

Knochenmarktransplantation führt zu
fibrosierender cholestatischer Hepatitis im
Mausmodell der viralen Hepatitis B

Inaugural – Dissertation
zur
Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Vorgelegt
von
Johannes Stiefel
aus Neckargemünd (Baden-Württemberg)
Gießen 2014

Aus dem Zentrum für Innere Medizin
Medizinische Klinik II
Schwerpunkt Gastroenterologie
Leiterin: Prof. Dr. med. Elke Roeb
der Universitätsklinikum Gießen & Marburg GmbH

1. Gutachter: Frau Prof. Dr. med E. Roeb
2. Gutachter: Herr Prof. Dr. med J. Ziebuhr
Tag der Disputation: 05.02.2015

Teile der vorliegenden Arbeit wurden unter folgenden Titeln veröffentlicht:

ORIGINALARBEITEN:

„Pathological impact of hepatitis B virus surface proteins on the liver is associated with the host genetic background“

Churin Y, Roderfeld M, Stiefel J, Würger T, Schröder D, Matono T; Mollenkopf HJ; Montalbano R; Pompaiah M; Reifenberg K; Zahner D; Ocker M; Gerlich W; Glebe D; Roeb E (2014)
PLoS ONE 9(3): e90608. doi:10.1371/journal.pone.0090608

Abstracts/ Poster:

- 1. “CD20⁺ B cell infiltration in a mouse model for HBV-associated liver fibrosis depends on genetic background”**
Erstautor
66. Jahrestagung der DGVS, 14.09. - 16.09.2011 Leipzig
Abstract/Posterpräsentation: P351
Z Gastroenterol 2011; 49: 1007 – 1216, Georg Thieme Verlag KG Stuttgart
New York; S. 1155
- 2. „Knochenmarktransplantation in HBV-transgenen Mäusen aggraviert die hepatische Fibrose“**
Erstautor
28. Jahrestagung der GASL, 27.01. - 28.01.2012 Hamburg
Abstract/Posterpräsentation: P4.54
Z Gastroenterol 2012; 50: 73-163, Georg Thieme Verlag KG Stuttgart New
York; S.133
- 3. „Fibrose, Kanzerogenese, oxidativer Stress und Lipogenese in HBV transgenen Mäusen“**
Erstautor
21. Kongress der Mitteldeutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, 10.05. -
12.5.2012 Jena
Abstract/Posterpräsentation: P31
Der Gastroenterologe 2012; 7:85-196, Springer-Verlag; S.173
- 4. „Direkte zytotoxische Effekte des Hepatitis B Virus Oberflächenproteins in der Leber“**
Viertautor
29. Jahrestagung der GASL, 25.01. - 26.01.2013 Hannover
Abstract/Posterpräsentation: P5.07
Z Gastroenterol 2013, 51:1-167, Georg Thieme Verlag KG Stuttgart New York
- 5. “Fibrosing cholestatic hepatitis in HBV transgenic mice after bone marrow transplantation”**
Zweitautor, 24.01. - 25.01.2014 Tübingen,
30. Jahrestagung der GASL
Abstract/Posterpräsentation: P1.18
Z Gastroenterol 2014; 52:1-152, Georg Thieme Verlag KG Stuttgart New York

meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG	1
1.1	DIE LEBER.....	1
1.1.1	Anatomie und Physiologie.....	1
1.1.2	Leberfibrose.....	3
1.1.3	Leber-Stammzellen.....	7
1.2	DAS HEPATITIS B VIRUS	8
1.2.1	Partikel- und Genomaufbau	8
1.2.2	Replikationszyklus	9
1.2.3	Epidemiologie	11
1.2.4	Pathogenese	12
1.2.5	Diagnostik & Verlauf.....	13
1.2.5.1	Akute Hepatitis B.....	14
1.2.5.2	Chronische Hepatitis B	15
1.2.5.3	Fibrosierende cholestatische Hepatitis	17
1.2.6	Therapiemöglichkeiten.....	19
1.2.6.1	Pharmatherapie.....	19
1.2.6.2	Leber- und Knochenmarktransplantation	20
1.3	DAS HBV-TRANSGENE MAUSMODELL.....	21
1.4	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	23
2	MATERIAL UND METHODEN	25
2.1	MAUSLINIEN	25
2.1.1	Verwendete Mauslinien	25
2.1.2	Knochenmarktransplantation	26
2.1.3	Probenentnahme und Lagerung.....	27
2.2	KLINISCHE CHEMIE	27
2.3	HISTOLOGISCHE METHODEN	27
2.3.1	Einbettung in Paraffin.....	27
2.3.2	Immunhistochemie mit Paraffin.....	28
2.3.3	Sekundärantikörper Immunhistochemie	30
2.3.4	Isotypenkontrolle	30
2.3.5	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	31
2.3.6	Sirius-Rot-Färbung.....	31
2.3.7	Seneszenz-assoziiertes beta-Galaktosidase-Assay	32

2.4	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	33
2.4.1	RNA-Isolierung.....	33
2.4.2	RNA-Agarose-Gel.....	35
2.4.3	Transkription von mRNA in cDNA.....	37
2.4.4	q-PCR	38
2.4.5	Genotypisierung	42
2.4.5.1	Isolation der DNA	42
2.4.5.2	q-PCR mit Alb1-HBV-Primer	43
2.4.6	Microarray	44
2.4.7	Hydroxyprolin-Assay.....	46
2.5	STATISTISCHE AUSWERTUNG	48
3	ERGEBNISSE.....	49
3.1	KNOCHENMARKTRANSPLANTATION IN HBV-TRANSGENEN MÄUSEN.....	49
3.1.1	Hepatische Schädigung.....	49
3.1.2	Histologische Analyse.....	50
3.1.3	Schädigung der Gallengänge in transgen-transplantierten-Mäusen	53
3.1.4	Expression von HBV-Oberflächenproteinen.....	54
3.1.5	GFP-Nachweis.....	56
3.1.6	Entwicklung von Fibrose.....	57
3.1.7	Aktivierung von hepatischen Sternzellen	60
3.1.8	Expression von selektierten Genen.....	61
3.1.9	Gen-Expressions-Muster in Bezug auf Abcb4 ^{-/-} -Knockoutmäuse.....	63
3.1.10	Hochregulierte Gene - Vergleich mit Abcb4 ^{-/-}	64
3.1.11	Herunterregulierte Gene - Vergleich mit Abcb4 ^{-/-}	66
3.1.12	Entgegengesetzt regulierte Gene	67
3.1.13	q-PCR und Microarray-Befunde	68
3.2	KNOCHENMARKTRANSPLANTATION UND PORTAL BETONTE SENESZENZ	70
3.2.1	Seneszenz-assoziiertes beta-Galaktosidase-Assay	70
3.2.2	Die Expression der Seneszenz-Marker p21 und p27	72
3.3	KNOCHENMARKTRANSPLANTATION UND DUKTULÄRE REAKTION	74
3.3.1	CK7 und CK19	74
3.3.2	Sox9	75
3.3.3	A6.....	76
4	DISKUSSION.....	78

4.1	Charakterisierung der hepatischen Schädigung.....	78
4.2	Fibrogenese in cholestatischer Hepatitis	79
4.3	Fibrosierende cholestatische Hepatitis (FCH)	83
4.4	Limitationen des Mausmodells	85
4.5	Hypothesen zum Ablauf der hepatischen Schädigung.....	85
4.6	Limitationen der Studie	88
4.7	Ausblick	89
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	91
6	SUMMARY	93
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	95
8	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	98
9	TABELLENVERZEICHNIS	99
10	LITERATURVERZEICHNIS.....	100
11	ERKLÄRUNG	115

1 EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG

1.1 DIE LEBER

1.1.1 Anatomie und Physiologie

Die Leber ist das größte solide Organ des Menschen. Das Gewicht der Leber macht im Gesunden bis zu 3 % des Körpergewichts (ca. 1,3 bis 1,5 kg) eines erwachsenen Menschen aus. Die Leber ist das zentrale Organ des Stoffwechsels. Ihre vielfältigen Aufgaben umfassen dabei die Synthese wichtiger Proteine wie Albumin oder Gerinnungsfaktoren, die Verwertung und Speicherung von Nahrungsbestandteilen (z.B. lipidlösliche Vitamine, Glukose) und die Produktion von Gallensäuren. Auch die Biotransformation, d.h. die Entgiftung bzw. Überführung von körpereigenen (z.B. Steroidhormone, Gallenfarbstoffe) und körperfremden Stoffen (z.B. Medikamente, Alkohol) in eine ausscheidbare Form findet hier statt. Die Leber hat eine glatte, braune Oberfläche sowie eine intraperitoneale Lage. Die Blutversorgung erfolgt über die, durch die Porta hepatis verlaufende Arteria (A.) hepatica propria sowie über das nährstoffreiche Blut aus dem Zusammenfluss von Vena (V.) mesenterica superior und V. lienalis, der V. portae (Pfortader). Nach dem Verlauf der Pfortader kann die Leber in neun Segmente aufgeteilt werden (I- IX). Der venöse Abfluss erfolgt über die Zentralvenen, in die Venae hepaticae und schließlich in die V. cava inferior [2]. Die Leber setzt sich aus ca. 1 Million kleinen Baueinheiten, den Leberläppchen (Zentralvenenläppchen, siehe Abb. 1) zusammen. Wesentliche Elemente darin sind Leberepithelzellen (Hepatozyten), Anteile des Gallengangsystems, Bindegewebe sowie Gefäße. Am Rand der Leberläppchen befindet sich das Periportalfeld bzw. die portale Zone. Sie besteht aus Bindegewebe, A. und V. interlobularis, interlobulärem Gallengang sowie einem Lymphgefäß. Neben den Hepatozyten als Parenchymzellen besteht Lebergewebe noch aus nicht-parenchymatösen Zellen wie Endothelzellen, Kupffer-Zellen, hepatischen Sternzellen (engl. *Hepatic stellate cell*, HSC = Ito-Zellen) und Pit-Zellen (große granuläre Lymphozyten [3]). Das intrahepatische Gallengangsystem beginnt mit den Canaliculi biliferi. Diese stellen Spalträume, gebildet durch den Raum zwischen den Hepatozyten, dar. Die Gallenflüssigkeit wird von Hepatozyten und Cholangiozyten gebildet und fließt vom Zentrum des Leberläppchens in Richtung portale Zone, wo sie in die Hering-Kanälchen gelangt. Erst in der Peripherie des Leberläppchens kleiden Cholangiozyten (Gallengangepithelzellen) die Wand der Gallengänge aus.

