

6. Anhang

6.1 Abkürzungsverzeichnis

Viren

| | |
|-------|--|
| ADV | Adenoviren |
| EV | Enteroviren |
| HCMV | <i>human cytomegalovirus</i> (humanes Zytomegalievirus, HHV-5) |
| LV | Ljunganvirus |
| PVB19 | Parvovirus B19 |

Sonstige Abkürzungen, Zeichen oder Einheiten

| | |
|---------|--|
| A | Adenin (eine der vier Basen der DNA) |
| Abb. | Abbildung |
| ad | bis zu |
| AG | Arbeitsgruppe |
| AMLA | anti-Myolemma-Antikörper |
| ANT | Adenin-Nukleotid-Translokator (Autoantigen in der Herzmuskelerkrankung) |
| aq | <i>aqua</i> (Wasser) |
| as | <i>antisense</i> |
| ASA | anti-Sarkolemma-Antikörper |
| bidest. | doppelt destilliert |
| bzw. | beziehungsweise |
| C | Cytosin (eine der vier Basen der DNA) |
| ca. | circa (zirka, ungefähr, etwa) |
| CAR | Coxsackie- und Adenovirusrezeptor |
| CD | <i>chain domain</i> (Oberflächenmolekül auf einer Reihe von Immuneffektorzellen) |
| cDNA | <i>complementary DNA</i> (komplementäre DNA) |
| CPE | <i>cytopathogenic effect</i> (zytopathischer Effekt) |
| CRP | C-reaktives-Protein (Entzündungsparameter) |
| CsCl | Cäsiumchlorid |
| DAF | Decay-accelerating-factor (CD55-Rezeptor auf Myozyten und Endothelzellen) |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat (wird benötigt, um Wasser RNase-frei zu machen) |
| dest. | destilliert |
| d.h. | das heißt |
| DHZB | Deutsches Herzzentrum Berlin |

| | |
|-------------------|---|
| DIfE | Deutsches Institut für Ernährungsforschung |
| DKMP | dilatative Kardiomyopathie |
| DNA | <i>desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure) |
| DNase | Desoxyribonuklease |
| dNTPs | 2'-Desoxynukleosid-5'-Triphosphate (umfasst dATP, dCTP, dGTP und dTTP) |
| dNUTPs | Desoxyribonukleotidtriphosphate (mit Uridintriphosphat statt Thymidintriphosphat) |
| DSO | Deutsche Stiftung Organspende |
| DTT | Dithiothreitol (ein Reduktionsmittel) |
| ELISA | <i>enzyme linked immunosorbent assay</i> (Enzym-gekoppelter Antikörpernachweis) |
| et al. | <i>et alteri</i> (und andere) |
| FAM (F) | 6-Carboxy-Fluoreszein (TM-Sondenfluoreszenzfarbstoff) |
| FISH | Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung |
| FITC | Fluoreszeinisothiocyanat (Fluoreszenzfarbstoff) |
| FKS | fötale Kälberserum |
| G | Guanin (eine der vier Basen der DNA) |
| GAPDH | Glyzeryl-3-Phosphat-Dehydrogenase (Referenzgen) |
| GTC | Guanidinisothiocyanat |
| HE | Hämatoxilin-Eosin (Schnitffärbung in der Lichtmikroskopie) |
| Hrsg. | Herausgeber |
| HTx | Herztransplantation |
| i.d.R. | in der Regel |
| IFN | Interferon (wichtige Zytokingruppe innerhalb der natürlichen Immunabwehr) |
| IFT | Immunofluoreszenztest |
| IgG | Immunglobulin G (Antikörper-Klassifizierung, Klasse G) |
| IgM | Immunglobulin M (Antikörper-Klassifizierung, Klasse M) |
| IKMP | ischämische Kardiomyopathie |
| ISH | <i>in situ</i> -Hybridisierung |
| IVIG | intravenöses Immunglobulin |
| Kap. | Kapitel |
| KHK | koronare Herzkrankheit |
| LVHW | Linker Ventrikel Hinterwand |
| LVVW | Linker Ventrikel Vorderwand |
| MGB | <i>minor groove binder</i> (organische Ringstruktur) |
| MgCl ₂ | Magnesiumchlorid |
| M-MLV-RT | Moloney-Maus-Leukämie-Virus Reverse Transkriptase |
| n | Anzahl |
| NCR | nicht-codierende Region eines Genoms |
| NRZ | Nationales Referenzzentrum |
| p | 3'-Phosphat |
| PA | Polyallomer |

