

3. Ergebnisse

3.1 Daten zu den Patienten und Proben

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

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

Tabelle 6:

Daten zu den Patienten und Proben.

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

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

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

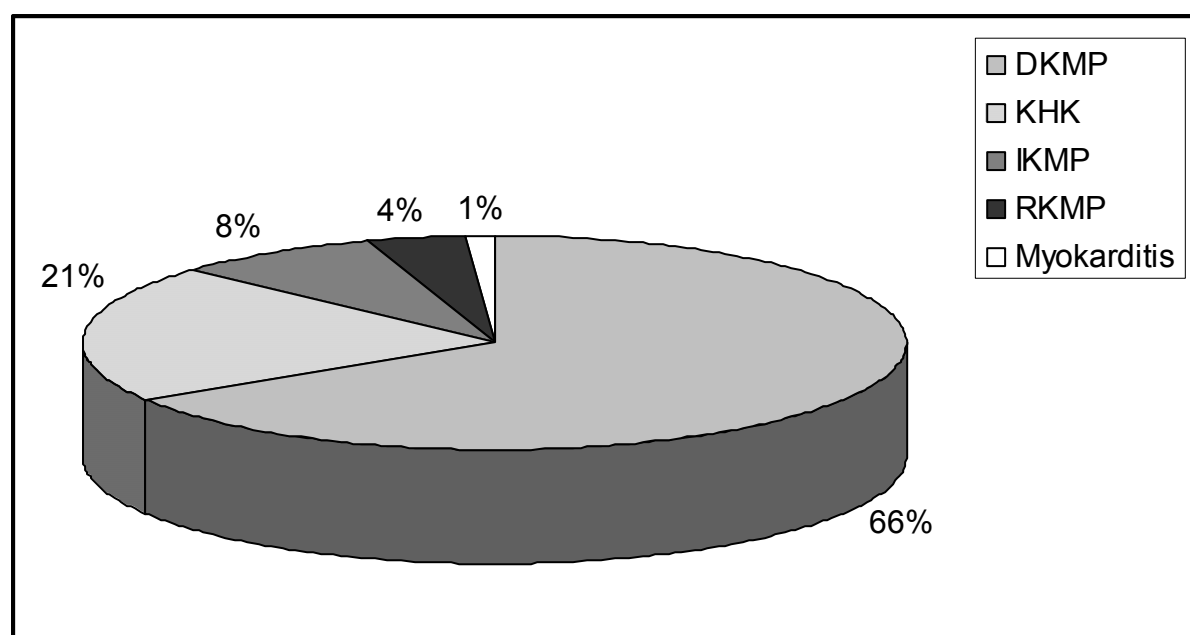
Tabelle 7: Altersverteilung der HTx-Patienten und Herzspender.

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

Altersgrenze für Herz- bzw. Klappenspende

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

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

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

Prozentwerte sind gerundet.

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

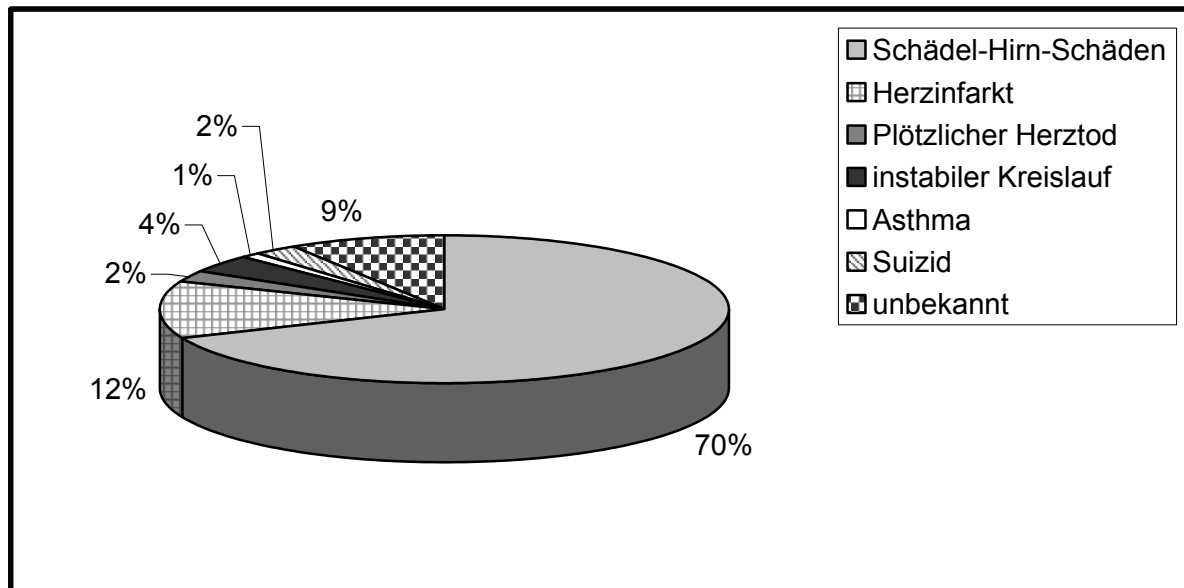


Abbildung 12: Todesursachen der Herzspender (n= 80).

Prozentwerte sind gerundet.