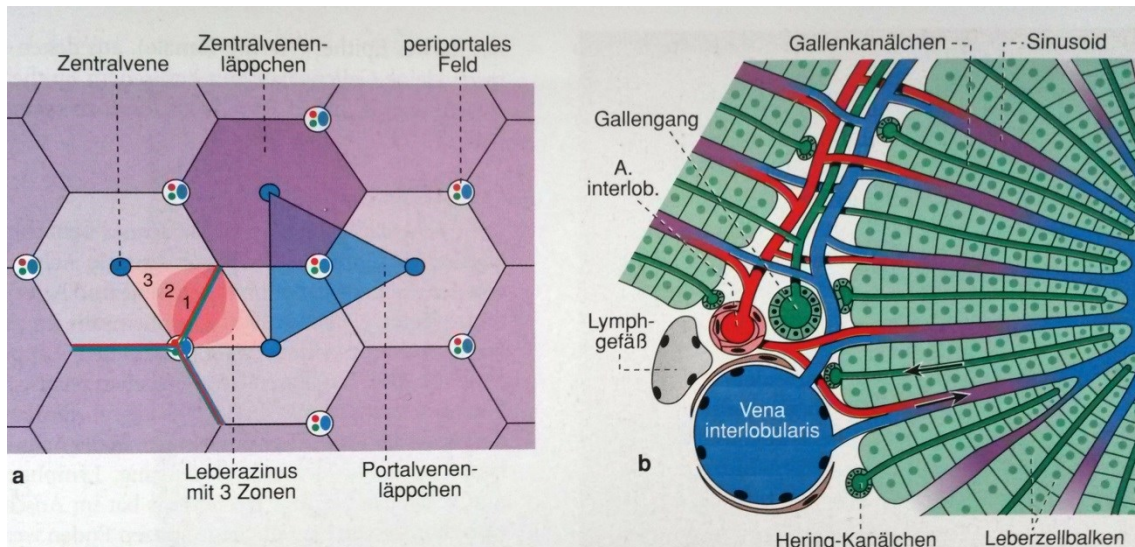


Abb. 1. a) Gliederung der Leber in verschiedene Baueinheiten. Im Mittelpunkt des Zentralvenenläppchens befindet sich die Zentralvene. An den Kanten liegen z.T. periportale Felder. Ein Leberazinus bildet sich durch Zweige der Blutgefäße des periportalen Felds. Die Sauerstoffversorgung nimmt von Zone 1 zu Zone 3 (Zentralvene) ab. **b) Mikroskopische Anatomie eines Periportalfelds.** Dieser Bereich enthält die sog. Glisson-Trias, welche aus A.- und V. Interlobularis sowie einem interlobulären Gallengang besteht. Zusätzlich findet sich hier noch ein Lymphgefäß. A.- und V. Interlobularis bilden einen mit Mischblut gefüllten Sinusoid der zur Zentralvene verläuft. Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Elsevier GmbH modifiziert nach [4].

Die Blutversorgung der Läppchen erfolgt vom Portalfeld von A. und V. interlobularis aus. Die beiden Gefäße verschmelzen schon früh zu einem mit Mischblut gefüllten Sinusoid (siehe Abb. 2), dessen Wand aus fenestrierten Endothelzellen sowie Kupferzellen gebildet wird. Die Endothelzellen haben eine wichtige endozytische Funktion. Kupferzellen stellen eine Population gewebespezifischer Makrophagen dar und sind an der zellulären Immunabwehr beteiligt [5]. Von den Sinusoiden aus fließt das Blut in Richtung des Zentrums des Leberläppchens, um dort in die Zentralvene zu münden. Die Sauerstoffversorgung des Gewebes wird von der Peripherie zum Zentrum des Läppchens schlechter.

EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG

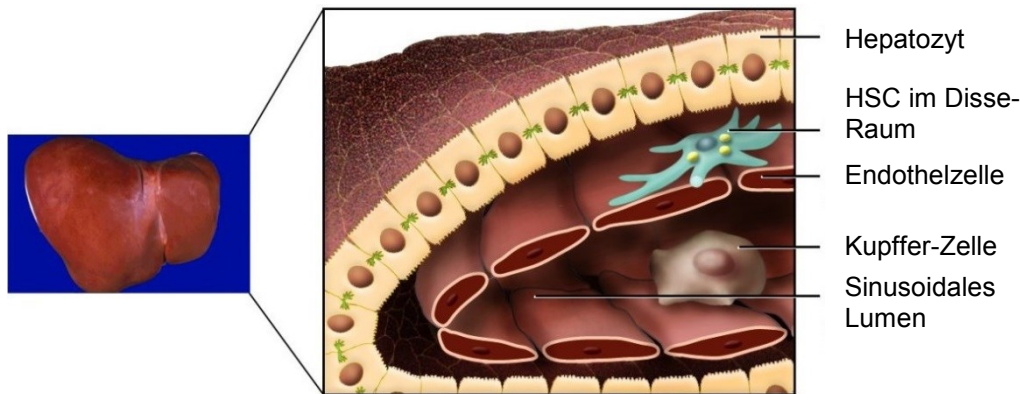


Abb. 2. Übersicht und Feinbau der gesunden Leber. Die gesunde Leber besitzt eine glatte Oberfläche und bräunliche Farbe. Reihen von Hepatozyten bilden Leberbalken mit Galle- und Blutpol, an letzteren schließt sich der für den Stoffaustausch wichtige Disse-Raum an. Dort befinden sich auch die hepatischen Sternzellen (HSC), eine der Haupteffektor-Zellen der Leber-Fibrogenese. Im sinusoidalen Lumen, begrenzt von fenestriertem Endothel sowie den gewebe-spezifischen Makrophagen (Kupffer-Zellen), fließt arteriovenöses Mischblut. Schematische Darstellung modifiziert nach [6].

Zwischen Leberbalken (gebildet aus einer Reihe Hepatozyten) und Sinusoid befindet sich der bindegewebige (Kollagen Typ III), vor allem dem Stoffaustausch dienende Disse-Raum [4]. Der Austausch von Metaboliten findet mittels des Durchtritts des Blutplasmas durch das fenestrierte Endothel der Sinusoide und dem Durchqueren des Disse-Raums statt. Aufnahme und Abgabe der Stoffwechselprodukte erfolgt über den mit Mikrovilli-versehene Blutpol der Hepatozyten. Im Disse-Raum befinden sich die HSCs. Diese Zelle speichert Vitamin A, kann aber bei Verletzung der Leber in einen Myofibroblasten (MF) transdifferenzieren. HSCs gelten als der Hauptproduzent von extrazellulärer Matrix (ECM) für Narbengewebe in der hepatischen Fibrogenese [7].

1.1.2 Leberfibrose

Die Entwicklung einer Leberfibrose bzw. -zirrhose stellt die gemeinsame Endstrecke, vieler die Leber kontinuierlich verletzender Prozesse dar. Eine viral bedingte Hepatitis, Alkoholabusus, metabolische Krankheiten, Autoimmun-Erkrankungen sowie cholestatische bzw. biliäre Pathologien können die Ursache einer hepatischen Fibrose sein [8]. Alkohol-Konsum, virale Hepatitiden sowie das metabolische Syndrom zählen zu den häufigsten Ursachen einer Leberzirrhose und eines Hepatozellulären Karzinoms (engl. *hepatocellular carcinoma*, HCC). An den Folgen einer Leberzirrhose sterben jedes Jahr ca. 170.000 Menschen in Europa [9]. Die hepatische Fibrose ist gekennzeichnet durch die reversible Ablagerung und Akkumulation von ECM sowie dem Auftreten einer ent-

zündlichen Reaktion nach Verletzung der Leber. Falls die Verletzung akut und selbst-limitierend ist, sind die Veränderungen der Leberarchitektur nur vorübergehend. Eine Leberzirrhose oder ein HCC hingegen, stellen das nicht-reversible Endstadium einer hepatischen Fibrose dar [10]. Im Falle einer anhaltenden Schädigung, manifestiert durch den Verlust von Hepatozyten, kann sich die Regenerationsfähigkeit des Organs erschöpfen. Hepatozyten werden dann nach und nach durch ECM ersetzt [6]. Wichtig in diesem Zusammenhang sind die im Disse-Raum befindlichen HSCs (siehe Abb. 2). Dieser Zelltyp trägt, wenn aktiviert, mit der Produktion von ECM wie z.B. des Fibrillenbildenden Kollagens Typ I, maßgeblich zur hepatischen Fibrogenese bei [7]. Menge und Zusammensetzung der ECM im Gewebe sind nicht statisch, sondern vielmehr dem Einfluss verschiedener Enzymgruppen unterworfen.

Matrix-Metalloproteasen (MMP) sind eine Gruppe von Enzymen die wichtig für den Ab- und Umbau von ECM bei Embryogenese, Wundheilung, Tumorwachstum sowie Fibrogenese sind. Sie katalysieren die hydrolytische Spaltung von Peptidbindungen in Proteinen und können so mittels des Abbaus z.B. von Kollagen Typ I antifibrotisch wirken [11]. MMPs werden ihrerseits von spezifischen *tissue inhibitors of metalloproteinases* (TIMP) gehemmt [12].

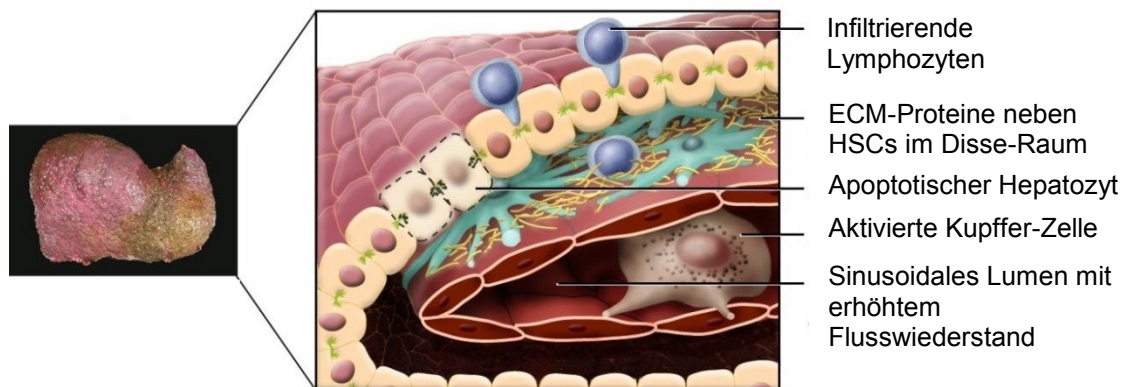


Abb. 3. Übersicht und Feinbau der zirrhotischen Leber. Makroskopisch weist die zirrhotische Leber eine wellige Oberfläche und knotige Schrumpfung auf. Durch eine chronische Schädigung kommt es zu einer entzündlichen Lymphozyten-Infiltration, Apoptose von Hepatozyten, Aktivierung von Kupfer-Zellen und HSCs sowie konsekutiver Ablagerung von ECM im Disse-Raum. Der Blutfluss durch die zirrhotische Leber wird dadurch erschwert, mit der Folge einer portalen Hypertension. Schematische Darstellung modifiziert nach [6].