| | |
|----------------|--|
| PBS | <i>phosphate buffered saline</i> (phosphatgepufferte Kochsalzlösung) |
| PCR | <i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion) |
| PP | Polypropylen |
| RKI | Robert Koch-Institut |
| RKMP | restriktive Kardiomyopathie |
| RNA | <i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure) |
| RNase | Ribonuklease |
| ROX | 6-Carboxy-X-Rhodamin (Referenzfarbstoff in der TaqMan [®] -PCR) |
| RPII | RNA-Polymerase II (Referenzgen) |
| rRNA | ribosomale RNA |
| RT | Raumtemperatur |
| RT-PCR | Reverse-Transkriptase-PCR |
| RV | Rechter Ventrikel |
| s | <i>sense</i> |
| SMB | <i>suckling mouse brain</i> (Jungmäusehirn-Kultur zur Virusanzucht) |
| sog. | so genannten |
| T | Thymin (eine der vier Basen der DNA) |
| Tab. | Tabelle |
| TAMRA (T) | 6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin (TM-Sondenfluoreszenzfarbstoff) |
| TAE | Tris-Acetat-EDTA (Elektrophoresepuffer) |
| TBE | Tris-Borat-EDTA (Elektrophoresepuffer) |
| T _m | <i>melting temperature</i> (Schmelztemperatur) |
| TM | TaqMan [®] -Sonde |
| TMB | Tetramethylbenzidin |
| Tris | Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan |
| U | Uracil |
| UDG | Uracil-DNA-Glykosylase |
| usw. | und so weiter |
| UV | Ultraviolett |
| UZF | Ultrazentrifugation |
| v/v | <i>volume/volume</i> (Volumen pro Volumen) |
| v/w | <i>volume/weight</i> (Volumen pro Gewicht) |
| w/v | <i>weight/volume</i> (Gewicht pro Volumen) |
| z.B. | zum Beispiel |
| ZBS | Zentrum für Biologische Sicherheit am RKI |
| % | Prozent |
| ® | registrierter Produktname |

| | |
|--------------------|--|
| bp | Basenpaare |
| °C | Grad Celsius |
| cm | Zentimeter |
| cm ³ | Kubikzentimeter |
| C _T | <i>threshold cycle</i> (Fluoreszenz-Schwellenwert) |
| g | Gramm |
| ge | <i>genome equivalent</i> (Genomäquivalent) |
| h | Stunde(n) |
| IU | <i>International Unit</i> (Mengenangabe für biologisch aktive Substanzen) |
| J. | Jahr(e) |
| kD | Kilodalton |
| kV | Kilovolt |
| L | Liter |
| M | Molar |
| mesh | Maschen pro Inch (Anzahl von Löchern in einem Grid) |
| mg | Milligramm (10 ⁻³ g) |
| µg | Mikrogramm (10 ⁻⁶ g) |
| ml | Milliliter (10 ⁻³ L) |
| µl | Mikroliter (10 ⁻⁶ L) |
| mM | Millimolar (10 ⁻³ M) |
| µM | Mikromolar (10 ⁻⁶ M) |
| mm | Millimeter (10 ⁻³ Meter) |
| µm | Mikrometer (10 ⁻⁶ Meter) |
| min | Minute(n) |
| MOI | <i>Multiplicity of Infection</i> (Angabe für ein Virusinokulum) |
| ng | Nanogramm (10 ⁻⁹ g) |
| nm | Nanometer (10 ⁻⁹ Meter) |
| nt | Nukleotide (Nukleotidzahl) |
| NYHA | Klassifikation der Herzinsuffizienz nach <u>N</u> ew <u>Y</u> ork <u>H</u> eart <u>A</u> ssociation (I-IV) |
| OD | <i>optical density</i> (optische Dichte/ Absorption) |
| P | Wahrscheinlichkeitswert (Index für statistische Signifikanz) |
| pg | Pikogramm (10 ⁻¹² g) |
| pH | <i>pondus hydrogenii</i> (Maß für den Säuregehalt) |
| pmol | Pikomol (10 ⁻¹² mol) |
| sec | Sekunden |
| TCID ₅₀ | <i>median Tissue Culture Infectious Dose</i> (Virustiterangabe) |
| U | <i>Unit</i> (Mengenangabe bei Enzymen) |
| UpM | Umdrehung pro Minute |
| V | Volt |

6.2 Abbildungsverzeichnis (Bildquellennachweis)

| | |
|--|-----|
| Abbildung 1: Schematische Darstellung des Herz-Lungen-Kreislaufes. (www.medicine-world-wide.de/krankheiten/herz_kreislauf_erkrankungen/allgemeines.html)..... | 4 |
| Abbildung 2: Schema der Unterteilung des Herzens. (www.medizinus.de/herz.php; weiter bearbeitet)..... | 5 |
| Abbildung 3: Plastinat der Herzkammern als Schnittmodell. (Institut für Plastination, Heidelberg; weiter bearbeitet)..... | 6 |
| Abbildung 4: Mögliche Mechanismen der viralen Herzmuskelerkrankung. (nach: P. Muir, Symposium „Viruses and cardiovascular disease“, IUMS-Paris 2002)..... | 16 |
| Abbildung 5: Homograft nach der Präparation. (Foto: M. Niedrig und O. Donoso Mantke, RKI, ZBS-1)..... | 32 |
| Abbildung 6: Die Rötelmaus <i>C. glareolus</i>. (Foto: B. Niklasson, Apodemus AB, Stockholm, Schweden)..... | 33 |
| Abbildung 7: Entnahme von Myokardproben im Homograftlabor. (Foto: M. Niedrig und O. Donoso Mantke, RKI, ZBS-1)..... | 50 |
| Abbildung 8: Fünf-Punkte-Standardkurven für das PicoGreen® dsDNA Quantitation Reagens (Molecular Probes)..... | 58 |
| Abbildung 9: Reaktionsprinzip der TaqMan®-PCR (modifiziert nach Lottspeich und Zorbas, 1998)..... | 62 |
| Abbildung 10: Exemplarische Darstellungen pathologischer Veränderungen, die zur Ablehnung eines Spenderorgans führen würden. (R. Meyer, Homograftbank, DHZB, Berlin)..... | 80 |
| Abbildung 11: Klinische Diagnosen der HTx-Patienten..... | 101 |
| Abbildung 12: Todesursachen der Herzspender..... | 102 |
| Abbildung 13: Ablehnungsgründe der Donor-Herzen..... | 102 |

