Circulation* 2008; 118 (6):639-48.
139. Hauck AJ, Kearney DL, Edwards WD. Evaluation of postmortem endomyocardial biopsy specimens from 38 patients with lymphocytic myocarditis: implications for role of sampling error. *Mayo Clin Proc* 1989; 64 (10):1235-45.
140. Moffatt S, Yaegashi N, Tada K, Tanaka N, Sugamura K. Human parvovirus B19 nonstructural (NS1) protein induces apoptosis in erythroid lineage cells. *J Virol* 1998; 72 (4):3018-28.
141. Modrow S, Dorsch S. Antibody responses in parvovirus B19 infected patients. *Pathol Biol (Paris)* 2002; 50 (5):326-31.

## 7 Anhang

### 7.1 *Publikationen in peer reviewed Journalen*

Teile dieser Promotionsarbeit sind in den folgenden Publikationen in *peer reviewed Journalen* erschienen:

1. Escher F, Kühl U, **Sabi TM**, Suckau L, Lassner D, Poller W, Schultheiss HP, Noutsias M. Immunohistological detection of Parvovirus B19 capsid proteins in endomyocardial biopsies from dilated cardiomyopathy patients. *Med Sci Monit* 2008; 14 (6):CR333-338.
2. Escher F, Modrow S, **Sabi TM**, Kuhl U, Lassner D, Schultheiss HP, Noutsias M. Parvovirus B19 profiles in patients presenting with acute myocarditis and chronic dilated cardiomyopathy. *Med Sci Monit* 2008; 14 (12):CR589-597.

Weitere Publikationen des Promovierenden in *peer reviewed Journalen*:

1. Zanjani KS; **Sabi TM**; Moysich A, Ovroutski S; Peters B, Miera O, Kühne T, Nagdyman N, Berger F, Ewert P. Feasibility and efficacy of stent redilatation in aortic coarctation. *Catheter Cardiovasc Interv.* 2008 Oct 1;72(4):552-6.
2. **Sabi TM**, Schmitt B, Sigler M, Zanjani KS, Ovroutski S, Peters B, Miera O, Nagdyman N, Kuehne T, Berger F, Ewert P. Transcatheter Creation of an Aortopulmonary Shunt in an Animal Model. *Catheter Cardiovasc Inter.* 2009 (*in press*).

## **7.2 Publierte Abstracts von Vorträgen**

Teile dieser Promotionsarbeit sind auf dem Heart Failure Kongress 2007 der *European Society of Cardiology* präsentiert und entsprechend publiziert worden:

1. Escher F, **Sabi TM**, Kuehl U, Lassner D, Suckau L, Poller WC, Schultheiss HP, Noutsias M. Immunohistological detection of parvovirus B19 VP1- and VP2-capsid proteins in endomyocardial biopsies from dilated cardiomyopathy patients. *Eur J Heart Fail* 2007; 6 24-24.

Weitere publizierte Abstracts des Promovierenden:

1. Ewert P, Moysich A, Peters B, Ovroutski S, Miera O, Nagdyman N, **Sabi TM**, Berger F. "Survival" of pulmonary stents – an analysis of 157 implanted stents from 1992 to 2006. 40. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pädiatrische Kardiologie. Neu-Ulm, 4.-7.10.2008. *Clinical Res Cardiol* 2008; 97 (9): 684.

### **7.3 Danksagung**

Mein herzlicher Dank gilt hochachtungsvoll Prof. Dr. med. Heinz-Peter Schultheiß, dem Direktor des CC11 der Charité – Universitätsmedizin Berlin) für die freundliche Überlassung des thematischen Promotionsrahmens sowie die hervorragende Förderung und Unterstützung der Arbeit im Rahmen des Sonderforschungsbereichs Transregio 19 „Inflammatorische Kardiomyopathie – Molekulare Pathogenese und Therapie“.

Herrn Dr. med. Michel Noutsias (CC11, Charité – Universitätsmedizin Berlin) möchte ich insbesondere für den Entwurf des Themas, der Fragestellungen und der angewandten Methoden, sowie für seine stetige, hingebungsvolle und in jeder Hinsicht intensive direkte Betreuung meiner Doktorarbeit herzlichst und persönlich danken. Dieses umfasste neben der direkten Betreuung auch die unabdingbare Unterstützung bei der klinischen Charakterisierung der untersuchten Patienten, der statistischen Analyse, der Diskussion, der Publikation dieser Daten, sowie die kritische Korrektur meiner Promotionsschrift.

Den Herren Dr. rer. nat. Uwe Kühl (CC11, Charité – Universitätsmedizin Berlin) und Dr. rer. nat. Dirk Lassner (IKDT – Institut für kardiale Diagnostik und Therapie GmbH, Berlin) möchte ich für die B19V nPCR und qPCR Analysen der EMBs danken.

An Frau Prof. Dr. Susanne Modrow (Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Universität Regensburg) richtet sich mein herzlicher Dank für die entscheidende Hilfestellung bei der Interpretation der anti-B19V ELISA und recomLine® Blot Ergebnisse.

Prof. Dr. med. Wolfgang-Christian Poller und Dr. rer. nat. Lennart Suckau gebührt mein herzlicher Dank für die Überlassung der pB19-M20 transfizierten 293T Zellen.

Allen Mitarbeitern des CC11 der Charité – Universitätsmedizin Berlin am Campus Benjamin Franklin möchte ich für die angenehme Zusammenarbeit danken, dabei gilt

mein besonderer Dank Frau Dr. Felicitas Escher für die methodische Begleitung und die Beteiligung an der statistischen Analyse und der Verfassung der Publikationen.

Mein persönlicher Dank richtet sich auch an meine liebe Familie (Claudia Wolf und unsere Tochter Charlotte Enyah Sabi) für ihre Geduld und hingebungsvolle Unterstützung während der Fertigstellung der Arbeit. Mein persönlicher und besonderer Dank richtet sich auch an meine Eltern Daniel Sabi und Beatrice Enyah Sabi – ohne sie wäre ich nie soweit gekommen.

## **7.5 Erklärung**

„Ich, Titus Sabi, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema:

**Immunhistologische Detektion von Parvovirus B19 (B19V) Kapsid-Proteinen  
und B19V-spezifische Antikörper-Profile bei  
Patienten mit akuter Myokarditis und dilatativer Kardiomyopathie**

selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, den 19.01.2008

Titus Mbah Sabi