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

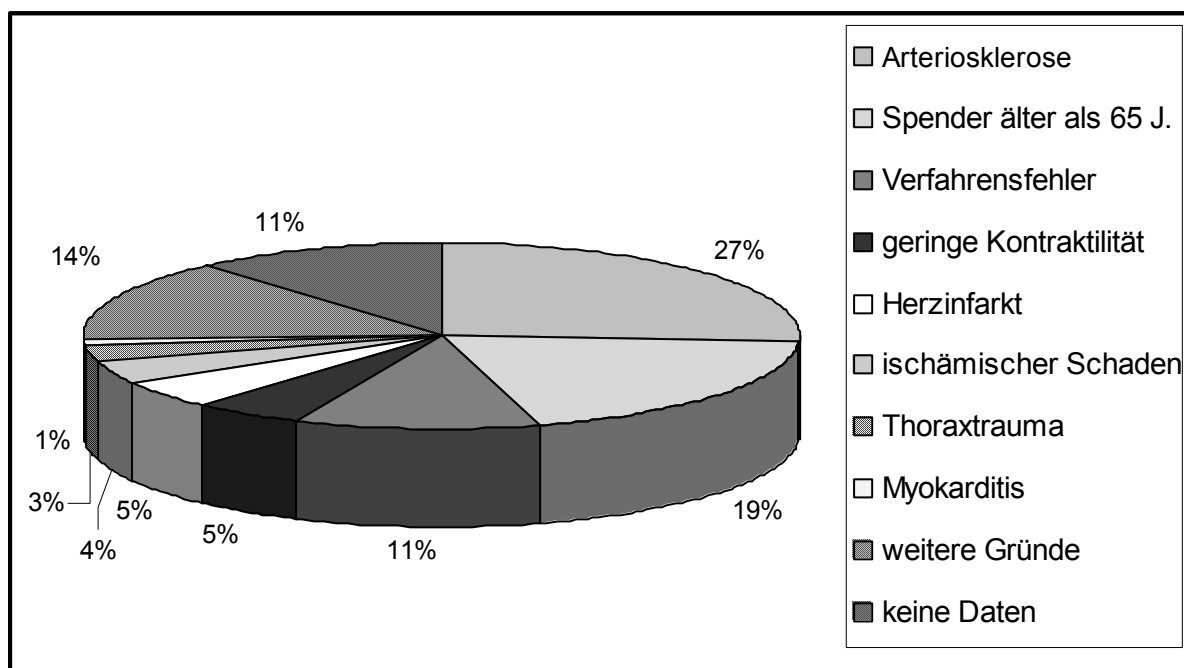


Abbildung 13: Ablehnungsgründe der Donor-Herzen (n= 80).

Prozentwerte sind gerundet.

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

3.2 Extraktion von Nukleinsäuren aus Myokardgewebe

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

3.2.1 Evaluation verschiedener DNA-Extraktionsmethoden

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

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

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

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

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

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

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

3.2.2 Evaluation verschiedener RNA-Extraktionsmethoden

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

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

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

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

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

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

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

^dDie Reinheit der isolierten RNA wurde mit der $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ -Ratio ermittelt. Werte unter 1,8 deuten auf Verunreinigungen mit Proteinen oder Phenol hin.

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

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

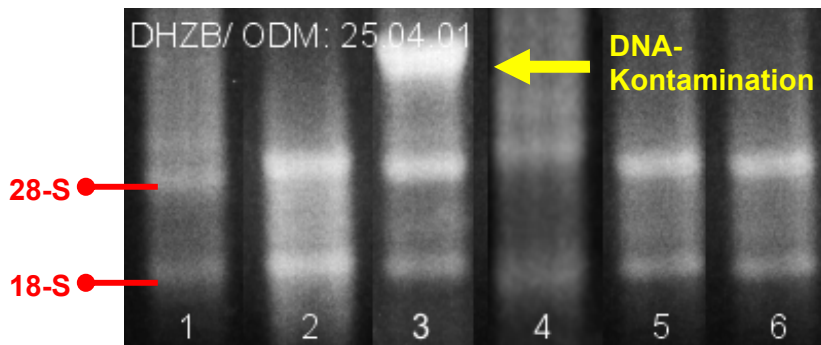


Abbildung 14: Gelelektrophoretische Darstellung von unterschiedlich präparierten RNA-Proben aus gefrorenem Herzmuskelgewebe. Die RNA-Präparationen (je 200 ng) wurden auf einem 1 %-igen, mit Ethidiumbromid gefärbten Agarosegel aufgetragen. Spur 1: 18-S-/28-S-rRNA-Marker (Sigma-Aldrich), Spur 2: GTC-Präparation,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

3.2.3 Daten zur Nukleinsäurepräparation aller untersuchten Gewebeproben

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

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

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

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

* Mittelwerte

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

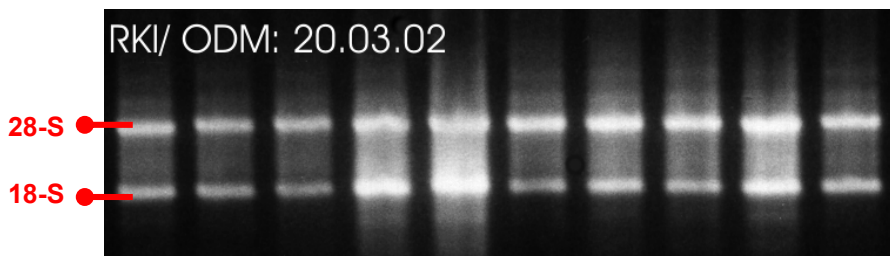


Abbildung 15: RNA aus unterschiedlichen Gewebeproben (Beispiele).

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

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

3.3 Nachweis viraler Nukleinsäuresequenzen in Myokard- und Herzklappengewebe

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

3.3.1 Nachweis viraler Nukleinsäuren in Myokardproben aus Standardpositionen

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

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

Tabelle 11:

Positive PCR-Ergebnisse der untersuchten Explantate und Myokardproben.*

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

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

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

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

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

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

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

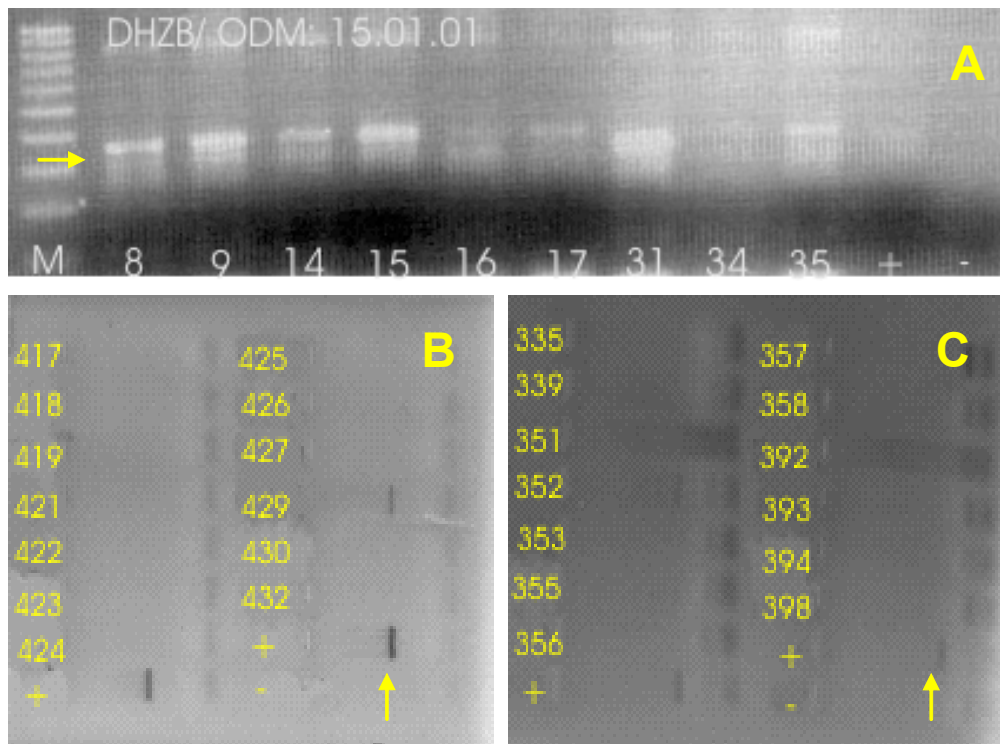


Abbildung 16: Nachweis von PCR-Produkten mittels Agarose-Gelelektrophorese.