Während der Fibrogenese kommt es in der Leber zu einem komplexen, dynamischen Zusammenspiel diverser Zellen und Zytokine. Bei Beschädigung treten Hepatozyten normalerweise in die Apoptose ein. Wenn jedoch das Ausmaß der Verletzung zu groß wird platzen sie und hinterlassen Zelltrümmer. Diese Zellreste können eine Entzündung entfachen [13]. Eine Studie konnte demonstrieren, dass apoptotische Hepatozy-

ten Chemokine aussenden (z.B. aus der CXC-Familie: *macrophage inflammatory protein-2* und *Keratinocyte chemoattractant*), die zur Invasion von neutrophilen Granulozyten in die Leber führen [14]. Parakrine Stimulation durch verletzte Parenchym- oder Kupfer-Zellen, induziert zudem in den HSCs einen Wechsel der Genexpression sowie damit einhergehend eine hohe proliferative Aktivität sowie einen veränderten Phänotyp [15]. Aktivierte HSCs bzw. MFs weisen kontraktile Aktivität sowie eine spindelzellartige Morphologie auf, zudem können sie die mesenchymalen zellulären Marker *alpha smooth muscle Actin* (α SMA) und Desmin exprimieren [16, 17]. HSCs stellen die wichtigste, vermutlich jedoch nicht die einzige Quelle für MF dar (siehe Abb. 4). In einer Arbeit aus unserer Arbeitsgruppe wurde in einem Mausmodell der primär sklerosierenden Cholangitis eine Beteiligung von aus dem Knochenmark (KM) eingewanderten, für den hämatopoetischen Marker CD34-positiven Fibroblasten beschrieben [18]. Dies reiht sich mit den in Menschen gemachten Erkenntnissen über eine signifikante Beteiligung von KM-MF in der hepatischen Fibrose ein [19]. In einer neueren Studie hingegen wurde ein vernachlässigbarer Beitrag zur Kollagen-Ablagerung der KM-MF postuliert [20].

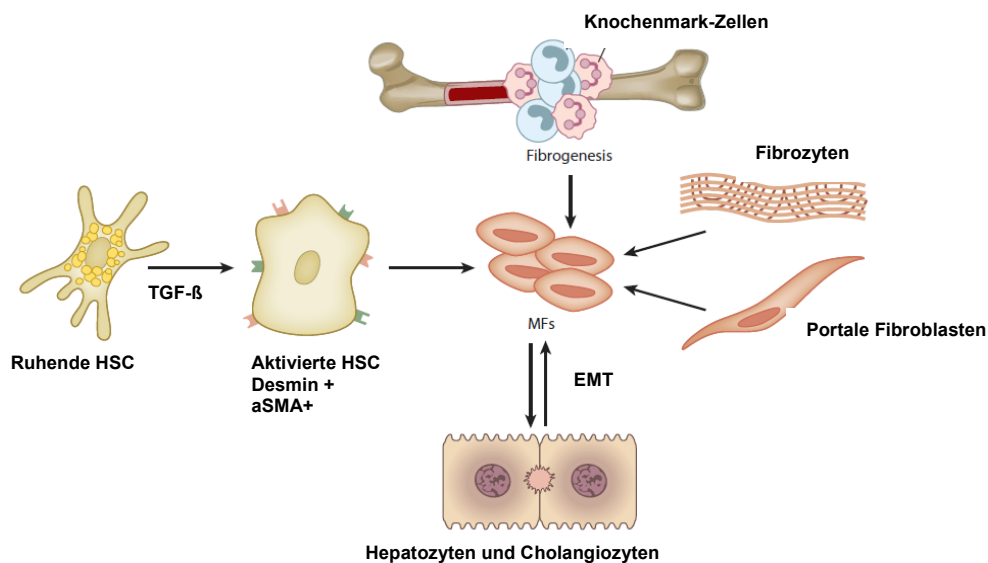


Abb. 4. Mögliche Zell-Populationen der Produktion von ECM. Bei Parenchymverletzung werden HSCs u.a. durch TGF- β aktiviert und transdifferenzieren zu Myofibroblasten (MF) welche Desmin positiv sowie α SMA positiv sein können. MF synthetisieren ECM. Theoretisch könnten Hepatozyten und Cholangiozyten via epithelialer mesenchymaler Transition (EMT) zu MF differenzieren. Stammzellen aus dem KM können in die Blutzirkulation eintreten und in die Leber wandern um dort ebenfalls zu MF zu differenzieren. Ebenso können z.B. in der biliären Fibrose, portale Fibroblasten proliferieren und zu MF werden. Modifiziert nach [15].

Ein anderer möglicherweise beteiligter Zelltyp sind portale Fibroblasten. Wegen ihrer Lage nahe den Gallengängen, scheinen sie besonders bei der biliären Fibrose von Bedeutung zu sein [21]. Als sogenannte epitheliale mesenchymale Transition (EMT) bezeichnet man allgemein den Übergang von Epithelzellen in Zellen mit mesenchymalen Eigenschaften. Dieser Effekt wurde z.B. bei der Fibrogenese in der Niere beobachtet [22]. Übertragen auf die Leber könnte dies bedeuten, dass epitheliale Zellen wie Hepatozyten oder Cholangiozyten durch solch eine Transition beginnen mesenchymale Merkmale eines MF zu zeigen. Theoretisch wäre so eine Produktion von ECM möglich [23]. Die Daten hierzu sind allerdings sehr widersprüchlich. Eine frühere Studie konnte eine EMT-Induktion in Hepatozyten durch *transforming growth factor beta* (TGF- β) demonstrieren [24]. Neuere Studien konnten jedoch keine Beteiligung dieses Mechanismus an der hepatischen Fibrogenese nachweisen [25, 26].

Die hepatische Fibrogenese wird über Zytokine gesteuert, die bei Verletzung des Parenchyms ausgeschüttet werden [27]. Von zentraler Bedeutung hierbei ist TGF- β , es hat sowohl profibrogene als auch antiinflammatorische Eigenschaften [28]. Eine Verletzung des Leberparenchyms führt in HSCs, Fibroblasten bzw. MF sowie Makrophagen und Granulozyten zur TGF- β -Produktion, wobei dies Hepatozyten und Cholangiozyten nicht möglich ist [29]. Mit dem Absondern von TGF- β durch die Zellen, kommt es zur Aktivierung und Proliferation von HSCs und damit zur Produktion von ECM in MF [30]. TGF- β verursacht zusätzlich noch eine Hochregulation von Inhibitoren des ECM-Abbaus (z.B. TIMP-1), was wiederum profibrogenetisch wirkt [31]. Interleukin 10 (IL 10), ein wichtiges anti-entzündliches Zytokin [32], scheint den gegenteiligen Effekt von TGF- β zu bewirken: in einer experimentellen Untersuchung an Ratten sank die Expression von MMP-2, TIMP-1 sowie TGF- β nach IL-10 Administration [33].

Interessanterweise spielen auch vasoaktive Systeme wie das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) in der Regulation der Leberfibrose eine Rolle. Das RAAS scheint dabei profibrotisch zu agieren [34]. Besonders Angiotensinogen, eine wichtige Vorläuferverbindung im RAAS, ist für die hepatische Fibrose von Belang. In einer frühen Phase der Fibrose wird es von MF gebildet und scheint dabei positiv auf die Proliferation dieser ECM-produzierenden Zellen zu wirken sowie eine TGF- β -Produktion zu induzieren [35]. Daher untersuchten mehrere Studien eine Verwendung von Inhibitoren des RAAS, wie z.B. *Angiotensin receptor blockers* (ARBs) und *Angiotensin-converting-Enzyme*(ACE)-Hemmer, im Hinblick auf einen therapeutischen Nutzen. Bislang kann jedoch keine eindeutige Aussage über den antifibrotischen Erfolg solcher Therapien getroffen werden [34].

1.1.3 Leber-Stammzellen

Die Regenerationsfähigkeit der Leber ist, wie man schon 1931 in einem Versuch der partiellen Hepatektomie zeigen konnte, außerordentlich [36]. Sie kann grundsätzlich von verschiedenen in der Leber heimischen Zelltypen ausgehen. Unter physiologischen Bedingungen erfolgt der Ersatz des zerstörten Gewebes durch eine Teilung der Hepatozyten [37]. Wenn allerdings eine fortdauernde Schädigung besteht, wie es bei einer chronisch viralen Hepatitis der Fall ist, funktioniert dieses System nicht mehr. Solch eine Konstellation führt in Nagetieren zur Aktivierung von sogenannten Ovalzellen [38]. Diese lebereigenen Progenitorzellen besitzen die Fähigkeit sich in zwei verschiedene Zelltypen zu differenzieren, sind also bipotential: Cholangiozyten und Hepatozyten [39]. Ovalzellen proliferieren bei einer Leberschädigung periportal und wachsen ins Parenchym vor. Ovalzellen sind kleine, ovale Zellen mit leicht basophilem Zytoplasma [40]. Sie exprimieren an ihrer Oberfläche unterschiedliche Merkmale: Cholangiozytenmarker wie Zytokeratin-7 und 19, OV6, A6 sowie Marker für fetale Stammzellen wie AFP, GGT und hämatopoetische Marker wie CD34 und c-Kit [41]. Eine weitere Möglichkeit der Regeneration besteht in der Rekrutierung von sog. *small hepatocyte-like progenitor cells* (SHPC). Diese Zellen ähneln phänotypisch den Hepatozyten, fetalen Hepatoblasten und Ovalzellen [42]. Eingewanderte hämatopoetische Stammzellen aus dem KM stellen den dritten zur Leberregeneration befähigten Zelltyp dar. Hämatopoetische Stammzellen können in der Leber zu Ovalzellen differenzieren [43].

Die zuvor erwähnten Erkenntnisse wurden in Nagetiermodellen gemacht. In Menschen wurde über Ovalzellen im Zusammenhang mit einer Alkohol-induzierten duktulären Reaktion [44], Hepatitis B-assoziiertem HCC [45], der erblichen Hämochromatose, der alkoholischen Lebererkrankung sowie chronischer Hepatitis C berichtet [46].

