

4. Diskussion

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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