Pfeil markiert jeweils die Höhe der positiven Banden:

A Enterovirus (Fragmentgröße 340 bp)*

B Adenovirus (Fragmentgröße 307 bp)**

C HCMV (Fragmentgröße 133 bp)**

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

3.3.2 Nachweis viraler Nukleinsäuren im Herzklappengewebe

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

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

Tabelle 12:

Positive PCR-Ergebnisse der Herzklappen-Gewebeproben.*

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

*Prozentwerte gerundet und bezogen auf die jeweiligen Probenzahlen.

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

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

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

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

3.3.3 Sequenzanalysen der EV-positiven Amplifikate

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

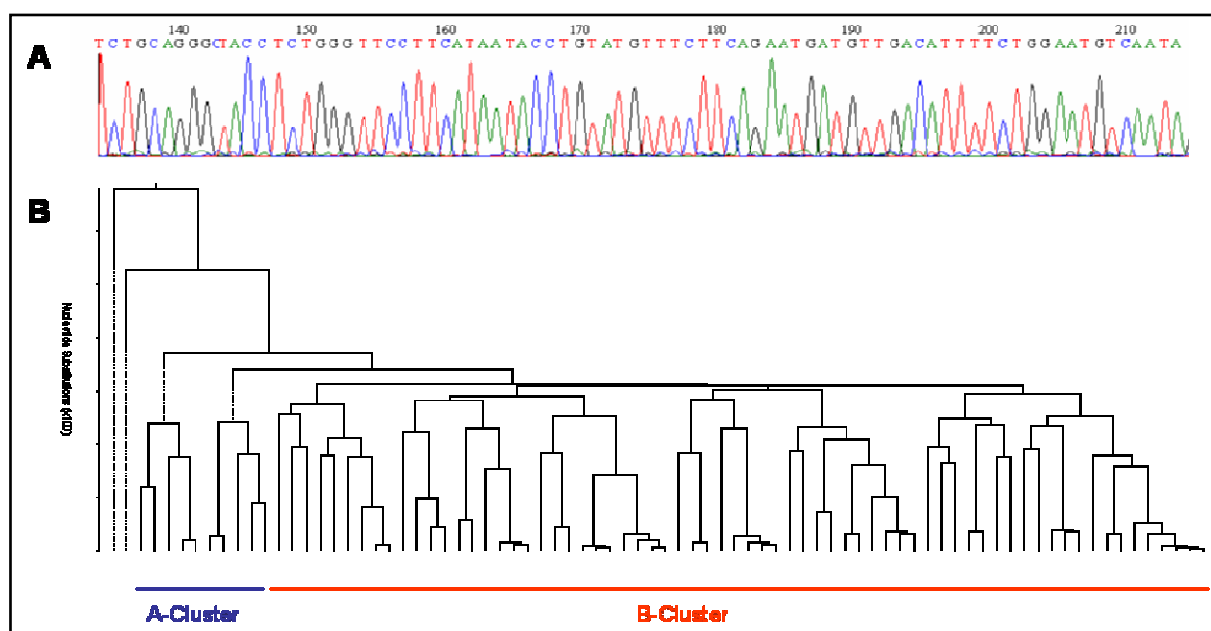


Abbildung 17: Sequenzanalysen der EV-spezifischen Amplifikate.