1.2 DAS HEPATITIS B VIRUS

1.2.1 Partikel- und Genomaufbau

Der Hepatitis B Virus (HBV) ist ein Hepadnavirus, zugehörig zur Familie der Orthohepadnaviren [2]. 1966 konnte durch Blumberg et al. [47] erstmals ein Teil des HBV, das sog. Australien-Antigen nachgewiesen werden. Dieses Antigen konnte später als Hepatitis B *surface antigen* (HBsAg) identifiziert werden. HBV wird allerdings oft nach seinem späteren Entdecker (1970) als Dane-Partikel bezeichnet [48]. HBV hat einen Durchmesser von 42 nm und besteht aus einer Hülle und einem Nukleokapsid. Die Virushülle bildet sich aus einer vom Wirt stammenden Lipiddoppelmembran sowie darin eingelagertem HBsAg, welches sich aus drei Proteinen zusammensetzt: *large* (LHB), *medium* (MHB) und *small* Hepatitis B *surface* (SHB) Protein [49]. Die Proteine sind unterschiedlich lang, besitzen aber alle denselben stark hydrophilen C-Terminus. Das Nukleokapsid hat einen Durchmesser von 27 nm, ist ikosaedrisch geformt und aus 180 bzw. 240 Untereinheiten des *core antigens* (HbcAg) zusammengebaut (siehe Abb. 5).

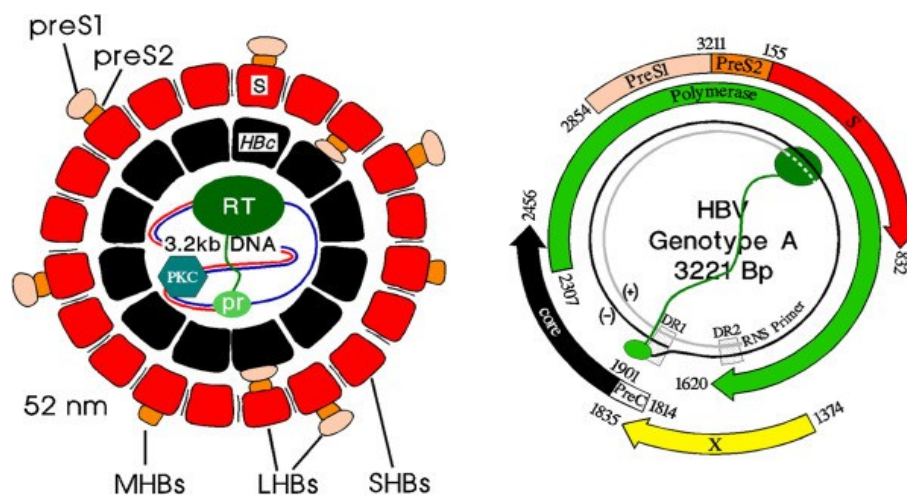


Abb. 5. Struktur (links) und Genom (rechts) von HBV. Die Hüllmembran von HBV weist eine Lipiddoppelschicht und verschiedene HBsAg-Subtypen (LHB, MHB, SHB) auf. Das Nukleokapsid besteht aus HbcAg sowie darin enthaltener partiell doppelsträngiger DNA. Farbige Pfeile (rechts) stehen für die sich überlappenden *open reading frames* (C, P, S, X). Modifiziert nach [50].

Das Virusgenom besteht je nach Subtyp aus ca. 3200 Basenpaaren einer partiell doppelsträngigen DNA. Es befindet sich im Inneren des Nukleokapsids. Dort finden sich auch, über ein terminales Protein kovalent an den negativen DNA-Strang befestigt, die viralen Polymerasen. Es gibt acht verschiedene HBV-Genotypen (A bis H). Jeder Genotyp hat eine bestimmte geographische Verteilung: Typ A kommt ubiquitär, aber vor

allem in Europa und Nordamerika vor. Typ B und C kommt besonders in Japan, Taiwan, Indonesien und Vietnam vor. In der Mittelmeerregion, Indien, und Amerika findet sich Typ D. Genotyp E ist in Westafrika verbreitet, F und H in Zentral- und Südamerika, G in den Vereinigten Staaten und Europa [51].

Das Genom enthält vier, sich teilweise überlappende offene Leseraster (*open reading frames*) welche die geringe Genomgröße ermöglichen:

- *Reading frame* für SHBsAg, MHBsAg, LHBsAg mit PreS1-, PreS2- und S-Domäne
- *Reading frame* für HBcAg und HBeAg
- *Reading frame* für das P-Protein (DNA-Polymerase)
- *Reading frame* für HBx

Die Rolle von HBx für die Virusreplikation und virusassoziierte Pathogenese ist noch nicht geklärt und wird kontrovers diskutiert [52]. Auch über die Funktion des nichtstrukturellen Proteins HBe ist wenig bekannt [53]. Neben den infektiösen Dane-Partikeln entstehen bei der intrazellulären Vermehrung von HBV eine wesentlich größere Anzahl an sphärischen, fadenförmigen sowie filamentösen HBsAg-Vesikeln, die keine DNA enthalten und somit nicht infektiös sind (*subviral envelope particles*, SVPs). Diese subviralen Partikel sind allerdings stark immunogen und dienen vermutlich als „Antikörperfänger“ zum Schutze des Virus [54]. Früher wurde angenommen, dass HBV sowie die SVPs im gleichen Prozess in der Zelle entstehen. Neuere Studien haben jedoch ergeben, dass möglicherweise endosomale *multivesicular bodies* an der Entstehung der SVPs beteiligt sein könnten [55, 56]. Die nichtinfektiösen Partikel sind momentan die Grundlage der meisten erhältlichen Impfungen [57].

1.2.2 Replikationszyklus

HBV ist hepatotrop, d.h. die Replikation erfolgt ausschließlich in der Leber bzw. den Hepatozyten des Wirts [58]. Einige frühe Schritte des Replikationszyklus, wie z.B. die Freisetzung des Genoms aus dem Kapsid, sind mangels eines in vivo Infektionssystems leider noch nicht vollständig geklärt. Es wurde diskutiert, dass der PräS1-Teil des LHB die Adsorption bewerkstelligen könnte [59]. 2012 gelang es Yan et al. [60] den zellulären Interaktionspartner von HBV, den HBV-Rezeptor zu identifizieren: *Natrium Taurocholat Cotransporting Polypeptide* (Ntcp, bzw. SLC10A1). Ntcp ist der wichtigste Transporter konjugierter Gallensäure und kommt hauptsächlich in der Leber vor [61]. Yan et al. konnten in Ihrer Studie zudem zeigen, dass HBV via den PräS1-Teils des LHB hochspezifisch mit Ntcp in Kontakt tritt.

Der weiterführende Mechanismus der viralen „Demontage“ (Uncoating) sowie des intrazellulären Transports des Nukleokapsids zum Zellkern ist nicht völlig verstanden. Am

Zellkern angelangt wird die partiell doppelsträngige DNA (engl. *relaxed circular partially double-stranded DNA*, rcDNA) mittels der wirtseigenen DNA-Polymerase in zirkulär geschlossene supercoiled DNA (engl. *covalently closed circular DNA*, cccDNA) überführt [62]. Im Nucleus transkribiert die zelluläre RNA-Polymerase II die cccDNA zur viralen mRNA. Das 3,5 Kilobasen (kb) lange Transkript besteht aus zwei verschiedenen Formen: der prägenomischen RNA (pgRNA) sowie der *precore* RNA. Die pgRNA dient als Vorlage für die reverse Transkription und als mRNA für das Kapsid und die Polymerase. Die *precore* RNA ist die Vorlage für das *Precore*-Protein (Pre-HbcAg). Das 2,4 kb lange Transkript translatiert für LHB, MHB und SHB werden durch verschiedene Formen der 2,1 kb RNA translatiert, HBx wird durch die 0,7 kb lange RNA translatiert [63]. Nach dem Ausschleusen aus dem Kern beginnt die Translation der mRNA. Die Hüllproteine LHB, MHB sowie SHB werden an der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) translatiert. Auch HBe entsteht auf diesem Wege im ER, wird dann aber per Golgi-Vesikel in den Blutkreislauf sezerniert. HBc sowie die virale Polymerase werden an freien Ribosomen im Zytoplasma translatiert. In dem neugebildeten Nukleokapsid synthetisiert die virale Reverse-Transkriptase den negativen DNA-Strang. Dieser dient als Vorlage für den Plusstrang. Aufgrund von komplementären Sequenzen an den Enden der Stränge kann sich das Genom in die zirkuläre Form umwandeln. Das dabei entstehende Endprodukt ist die rcDNA [58]. Im ER werden die Nukleokapside von einer Lipiddoppelmembran des Wirts eingehüllt. Anschließend werden die Virionen durch den Golgi-Apparat, auf sekretorischem Wege aus der Zelle in den Blutkreislauf abgegeben. Wie zuvor erwähnt, entstehen bei dem HBV-Replikationszyklus nicht nur infektiöse Virionen, sondern auch nicht-infektiöse SVPs in großen Mengen. Dies geschieht enzymunabhängig durch spontane Vernetzung von Cysteinresten des S-Proteins im ER [64].

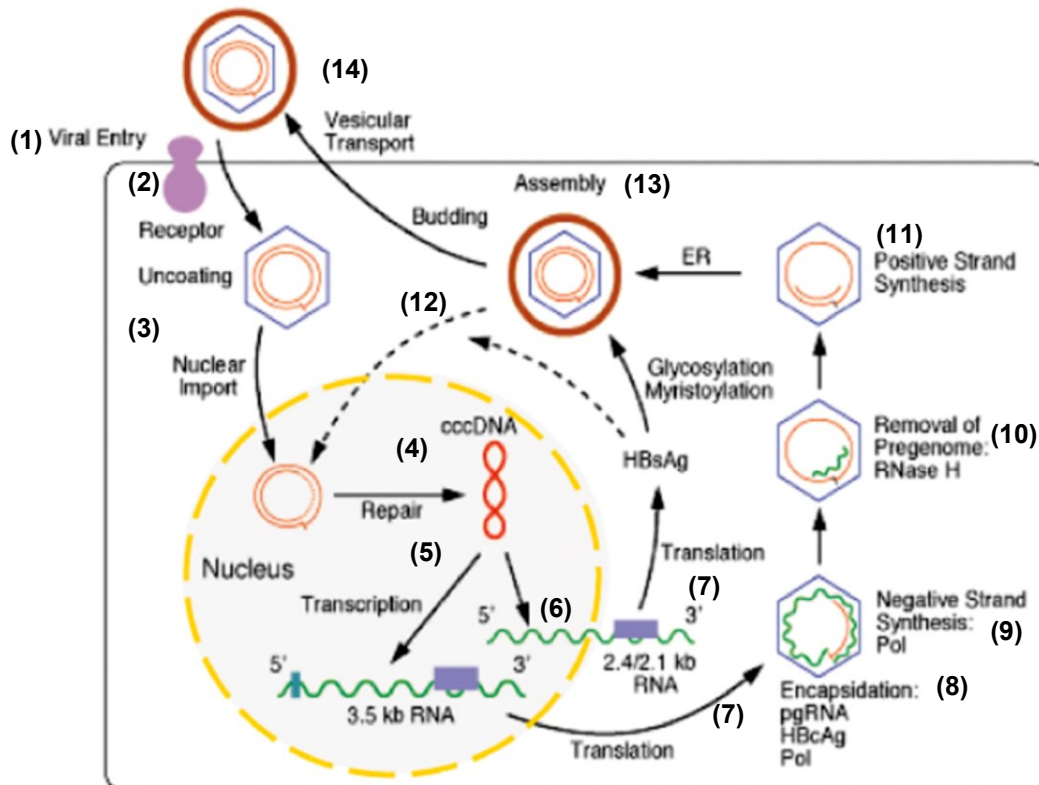


Abb. 6. Replikationszyklus von HBV in der Wirtszelle. (1) Adsorption (2) Ntcp vermittelte Endozytose (3) Transport zum Nucleus (4) Vervollständigung cccDNA (5) Transkription (6) Export mRNA in das Zytoplasma (7) Translation mRNA (8) Encapsidation von pgRNA und P Protein (9) Synthese (-)DNA-Strang mittels viraler Polymerase (10) Abbau RNA-Anteil durch P-Protein (11) Synthese (+)Doppelstrang zu (-) viraler DNA (12) Transport von rcDNA zum Nucleus zur Amplifikation von cccDNA (13) Oder: rcDNA bleibt in Nukleokapsid und wird in ER mit Lipiddoppelmembran und HBsAg umgeben (14) Freisetzung des Virion. Neben infektiösen Virionen werden auch nicht-infektiöse subvirale Partikel aus der Zelle geschleust. Modifiziert nach [63].