| | |
|---|-----|
| Abbildung 14: Gelelektrophoretische Darstellung von unterschiedlich präparierten RNA-Proben aus gefrorenem Herzmuskelgewebe. (O. Donoso Mantke)..... | 106 |
| Abbildung 15: RNA aus unterschiedlichen Gewebeproben (Beispiele). (O. Donoso Mantke)..... | 107 |
| Abbildung 16: Nachweis von PCR-Produkten mittels Agarose-Gelelektrophorese. (Bild A: O. Donoso Mantke; Bild B und C: S. Prösch, Institut für Virologie, Charité, Berlin)..... | 110 |
| Abbildung 17: Sequenzanalysen der EV-spezifischen Amplifikate. | 112 |
| Abbildung 18: Standardkurve für die quantitative real-time PCR zum Nachweis von PVB19. | 113 |
| Abbildung 19: Tests zur Etablierung der quantitativen real-time PCR zum Nachweis von PVB19. | 115 |
| Abbildung 20: Nachweis von Nukleinsäuresequenzen kardiotoxischer Viren mittels ISH. (R. Kandolf und K. Klingel, Institut für Pathologie, Universität Tübingen)..... | 116 |
| Abbildung 21: Histopathologische Befunde der HTx-Explantate. | 119 |
| Abbildung 22: Darstellung der Beziehung zwischen der Anzahl der nachgewiesenen verschiedenen Erregertypen pro Explantat und dem Grad der Gewebsschädigung. | 121 |
| Abbildung 23: Infektionsverlauf unterschiedlicher LV-Stämme in Vero-B4-Zellen. | 124 |
| Abbildung 24: Immunzytochemischer Nachweis von LV in Vero-B4-Zellen. (O. Donoso Mantke)..... | 125 |
| Abbildung 25: Elektronenmikroskopischer Nachweis von Ljunganviren. (O. Donoso Mantke; mit freundlicher Genehmigung von Annals of the New York Academy of Sciences)..... | 126 |
| Abbildung 26: Spezifitätstest zur Etablierung der quantitativen real-time RT-PCR für LV. | 128 |
| Abbildung 27: Standardkurve für die quantitative real-time RT-PCR zum Nachweis von LV. | 129 |

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..... 132

6.3 Tabellenverzeichnis

| | |
|--|------------|
| Tabelle 1: Ursachen einer Myokarditis..... | 8 |
| Tabelle 2: Ursachen einer DKMP..... | 10 |
| Tabelle 3: Nachweis viraler Nukleinsäuren mittels PCR in verschiedenen Studien..... | 15 |
| Tabelle 4: An der Atherogenese beteiligte Erreger..... | 23 |
| Tabelle 5: Charakteristika der Primer und Sonden in den unterschiedlichen PCR-Ansätzen zum Virusnachweis..... | 65 |
| Tabelle 6: Daten zu den Patienten und Proben..... | 100 |
| Tabelle 7: Altersverteilung der HTx-Patienten und Herzspender..... | 101 |
| Tabelle 8: Vergleich der Parameter zur DNA-Isolierung von drei verschiedenen DNA-Extraktionsmethoden..... | 104 |
| Tabelle 9: Vergleich der Parameter zur RNA-Isolierung von sechs verschiedenen RNA-Extraktionsmethoden..... | 105 |
| Tabelle 10: Daten der Nukleinsäurepräparation aller untersuchten Gewebeproben..... | 107 |
| Tabelle 11: Positive PCR-Ergebnisse der untersuchten Explantate und Myokardproben..... | 109 |
| Tabelle 12: Positive PCR-Ergebnisse der Herzklappen-Gewebeproben..... | 111 |
| Tabelle 13: Intra-Assay-spezifischer und Inter-Assay-spezifischer Test für die quantitative real-time PCR zum Nachweis von PVB19..... | 114 |
| Tabelle 14: Vergleich zwischen den histopathologischen Befunden und den PCR-Ergebnissen..... | 118 |
| Tabelle 15: Überprüfung der Infektionseffizienz verschiedener LV-Isolate für unterschiedliche adhärente Zelllinien..... | 123 |

Tabelle 16: Intra-Assay-spezifischer und Inter-Assay-spezifischer Test für die quantitative real-time PCR zum Nachweis von LV..... 130