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

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

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

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

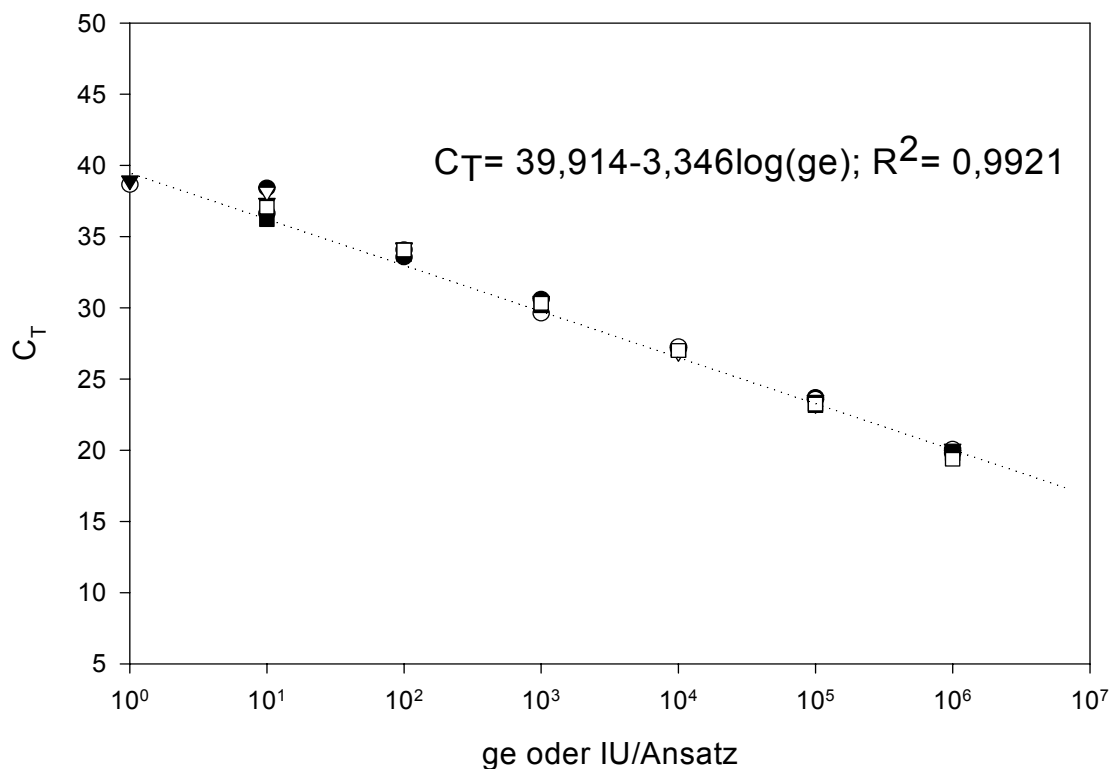


Abbildung 18: Standardkurve für die quantitative real-time PCR zum Nachweis von PVB19. Es wurden PCR-Läufe mit 10^0 bis 10^6 Plasmidkopien des Standardplasmids jeweils in 6-fach Bestimmungen ($\blacktriangle, \triangle, \blacksquare, \square, \bullet, \circ$) durchgeführt. Gezeigt wird der C_T -Wert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

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

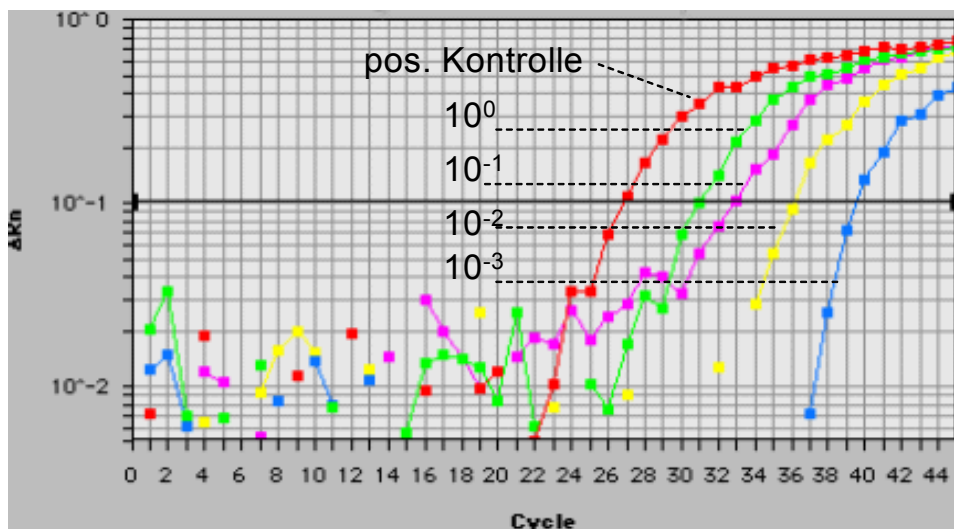
Tabelle 13: Intra-Assay-spezifischer und Inter-Assay-spezifischer Test für die quantitative real-time PCR zum Nachweis von PVB19.

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

* Mittelwert; Stabw= Standardabweichung.

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

A PVB19 Inhibitionstest



B PVB19 Spezifitätstest

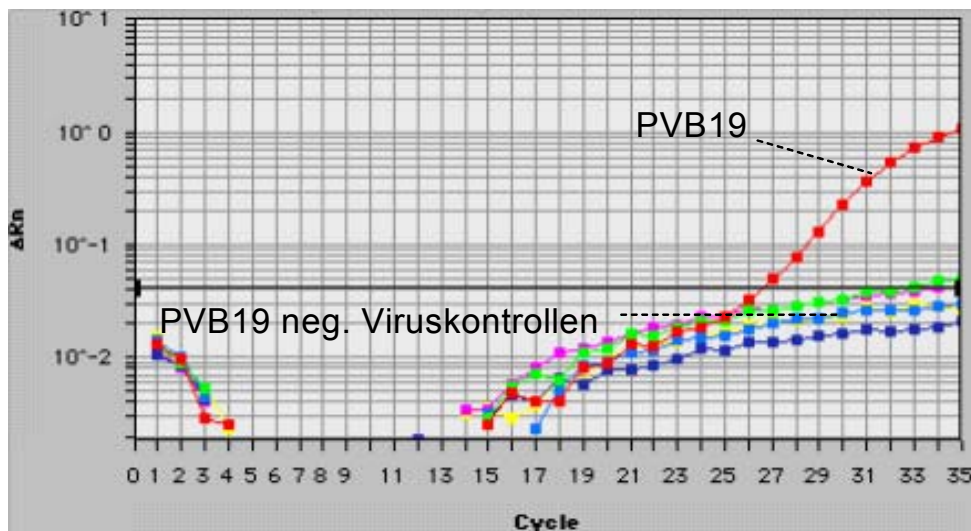


Abbildung 19: Tests zur Etablierung der quantitativen real-time PCR zum Nachweis von PVB19.

A Inhibitionstest:

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

B Spezifitätstest:

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

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

3.3.5 Ergebnisse der *In situ*-Hybridisierung

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

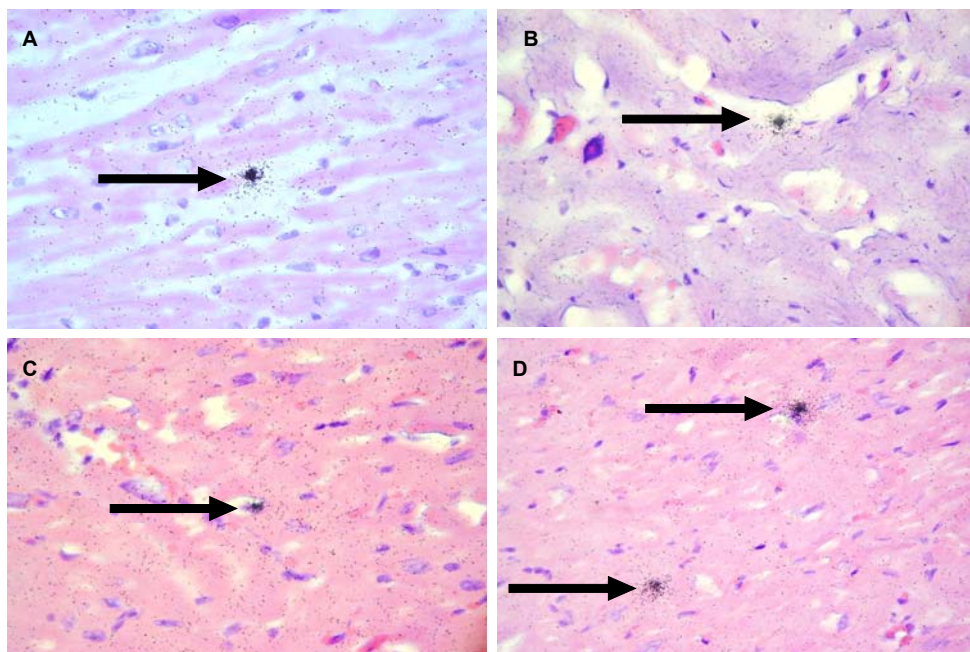


Abbildung 20: Nachweis von Nukleinsäuresequenzen kardiotroper Viren mittels ISH.