1.2.3 Epidemiologie

Die HBV-Infektion stellt heutzutage ein sehr großes Gesundheitsproblem mit weitreichenden Folgen dar. Über 2 Milliarden Menschen wurden im Laufe Ihres Lebens einmal HBV-infiziert, mehr als 300 Millionen leiden an einer chronischen Infektion [65]. HBV gehört somit weltweit zu den häufigsten Infektionskrankheiten. HBV stellt zudem heute die häufigste Ursache für eine Leberfibrose bzw. -zirrhose und das hepatozelluläre Karzinom (HCC) dar [66]. Trotz einer seit 1982 verfügbaren Impfung sterben jedes Jahr ca. 600.000 Menschen an den Folgen einer HBV-Infektion. Die Impfung war historisch betrachtet die erste, die sich gegen eine häufige Krebsart richtete (HCC) [67]. HBV kann generell über Blut und Blutprodukte, Sexualverkehr, Speichel sowie Mutter-

milch übertragen werden. In hoch endemischen Gebieten, welche durch eine HBsAg-Prävalenz der Bevölkerung von $> 8\%$ definiert sind, ist der häufigste Übertragungsweg tragischerweise perinatal von der Mutter auf das Kind oder von Mensch zu Mensch in der frühen Kindheit [68]. Südostasien und Teile Afrikas zählen zu den hoch endemischen Gebieten. In Gebieten mit niedrigerer Prävalenz sind die sexuelle Übertragung sowie das Anstecken durch benützte, verunreinigte Nadeln die häufigere Form.

1.2.4 Pathogenese

Die Infektion mit dem nur in Hepatozyten zur Replikation befähigten Virus führt innerhalb von einem bis sechs Monaten zu einer Leberentzündung (Hepatitis) [69]. Die Dauer der Inkubationszeit ist zum Teil von der initial aufgenommenen virämischen Last abhängig [70]. Dabei kann es zu verschiedenen Verläufen und Symptomen kommen. Bei der Bekämpfung der Virusinfektion sind angeborenes sowie adaptives Immunsystem involviert. In der frühen Phase der Infektion ist das angeborene Immunsystem der wichtigste Akteur. Es hat drei Hauptmechanismen mit denen es sich zur Wehr setzen kann: 1. die Produktion von Interferon alpha ($IFN\alpha$), 2. das Töten von infizierten Hepatozyten via natürliche Killerzellen (NK) und 3. die Produktion von pro inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen, welche helfen die spezifische Immunantwort zu aktivieren [71]. Nach ein paar Wochen, noch während der Inkubationszeit, ist mit dem Auftreten von $CD8^+$ -zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) sowie $CD4^+$ T-Helferzellen (TH) auch das adaptive Immunsystem an der Abwehr beteiligt [72]. Der spezifische bzw. adaptive Teil des Immunsystems ist für die Viruselimination von großer Bedeutung. Die hepatische Schädigung der chronischen Hepatitis B (CHB) resultiert hauptsächlich aus der Interaktion des Immunsystems des Wirts mit den infizierten Hepatozyten. HBV selber gilt unter normalen Umständen (z.B. bei intaktem Immunsystem) [73]) nicht als direkt zytopathisch [74]. CTL greifen unter anderem infizierte Hepatozyten an und zerstören diese. Die antivirale Kontrolle durch CTL kann mittels direkt-zytolytischer Effekte oder aber über indirekte (nicht zytopathische) Mechanismen wie $IFN\gamma$ oder Tumornekrosefaktor alpha ($TNF-\alpha$) erfolgen [75]. Kleine HBV-Epitope wie HBcAg werden auf der Membran der infizierten Hepatozyten von den CTL erkannt. Dies führt einerseits zur Schädigung der Leber, andererseits zur Viruselimination indem z.B. „versteckte“ virale cccDNA mit den Hepatozyten untergeht [76]. Dieser Prozess involviert die Aktivierung von CTL, TH sowie mononukleären Zellen des peripheren Blutes [51, 77]. Der exakte Ablauf dabei ist noch Gegenstand von Diskussionen. TH haben wahrscheinlich keinen direkten Effekt auf den Virus, sondern unterstützen die CTL gesteuerte Virus-spezifische Antwort [78]. Studien konnten einen Zusammenhang zwischen

der Stärke der Aktivierung von CTL und TH sowie der Ausrichtung der Antikörperproduktion (polyclonal versus schwach fokussiert) und dem Entstehen einer akuten oder chronischen Infektion ausmachen. Das Eintreten einer schwachen Immunantwort führt zu einer Chronifizierung [79], während eine starke Reaktion in einer selbstlimitierenden akuten Hepatitis B (AHB) endet [80]. Als Haupteffektoren der Viruselimination allerdings, werden verschiedene antivirale Zytokine (IFN α , - β , - γ [51]) verantwortlich gemacht. Die Induktion antiviraler Mechanismen von IFN α , - β , läuft wahrscheinlich mittels der pathogen-erkennenden Rezeptoren der Familie der Toll-like Rezeptoren des angeborenen Immunsystems ab [81]. IFN α , - β stimulieren antigenpräsentierende Zellen wie Dendritische-Zellen oder Kupfer-Zellen, so dass diese Interleukine (IL-8, -12, -18) bilden. IL-12 und IL-18 wiederum aktivieren natürliche Killerzellen (NK) sowie natürliche Killer-T-Zellen (NKT) [82]. Die Rolle der NK, speziell in der Aufrechterhaltung der Viruspersistenz sowie der Inflammation wird kontrovers diskutiert [83]. Im Gegensatz zu solch einer breiten Aktivierung von Verteidigungsmechanismen, berichten andere Autoren in einer prominenten Studie jedoch über ein Ausbleiben der Antwort des angeborenen Immunsystems, speziell der IFN vermittelten antiviralen Mechanismen als Schutz des Virus vor Elimination [84].

1.2.5 Diagnostik & Verlauf

Die Diagnosestellung einer HBV-Infektion beruht auf mehreren serologischen, histologischen sowie klinischen Befunden. Im Vordergrund steht jedoch die serologische Untersuchung, da mit ihr virale Antigene und Antikörper im Serum der Infizierten identifiziert werden und so die klinischen Verlaufsformen unterschieden werden können [63]. Zur besseren Einschätzung des Schweregrads bzw. eventuellen Komplikationen einer HBV-Infektion ist es jedoch notwendig zusätzliche Diagnostik wie die Abdomen-Sonografie, Ösophagogastro-duodenoskopie oder Leberhistologie etc. einzusetzen. Ganz allgemein kann eine Infektion über das Vorhandensein von HBsAg im Serum diagnostiziert werden. Der qualitative Nachweis des Hüllproteins genügt für die Diagnose einer Infektion [85]. Bei einer Persistenz von HBsAg über 6 Monate im Blut der Patienten spricht man von einer CHB. Eine Heilung der Infektion, wird durch die Abwesenheit von HBsAg im Blut des Infizierten über einen Zeitraum von 6 Monaten definiert. HBV wird eher von einem funktionierenden Immunsystem in Schach gehalten, als dass es komplett eliminiert werden würde. Noch jahrzehntelang nach Ausheilung kann eine minimale Virusreplikation nachgewiesen werden [86]. Abb. 7 gibt eine graphische Darstellung des Verlaufs der viralen Antigene sowie der Menge der HBV-DNA und die Aktivität der Serum-Alanin-Aminotransferase (ALT) im Blut HBV-Infizierter wieder.

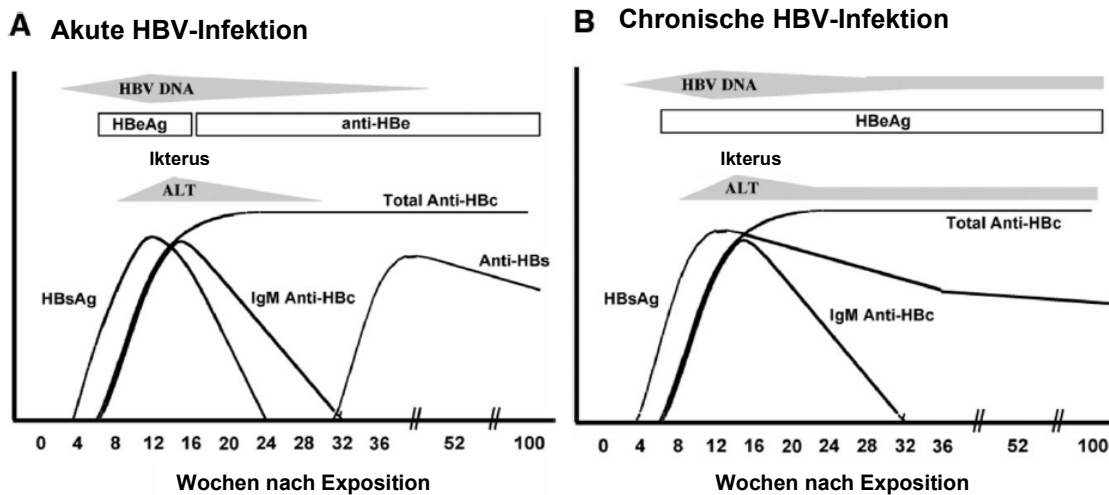


Abb. 7. Überblick über den Verlauf viraler Marker einer HBV-Infektion. (A) AHB: Nach frühestens einer Woche lässt sich HBsAg und HBV-DNA, ein wenig später HBeAg im Serum nachweisen. Begleitend kommt es zu einem Anstieg der Serum-ALT. HBeAg und HBV-DNA sind Hinweise auf eine Infektiosität. **(B) Die CHB** hat einen variablen Verlauf, mit verschiedenen charakteristischen Phasen. HBsAg bleibt positiv, HBeAg kann entweder persistieren (Immunitoleranz-Phase) oder wird mit der Serokonversion negativ (niedrig-replikative Phase). Modifiziert nach [63].

