

Aus dem Robert Koch-Institut Berlin

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

Dissertation

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

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

vorgelegt von

Oliver Donoso Mantke

Diplom-Biologe aus Berlin

März 2005

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

Disputation am: 20. Juni 2005

Für meine Eltern...

wegen Eurer Liebe, freundschaftlichen Erziehung und Eurem moralischen Beistand

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

Le petit prince (Der kleine Prinz)

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

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

Inhaltsverzeichnis

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

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

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

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