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

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

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

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

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

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

3.4.1 Serologische Befunde versus PCR

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

3.4.2 Histopathologische Befunde versus PCR

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

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

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

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

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

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

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

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

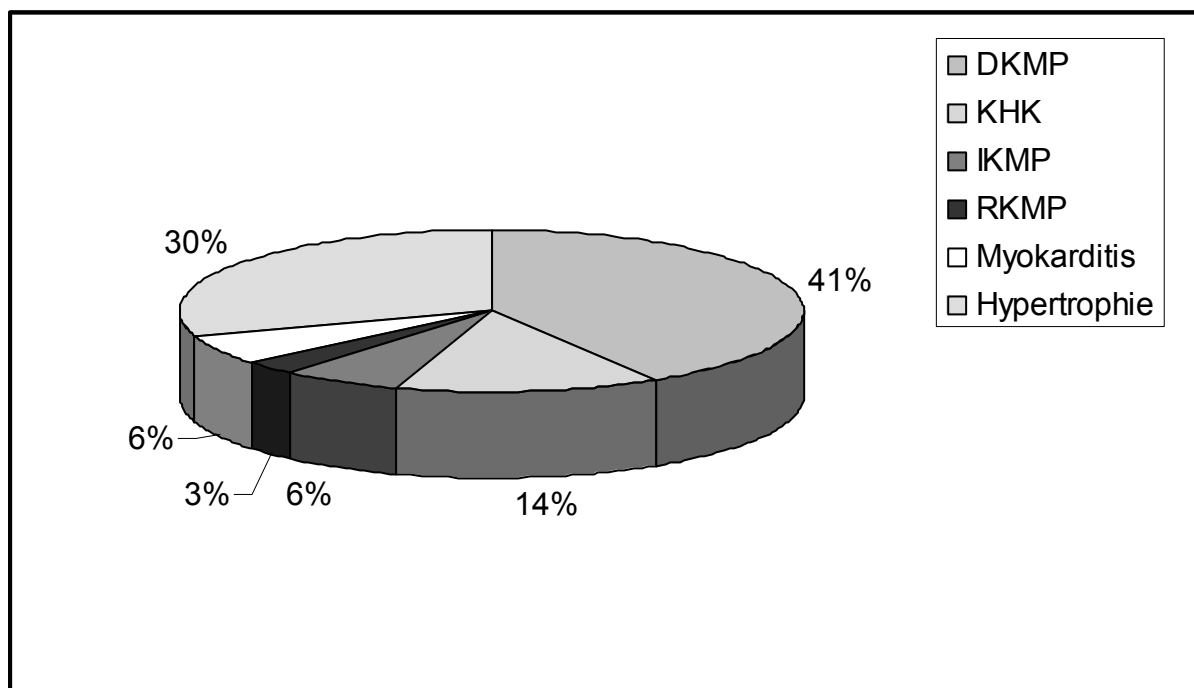


Abbildung 21: Histopathologische Befunde der HTx-Explantate (n= 66).

Prozentwerte sind gerundet.

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

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

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

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

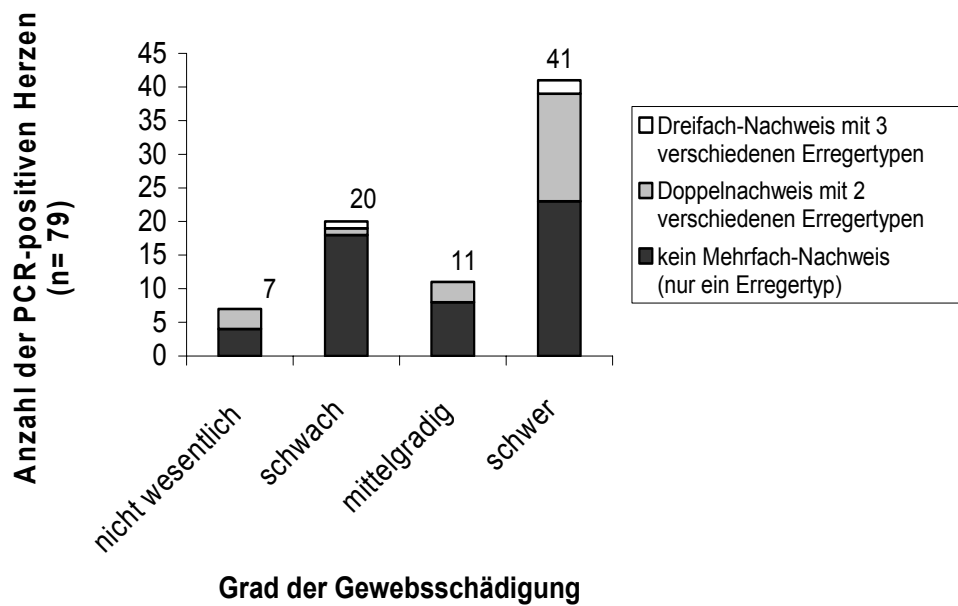


Abbildung 22: Darstellung der Beziehung zwischen der Anzahl der nachgewiesenen verschiedenen Erregertypen pro Explantat und dem Grad der Gewebsschädigung.

3.4.3 Anwendung der diagnostischen Methoden in Einzelfällen

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

Fall 1

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

Fall 2

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

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

Fall 3

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

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

3.5. Charakterisierung und Nachweis von Ljunganviren

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

3.5.1 Charakterisierung von Ljunganviren

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

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

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

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

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

* nähere Angaben zu den Zelllinien vergleiche Kap. 2.1.4.