1.2.5.1 Akute Hepatitis B

Bei Kindern über fünf Jahre und Erwachsenen kommt es in ca. 30 % der Fälle zu einer AHB. Bei Kleinkindern liegt der Anteil einer AHB bei nur 1-10 %. Nach der Inkubationszeit kommt es zu einer Prodromal- oder Präikterischen-Phase mit Allgemeinsymptomen wie Müdigkeit, Gelenkschmerzen, Appetitlosigkeit und Übelkeit. Während dieser Phase steigen der Wert der Transaminasen, die Höhe des HBsAg-Titers sowie die HBV-DNA im Blut an. Nach einigen Tagen kann ein Ikterus oder dunkler Urin folgen. Eine fulminante Hepatitis, entwickelt sich bei 0,1-0,6 % aller akuten Hepatitiden Typ B, ca. 70 % der Patienten versterben daran. Die fulminante Hepatitis ist geprägt durch plötzlichen Beginn von Fieber, Erbrechen, abdominellen Schmerzen. Später kann ein Leberversagen mit Verwirrung bis hin zum hepatischen Koma auftreten [63]. Bei ca. 2/3 der Fälle läuft die Infektion inapparent ab. 95 % aller Patienten die an der AHB erkranken überstehen diese und haben danach eine lebenslange T-Zell- sowie Antikörper vermittelte Immunität [87]. Zu Beginn der AHB erscheinen zuerst fast gleichzeitig HBV-DNA sowie HBsAg und danach HBeAg im Serum der Patienten [88]. HBsAg kann ab einer bis spätestens 12 Wochen nach Infektion im Serum nachgewiesen werden. Als Hinweis auf eine mögliche Infektiosität gilt der Nachweis von HBV-DNA im Serum per quantitativer PCR. Zusammen mit HBeAg, spricht HBV-DNA im Serum für eine

HBV-Replikation. Ein paar Wochen nach dem Auftreten der viralen Marker (ca. 5 bis 15 Wochen nach Primärinfektion), beginnen auch die Serum-ALT sowie Aspartat-Aminotransferase (AST) zu steigen. Zudem kann noch ein erhöhter Bilirubinspiegel mit einem Ikterus auftreten, wobei dies einen beginnenden hepatozellulären Schaden aufzeigt. Bei Abheilung der AHB verschwindet die HBV-DNA aus dem Blut und es kommt zuerst zu einer Serokonversion von HBcAg zu Anti-HBc, danach von HBeAg zu Anti-HBe, sowie danach von HBsAg zu Anti-HBs. Die früher oft erwähnte diagnostische Lücke, beschreibt den Zustand in dem HBsAg nicht mehr im Blut nachzuweisen ist, aber Anti-HBs noch nicht nachweisbar vorhanden ist. In diesem seltenen Fall beruht die Diagnose einer HBV-Infektion allein auf dem Nachweis von IgM-Antikörpern gegen HBcAg [89].

1.2.5.2 Chronische Hepatitis B

Nur weniger als 5 % der Erwachsenen, aber bis zu 90 % der perinatal Infizierten entwickeln eine CHB. Das Risiko der Chronifizierung ist zum Teil abhängig vom Alter, je jünger der Patient desto höher das Risiko [90]. Die CHB ist durch eine über 6 Monate andauernde HBsAg-Persistenz im Blut des Patienten charakterisiert [91]. Der Verlauf der Infektion kann in vier Phasen eingeteilt werden (siehe Abb. 8): Immun-Toleranz, Immun-Clearance (HBeAg positiv), Immun-Kontrolle (niedrig replikativ) und Immun-Escape (HBeAg-negativ) [92, 93]. Diese Einteilung muss allerdings nicht bei jedem Patient zutreffen, zum Teil laufen die Phasen auch nicht sequentiell ab.

	Immune tolerant	HBeAg-positive CHB [immune clearance]	Immune control [low or non-replicative]	HBeAg-negative CHB [immune escape]
HBeAg	Positive (2000–5000 PEIU/ml)	Positive (100–1000 PEIU/ml)	Negative	Negative
Anti-HBe				
HBsAg (log IU/ml)	4.5–5	4.0–4.5	2.9–3.0	3.3–3.9
Anti-HBs				
HBV DNA (IU/ml)	>20 000	>20 000	<2000	>2000
Viral diversity (PC/C ORF)				
Serum ALT level (UI)	Persistently normal	Elevated (1–2x) and fluctuating	Normal	Elevated and fluctuating
Liver histology	Normal or mild hepatitis	Moderate to severe hepatitis	Normal to mild hepatitis. May have cirrhosis	Moderate to severe hepatitis. May have cirrhosis
Intra-hepatic HBV replicative intermediates	rcDNA/cccDNA (100–1000) >1 cccDNA/cell	rcDNA/cccDNA (10–1000) 1 cccDNA/cell (0.1–10/cell)	rcDNA/cccDNA (10–100) 0.1 cccDNA/cell (0.001–1/cell)	rcDNA/cccDNA (100–1000) 1 cccDNA/cell (0.1–10/cell)

Abb. 8. Phasen der CHB:

(1) Immun-Toleranz: hohe HBV-Replikationsrate, Vorhandensein von HBeAg.

(2) Immun-Clearance: kann Jahre dauern, HBV-DNA-Level niedriger, HBeAg positiv, progressive hepatische Schädigung.

(3) Immun-Kontrolle: geringere ALT-Werte, niedrige virale Replikation, ameliorierte hepatische Fibrose.

(4) Immun-Escape: sehr aggressiv, HBeAg-negativ, jedoch hohe HBV-DNA- sowie ALT-Level. Modifiziert nach [1].

Eine hohe HBV-Replikationsrate, Vorhandensein von HBeAg im Serum sowie eine normal bis leicht erhöhte ALT kommen in der immun-toleranten Phase vor. Je nach

Ansteckungsart kann diese Phase unterschiedlich lang sein: bei perinatal Infizierten bis zu 30 Jahre, bei neu infizierten Erwachsenen sehr kurz bis nicht existent. In der Immun-Clearance-Phase, welche Jahre dauern kann, sind zwar die HBV-DNA-Level niedriger, dennoch schreitet die hepatische Inflammation voran [1]. Während dieser Zeit ist HBeAg positiv und es kommt zu einer progressiven hepatischen Schädigung mit zum Teil fluktuierendem Verlauf. Mit der Serokonversion, d.h. dem Wechsel von HBeAg positiv zu Anti-HBeAg positiv und HBeAg negativ, tritt der Patient in die niedrig-replikative Phase ein (Immun-Kontrolle). Eine andere gebräuchliche Bezeichnung der replikativen Phase war die des „Inaktiven Carrier Status“. Diese Beschreibung wird jedoch mittlerweile wegen der Gefahr der möglichen Reaktivierung als irreführend betrachtet [94]. Die niedrig-replikative Phase ist durch geringere ALT-Werte und einer geringen viralen Replikation (HBV-DNA < 2000 IU/l) - oftmals einhergehend mit einer ameliorierten hepatischen Fibrose sowie entzündlicher Aktivität- gekennzeichnet [95]. HBsAg allerdings bleibt dabei nachweisbar. Ein Großteil (ca. 300 Millionen) der chronisch Infizierten kann zu dieser Gruppe gezählt werden [96]. Eine weitere Untergruppe stellt die Immun-Escape-Phase oder Precore-Mutanten-CHB dar. Aufgrund einer Mutation des Genoms, kann HBV kein HBeAg in der Wirtszelle produzieren. Diese Form der CHB ist häufig sehr aggressiv und zeigt eine schnelle Progression zu hepatischer Fibrose und HCC [97]. Die Patienten sind zwar HBeAg-negativ, jedoch liegen hohe HBV-DNA-Level (> 2000 IU/ml) und hohe ALT-Level vor [1].

Während der Replikation von HBV bleibt oft cccDNA in den Hepatozyten zurück. Durch die cccDNA ist es dem Virus möglich sich wieder zu reaktivieren und in eigentlich inaktiven Trägern für ein erneutes Auftreten von HBeAg zu sorgen [69]. Besonders gefährdet für eine Reaktivierung von HBV sind Patienten die immunsuppressiv behandelt werden [89]. Zudem ist eine Immunsuppression überdurchschnittlich oft mit einem fulminanten Verlauf der CHB sowie der Entstehung der sog. fibrosierenden cholestatischen Hepatitis (FCH) verknüpft (siehe 1.2.5.3) [98]. Im Rahmen von Organtransplantationen, treten bei KMT die schwersten Fälle einer Reaktivierung von HBV-Infektionen auf. Durch die Chemoablation des nativen KM und dem damit verbundenen Verlust der adaptiven Immunantwort gegen HBV, tritt bei den Empfängern nach Erhalt des Donor-KM nahezu immer eine schwere Reaktivierung mit hoher Replikationsrate von HBV auf [99, 100]. Lucifora et al. [101] konnten jedoch via einer IFN α - und Lymphotoxin- β -Rezeptor-Aktivierung, bestimmte Cytidin-Deaminasen in HBV-infizierten Zellen hochregulieren. Diese Deaminasen vermochten nun HBV-spezifische cccDNA zu degradieren ohne die Wirtszelle zu schädigen. Dies könnte in Zukunft eine therapeutische Möglichkeit darstellen, eine Reaktivierung einer HBV-Infektion zu verhindern.

Viele der chronisch Infizierten zeigen erst spät Symptome. Allgemein tritt eine große Variabilität des möglichen Krankheitsverlaufs auf. Je nach Schwere der Erkrankung kommt es zu einer deutlichen Einschränkung der Lebenserwartung. Für Patienten die an einer schweren CHB mit einer hepatischen Zirrhose leiden, ergibt sich eine 5-Jahres-Überlebensrate von lediglich ca. 50 % [102]. Oft leiden die Patienten unter unspezifischen Symptomen wie Müdigkeit und Leistungsminderung oder abdominellen Schmerzen. In schwereren Verläufen können charakteristische Leberhautzeichen wie Spider-naevi, Palmarerythem, Teleangiektasien, Duputryen-Kontraktur oder andere Symptome wie Splenomegalie und Gynäkomastie auftreten. Bei Patienten im Endstadium der hepatischen Zirrhose kommt es zudem zu gravierenderen Symptomen wie portaler Hypertension mit Aszites, peripheren Ödemen, Ösophagusvarizen, Koagulopathien, gastrointestinalen Blutungen, hepatischer Enzephalopathie oder einem HCC [103]. ALT und AST sind oft erhöht, zeigen aber nicht zwangsweise eine Korrelation mit der Krankheitsschwere auf. Das Risiko ein HCC zu entwickeln ist bei einer HBV-Infektion bis zu 200x größer als in der Normalbevölkerung [104]. Das HCC ist die dritthäufigste Ursache für einen krebsbedingten Tod, in mehr als 50 % aller Fälle ist eine Infektion mit HBV für die Entstehung eines HCC verantwortlich [105, 106]. Eine hohe virale Last (HBV-DNA > 10⁴ Kopien/ml) fördert die Kanzerogenese und kann als Prädiktor für die Entstehung eines HCC verwendet werden. Generell gesehen, stellt die Höhe der HBV-DNA im Blut einen wichtigen Risikofaktor für die Krankheitsprogression der CHB dar [95]. Zugleich weist dies aber auch auf einen therapeutisch-präventiven Ansatz hin. Wenn eine kontinuierliche antivirale Therapie durchgeführt wird, sinkt das Risiko Komplikationen wie HCC zu entwickeln erheblich [107].

1.2.5.3 *Fibrosierende cholestatische Hepatitis*

Der Begriff fibrosierende cholestatische Hepatitis (FCH) wurde erstmals 1991 von Davis et al. [108] verwendet, um eine schwere Form der wiederkehrenden Hepatitis B in Empfängern von Lebertransplantaten (L-Tx) zu beschreiben. Es gab allerdings schon früher beschriebene Fälle die eine ähnliche Klinik sowie Pathologie zeigten [109]. In einer frühen Studie postulierten die Autoren ein Risiko von über 30 % für einen HBV-Infizierten nach einer L-Tx an einer FCH zu erkranken [110]. Die FCH zeigt ein atypisches Muster einer Leberschädigung und kommt klassischerweise in immunsupprimierten Patienten kombiniert mit einer HBV-Infektion vor. Sie verursacht innerhalb von vier bis neun Wochen ein rapides Leberversagen, welches mit einer hohen Mortalität verknüpft ist [111]. Im Serum der Patienten lässt sich ein stark erhöhtes Bilirubin nachweisen. ALT und AST sind nur leicht erhöht [110]. Die histologischen Veränderungen umfassen einen hepatozellulären Schaden, eine leichte inflammatorische Reaktion und

eine schwache, manchmal starke periportale und/oder perisinusoidale Fibrose [112]. Die parenchymatösen Veränderungen bestehen aus einer deutlichen Schwellung der Hepatozyten (engl. *feathery degeneration*), einer Cholestase sowie einer duktilären Reaktion. Oftmals schreitet die FCH bis zu einer sinusoidalen Fibrose mit lobulärem Kollaps voran [113]. Kennzeichnend sind häufig eine hohe Anzahl von HBsAg- und HBcAg-positiven Hepatozyten [112].

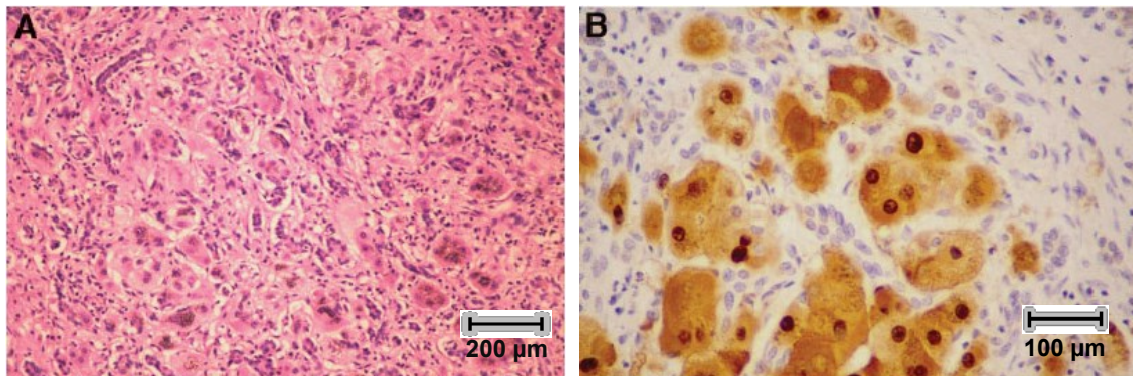


Abb. 9. Histopathologische Kennzeichen der FCH. A: Die Leber zeigt eine markante duktiläre Reaktion, eine Schwellung der Hepatozyten sowie eine leichte inflammatorische Reaktion, H&E-Färbung **B:** Starke HBcAg-Expression im Kern und Zytoplasma der Hepatozyten. IHC-Nachweis HBcAg. Modifiziert nach [113].

Früher ging man von einer für L-Tx und HBV spezifischen Pathologie aus, mittlerweile konnte man das Krankheitsbild allerdings auch in einer Vielzahl von anderen Konstellationen von Virusinfektionen und Organtransplantationen unter Immunsuppression in Zusammenhang bringen. So gibt es viele Fälle in Hepatitis-C-Virus-Infizierten nach L-Tx [114, 115], nach Nieren-Tx [116, 117], sogar nach Herz-Tx [118] oder bei Zytomegalievirus-Infektionen in Empfängern einer Nieren-Tx [119]. Hinweise auf besonders gravierende Verläufe einer FCH zeigten sich auch nach L-Tx in HCV/HIV-Koinfektionen [120]. Auch ein Auftreten nach allogenen KMT bei HBV-Infektion konnte beobachtet werden [121, 122]. Interessanterweise kommt es unter den Organtransplantationen bei KMT zu den gravierendsten Fällen einer Reaktivierung der HBV-Infektion (siehe 1.2.5.2, S.15). Eine gleichzeitige Infektion mit HBV und dem Hepatitis D Virus scheint erstaunlicherweise bis zu einem gewissen Maß vor der Entwicklung einer FCH zu schützen [123]. Der den genannten Fällen zugrunde liegende gemeinsame, entscheidende Faktor der Entwicklung einer FCH, scheint die Immunsuppression zu sein [124]. Der Ablauf der Reaktivierung der Virusinfektion sowie der hepatischen Schädigung ist leider noch nicht genau verstanden. Es kommt in den meisten Patienten aufgrund der Immunsuppression [125] zu einer sehr hohen viralen Replikationsrate in den Hepatozyten, mit angestiegenen HBV-DNA-Werten im Serum [110]. Ein weiterer verwandter

Risikofaktor der Entstehung einer FCH nach einer L-Tx scheint hohe Mengen an HBsAg und HbcAg in der explantierten Leber zu sein. Patienten die dieses Merkmal zeigten, erlitten in einer Studie signifikant häufiger eine FCH im Anschluss an eine L-Tx. Die Autoren folgerten, in Verbindung mit einer geringen Inflammation, auf einen möglichen direkten zytopathischen Effekt von HBV [126]. Zur Untermauerung dieser These wird eine Studie von Chisari et al. [127] angeführt, in der mittels der in dieser Untersuchung verwendeten HBV-transgenen Maus demonstriert wird, dass ein direkter zytopathischer Schaden von der Akkumulation von HBsAg auf die Hepatozyten auszugehen scheint. Für die Genese einer FCH werden darüber hinaus bestimmte virale Mutanten verantwortlich gemacht, deren virale Replikation dysreguliert ist. Darunter finden sich unter anderem Precore- [128, 129] sowie HBsAg-Mutanten [130].

1.2.6 Therapiemöglichkeiten

1.2.6.1 Pharmatherapie

Bevor eine Therapie überhaupt nötig wird, sollten an erster Stelle präventive Maßnahmen wie z.B. die HBV-Impfung stehen. Sie ist seit längerer Zeit verfügbar, verlässlich und gut verträglich [131]. Die Behandlung der akuten Verlaufsform der HBV-Infektion ist wegen der sehr hohen spontanen Heilungsrate von bis zu 95 % [132] oftmals nur symptomatisch. Patienten die an der fulminant verlaufenden Form mit starkem Ikterus, Koagulopathie etc. erkranken, sollten hospitalisiert werden. Über eine Gabe von nicht-nukleosidischen Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (engl. *Non Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor*, NNRTI) in der akuten Hepatitis wird kontrovers diskutiert [133, 134], soweit kann aber noch keine eindeutige Empfehlung ausgesprochen werden [89]. Die Behandlung der CHB [135] zielt auf die Unterdrückung der HBV-Replikation. Wichtig dabei ist die Reduzierung der Inflammation, um eine weitere Progression der hepatischen Fibrose zu Zirrhose und Leberversagen bzw. dem Fortschreiten der Kanzerogenese zu einem HCC zu stoppen [136]. In der CHB kann jedoch der Virus aufgrund der persistierenden cccDNA nicht vollständig eliminiert werden [69]. Um die Reduktion der viralen Replikation zu erreichen, stehen mehrere Medikamentenklassen zur Verfügung: IFN α , pegyliertes IFN und fünf Nukleos(t)idischen Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (engl. *Nucleos(t)ide Reverse Transcriptase Inhibitors*, NRTI) mit den Einzelwirkstoffen Lamivudin, Telbivudin, Entecavir, Adefovir und Tenofovir. Die Monotherapie mit pegyliertem IFN, Entecavir und Telbivudin gilt derzeit als am effizientesten und am wenigsten mit der Gefahr einer Resistenz verbunden, sie wird daher als Erstlinientherapie empfohlen [137]. Speziell im Fall der Reinfektion nach L-TX, hat sich eine

Kombination von Hepatitis B Immunoglobulin (HBIG, humane Antikörper gegen HBsAg) und Nucleos(t)id-Analoga als beste Behandlungsmethode erwiesen [138].