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

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

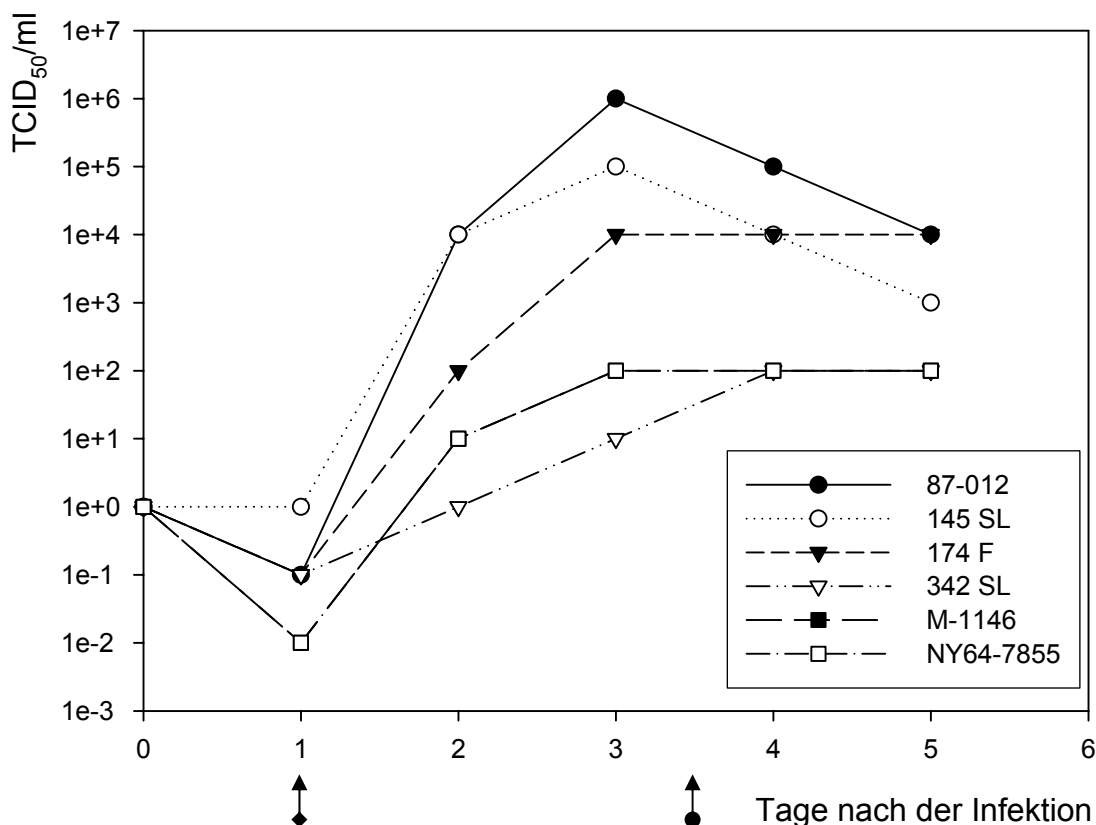


Abbildung 23: Infektionsverlauf unterschiedlicher LV-Stämme in Vero-B4-Zellen.

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

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

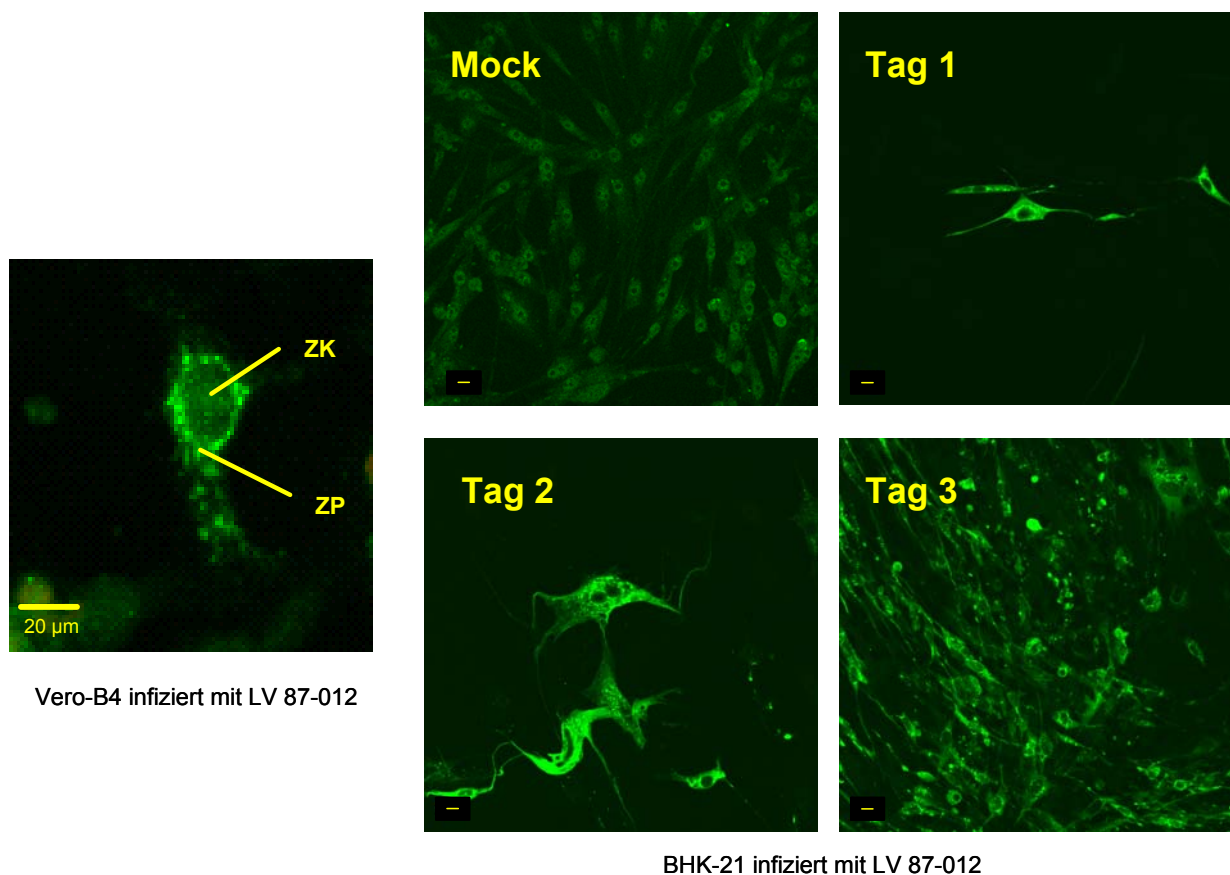


Abbildung 24: Immunzytochemischer Nachweis von LV in Vero-B4-Zellen.

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

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

Bilder: O. Donoso Mantke

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

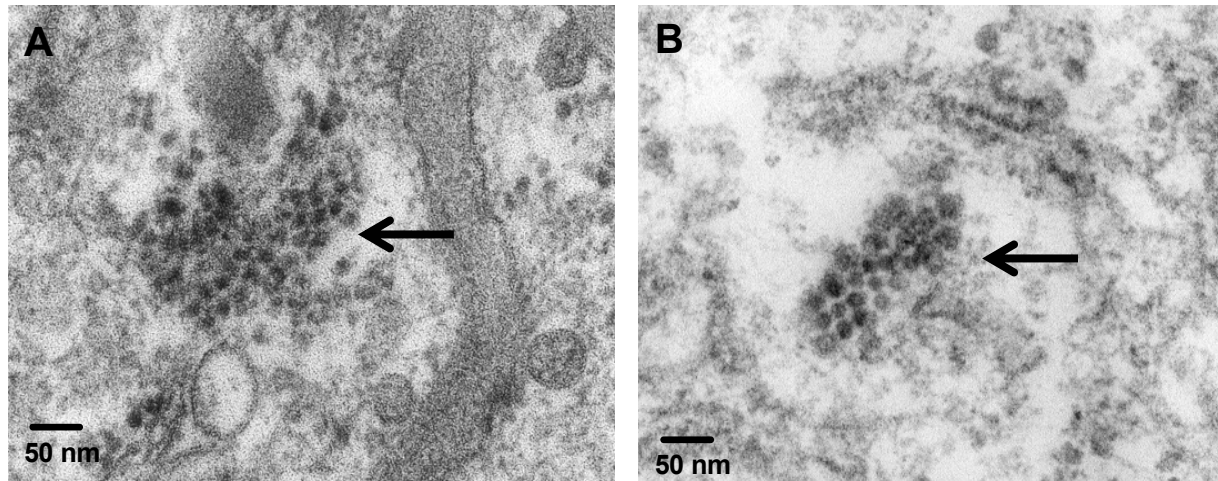


Abbildung 25: Elektronenmikroskopischer Nachweis von Ljunganviren (Pfeil).

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

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

Bilder: O. Donoso Mantke

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

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

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

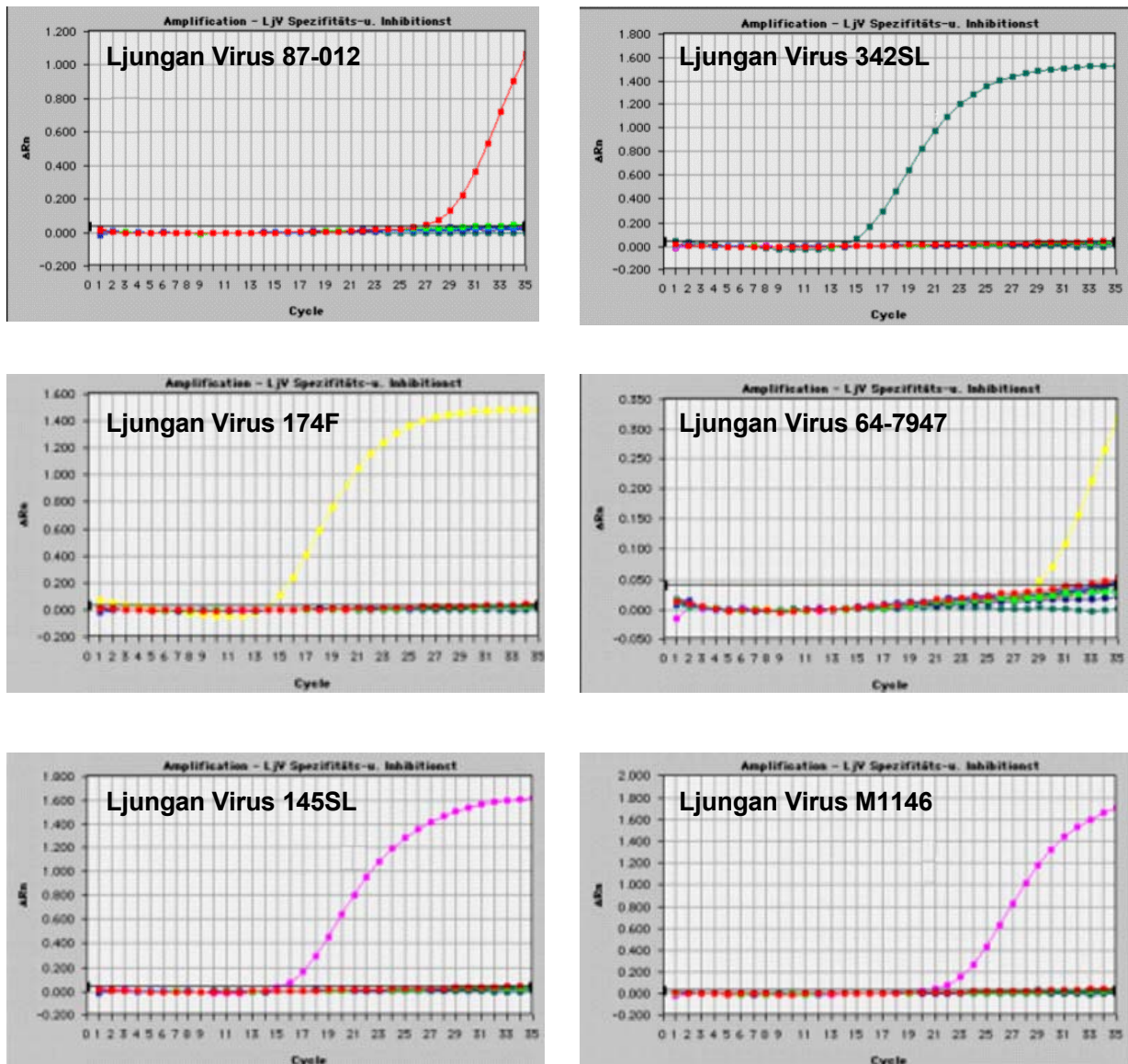


Abbildung 26: Spezifitätstests zur Etablierung der quantitativen real-time RT-PCR für LV. Die Methode wurde auf ihre Spezifität mit verschiedenen Viruskontrollen getestet. Je eine Positiv-Kontrolle: LV 87-012, LV 174F, LV 145SL, LV 342SL, M-1146 oder NY64-7947. Negativ-Kontrollen: EV (Echovirus 30, Stamm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

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

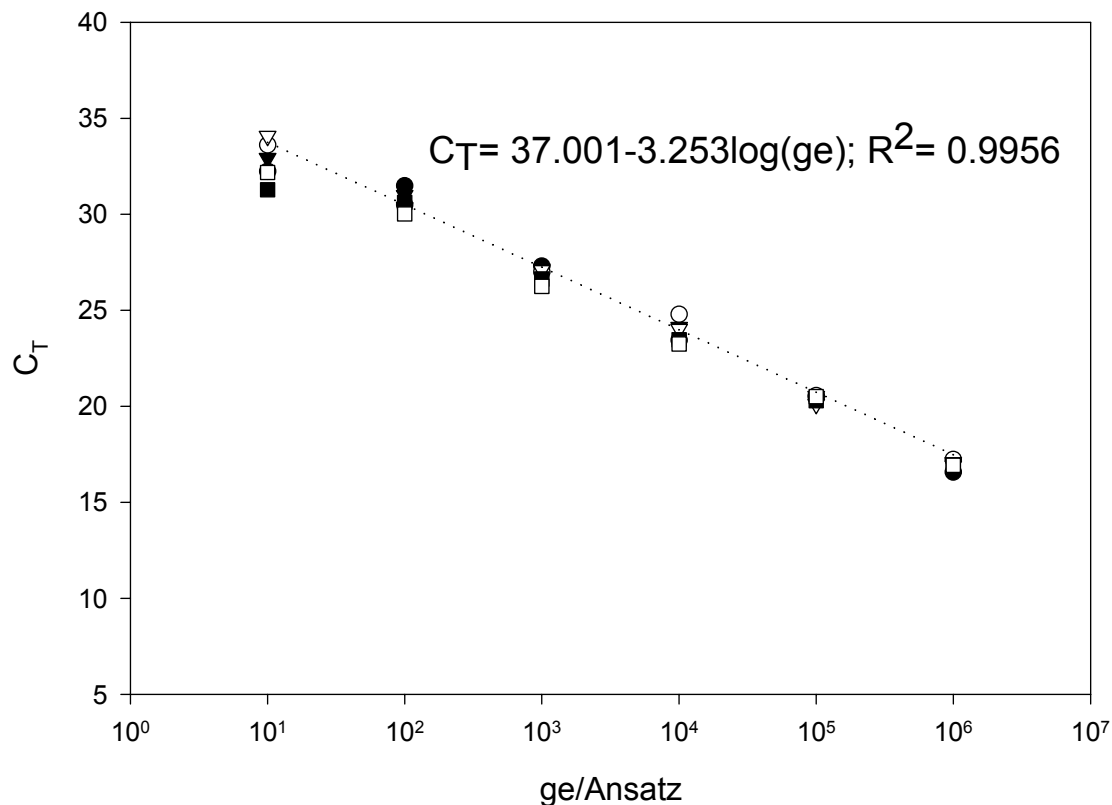


Abbildung 27: Standardkurve für die quantitative real-time RT-PCR zum Nachweis von LV. Es wurden PCR-Läufe mit 10^0 bis 10^6 Plasmidkopien des Insert-Plasmids jeweils in 6-fach Bestimmungen ($\blacktriangle, \triangle, \blacksquare, \square, \bullet, \circ$) durchgeführt. Gezeigt wird der C_T -Wert in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

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

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

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

* Mittelwert; Stabw= Standardabweichung.

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

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

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

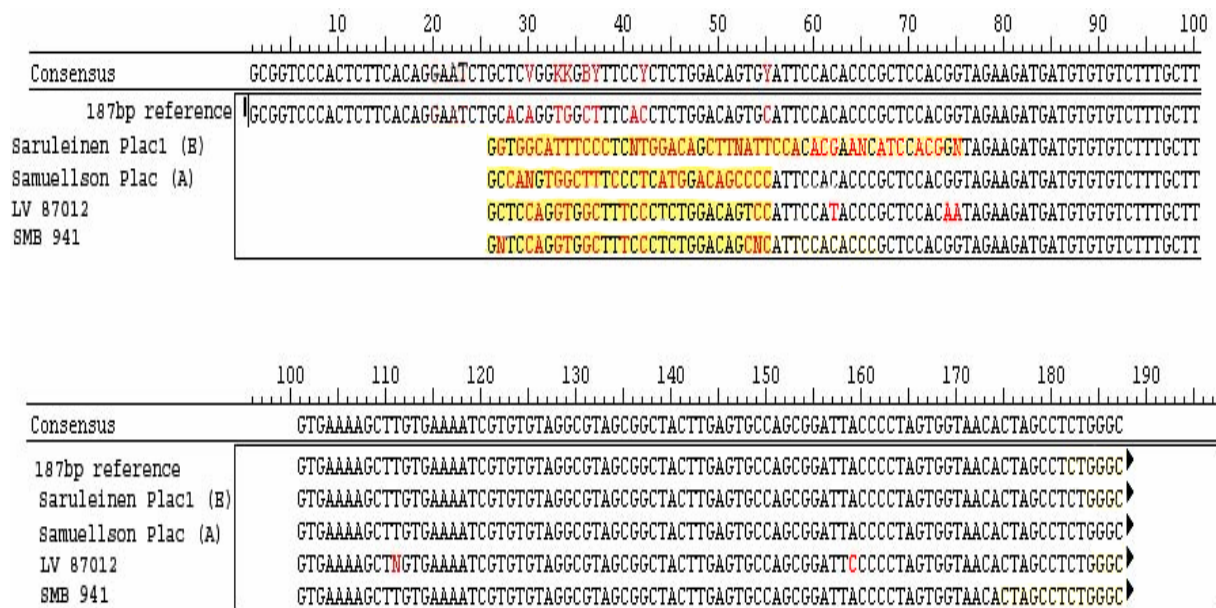


Abbildung 28: Sequenzalignment der LV-positiven Plazentaprobe (A und E) sowie des Schweineisolats (SMB 941) im Vergleich zu der Insert-Plasmid-Kontrolle und dem Prototyp LV 87-012. Rot gekennzeichnet sind Basenabweichungen von der Konsensussequenz. Gelb markiert sind fehlerhafte Sequenzfolgen bedingt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

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