1.2.6.2 Leber- und Knochenmarktransplantation

Die Entwicklung einer Leberzirrhose ist die häufigste Komplikation einer CHB [139]. Für eine Leberzirrhose sowie dem HCC liegen, bis auf die aufwendige und potentiell komplikationsreiche L-Tx, noch keine anderen kausalen Therapieformen vor. Bis Mitte der 90er Jahre das HBIG und die Nucleos(t)id-Analoga aufkamen, galt eine HBV-Infektion aufgrund der extrem hohen Reinfektionsrate oftmals als relative oder sogar absolute Kontraindikation für eine L-Tx [140]. Durch die Kombination von Lamivudin und HBIG, gelang es die Reinfektionsrate nach einer L-Tx auf unter 5 % nach 5 Jahren zu senken [141]. Mittlerweile liegt die Überlebensrate nach L-Tx bei CHB, im ersten Jahr bei 85 % und im fünften Jahr bei 75 % [142]. Der Anteil der HBV bedingten L-Tx liegt derzeit bei ca. 6 % [143]. Trotz sinkender Indikationsstellung einer L-Tx z.B. wegen verbesserter kontinuierlicher antiviraler Therapie, gibt es immer noch zu wenig Organspender. Die durchschnittliche Wartezeit in Europa für eine Spenderleber bei einem chronischen Leberversagen (Dringlichkeitsstufe T3), lag 2006 zwischen 350 und 550 Tagen [144]. Aufgrund dieser Einschränkungen der L-Tx wird verstärkt nach weiteren Strategien zur Therapie der hepatischen Fibrose bzw. Zirrhose geforscht. In den Fokus gerieten dabei adulte Stammzellen des KM, da diese eine hohe Plastizität, d.h. die Fähigkeit besitzen sich in eine Vielzahl von verschiedenen Geweben zu differenzieren und damit zu deren Reparatur bzw. Regeneration beizutragen [145]. Die Beteiligung an Reparaturprozessen geschädigter Organe konnte schon für Vaskulogenese [146], Skelettmuskel [147], Myokard [148], Niere [149], ZNS [150] und Leber [151] demonstriert werden. Das KM dient als Reservoir für multiple Stammzell-Populationen: hämatopoetische Stammzellen (HPCs), mesenchymale Stammzellen, endotheliale Progenitorzellen (EPCs) und sehr kleine embryonen-ähnliche Zellen (engl. *very small embryonic-like cells*) [152]. Falls Stammzellen aus dem KM rekrutiert werden und in das verletzte Organ migrieren, können sie auf zweierlei Arten neues Gewebe bilden. Zum einen kann dies durch Umwandlung multi- oder pluripotenter Vorläuferzellen in spezifische Gewebezellen oder aber durch Fusion von KM- und Empfängerzellen geschehen [153]. Verschiedene Studien berichten, dass KM-Zellen die in die Blutzirkulation gelangen nach dem Einwandern in die Leber zur Regeneration des Organs beitragen können. Das Ausmaß der Beteiligung sowie der exakte Mechanismus jedoch bleiben kontrovers [43, 154]. Es konnte gezeigt werden, dass HPCs (klassifiziert durch die Oberflächenmerkmale: CD133+, CD45+, CD14+) bei hepatischer Schädigung aus dem Blutkreislauf in die Leber einwandern und dort beginnen Marker leberspezifischer Pro-

genitorzellen zu demonstrieren [155]. Dennoch bleibt die Bedeutung der HPCs für die Gewebereparatur, speziell der menschlichen Leber unsicher [156]. Die Angaben des Anteils an Hepatozyten, die aus in die Leber migrierten HPCs stammen, variieren in verschiedenen Studien stark (0,01 % bis 40 %) [157]. In einer klinischen Studie wurden Patienten untersucht die wegen unterschiedlicher primärer und sekundärer Lebermalignome (HCC, Metastasen eines Kolorektalen Karzinoms etc.) eine selektive Portalvenenembolisation einiger Segmente (als Proliferationsstimulus vor Leberteilresektion) erhielten. Direkt im Anschluss an die Embolisation gab man ihnen zudem eine intraportale Injektion von autologen CD133-positiven KM-Zellen. Die Tx der Stammzellen führte in der Versuchsgruppe zu einer signifikanten Verbesserung des Child-Pugh-Score sowie dem Anheben des Serum-Albumins [158]. In einer früheren Studie unserer Arbeitsgruppe konnte demonstriert werden, dass eine syngene sowie allogene KMT zu einer Verbesserung der Leberfunktion und des hepatischen Staging in einem Mausmodell der sklerosierenden Cholangitis (Abcb4-Knockout-Maus) führte [18]. Auch bei CCl₄ (Tetrachlorkohlenstoff) induzierter-Fibrose, konnte mittels KMT eine Reduzierung der hepatischen Schädigung sowie eine signifikant höhere Überlebensrate erreicht werden [159]. Für mesenchymale Stammzellen konnte ebenfalls eine Migration in die geschädigte Leber [151] und eine positiver Effekt auf die hepatische Fibrose nachgewiesen werden [160].

1.3 DAS HBV-TRANSGENE MAUSMODELL

HBV kann nur Menschen und Schimpansen infizieren [161]. Durch dem HBV sehr nah verwandte Virusstämme die z.B. Pekingente (*duck* HBV, DHBV) oder nordamerikanische Waldmurmeltiere (*Woodchuck* Hepatitis Virus, WHV) infizieren, gelang es unter anderem Schritte des Replikationszyklus [162] oder der hepatischen Kanzerogenese [163] genauer zu verstehen. Jedoch sind diese Tierarten weitaus weniger intensiv untersucht als die am häufigsten verwendeten, Maus und Ratte. Aufgrund dieser engen Auswahl an Wirten des Virus, ist es nötig Alternativen für die wichtige Forschung an Replikation, molekularen Pathomechanismus oder Therapieformen zu verwenden. In vitro Zellkultur-Experimente mit HBV-transfektierten humanen Hepatomzellen (HepG2) sind seit vielen Jahren möglich [164]. In 2012 gelang es Lucifora et al. [101] mittels einer Transfektion von humanem Ntcp unter anderem HepG2-Zellen für eine HDV- und HBV-Infektion empfänglich zu machen.

Zudem konnte HBV in humanen primären Hepatozyten-Kulturen angezüchtet werden [165]. Da die Zellen allerdings nach einiger Zeit Ihre ursprüngliche Differenzierung verlieren, sind Langzeitstudien schwierig durchzuführen [166]. Hepatomzellen und huma-

ne Hepatozyten-Kulturen verhalten sich auf Stimuli anders als es Hepatozyten in der Leber tun. Dies liegt unter anderem an der fehlenden dreidimensionalen Architektur der Systeme und den fehlenden Interaktionen mit Nichtparenchymzellen wie z.B. HSCs [167].

In vivo Experimente hingegen, bieten die Möglichkeit die HBV-Infektion im Zusammenspiel diverser Reaktionspartner, im lebendigen Organismus über lange Zeit zu studieren. Die partielle Repopulierung der Leber immundefizienter Mäusen (uPA/RAG-2) mit humanen Hepatozyten, führte zur Entwicklung von chimären Mäusen welche für eine HBV-Infektion empfänglich sind. Die Mäuse besitzen ein lebertoxisch wirkendes Transgen (uPA: Uroplasinogenaktivator), welches für eine hohe Hepatozytenproliferation sorgt [168]. Zudem weisen sie durch die Deletion eines Teils von RAG-2 (*Recombination activating gene 2*) einen schweren kombinierten Immundefekt (SCID) auf [169]. Mit diesen Mäusen ist es möglich, z.B. Genotyp-spezifische Auswirkungen auf die HBV Replikation zu untersuchen [170]. Der wichtigste Anwendungsbereich der chimären Mäuse ist jedoch die Evaluation verschiedener antiviraler Therapien [161]. Ein alternatives in vivo Modell einer HBV-Infektion wurde 1985 erstmals von Chisari et al entwickelt [171]. Dabei wurde mittels Mikroinjektion von subgenomischen HBV-DNA-Fragmenten (Genotyp D, Subtyp ayw) in phänotypisch gesunde Mäuse, eine transgene Mauslinie (Stamm: C57BL/6J-Tg(Alb1HBV)44Bri/J) erschaffen. Die HBV-Fragmente enthalten die kodierenden Regionen für die viralen Hüllproteine preS1 (LHB), preS2 (MHB), S (HBsAg bzw. SHB) und HBx, welche mithilfe des leberspezifischen murinen Albuminpromotors exprimiert werden. Die Hepatozyten dieser HBV-transgenen Mauslinie exprimieren die Hepatitis B Hüllproteine (HBs), besonders LHB in ausgeprägtem Maße und sekretieren HBsAg sowie SVP ins Serum [172]. Die Mäuse sind gegen das eingebrachte Transgen immun, da der Virus während der Embryogenese als körpereigenes Protein erkannt wird [173]. So können im Serum der transgenen Mäuse keine Antikörper gegen HBsAg nachgewiesen werden [171]. Die massenhafte Synthese von LHB führt zur progressiven Ansammlung von ungewöhnlich langen (bis 800 nm), nicht sekretierbaren, filamentösen HBsAg-Partikeln im glatten ER bzw. Prä-Golgi-Kompartiment. Hohe Konzentrationen an im ER gefangenen Virusteilen erschweren wiederum eine regelrechte Bildung von HBV-Partikeln und reduzieren damit deren Sekretion. Dies führt zu der Ansammlung toxischer Mengen von Partikeln, welche zum Tod der Hepatozyten führt. Je mehr HBsAg von den Hepatozyten synthetisiert wird, desto gravierender fällt der Schaden aus. Die Akkumulation der Proteine führt zudem zu einer hydropischen Schwellung bzw. auffälligen Größe der Hepatozyten [127]. Die murinen Hepatozyten zeigen einen Phänotyp ähnlich der Milchglashepatozyten in CHB. Diese weisen eine Hyperplasie des glatten ER, im Zytoplasma eingeschlossene

Oberflächenproteine sowie eine fehlende Färbbarkeit mit Eosin auf [174, 175]. Die Überproduktion von LHB führt demnach in den Mäusen zu einem direkten hepatozellulären Schaden, der durch einen signifikanten Anstieg der Serum-ALT, Einzelzellnekrosen (sog. Councilman-Körperchen), fokaler Nekrose mehrerer Hepatozyten sowie einem inflammatorischen Infiltrat gekennzeichnet ist. Die portale Zone und Gallengänge bleiben dabei jedoch unbeteiligt, auch eine Cholestase tritt nicht auf [127]. Mit höherem Alter entwickeln die Mäuse zunehmend Foci HBsAg-negativer Hepatozyten, diese entsprechen regenerativen, hyperplastischen Knötchen. Die kontinuierliche hepatische Schädigung mit Nekrose, Inflammation, Regeneration, Aneuploidie und Dysplasie führt in älteren Tieren zu der Entstehung einer chronischen Hepatitis sowie dem Auftreten von HCC [175]. HCC bilden sich bevorzugt in männlichen, transgenen Mäusen [176]. Weil die entstehenden HCC ebenfalls HBsAg-negativ sind, wurde auf einen Zusammenhang von HBsAg-freien Regenerat-Foci und der Entwicklung von HCC geschlossen. Eine neuere Untersuchung konnte jedoch zeigen, dass HCC aus Hepatozyten mit intaktem Transgen entstehen, wohingegen die HBsAg-freien Bereiche aus (Transgen-freien) Progenitorzellen hervorgehen [177]. Die Grundlage des in dieser Arbeit verwendeten Modells der HBV-Infektion, ist seit vielen Jahren in Verwendung [171] und ist extensiv in Bezug auf vielerlei Faktoren (Immunsystem, direkte Viruspathogenität, Kanzerogenese etc.) untersucht worden [87, 178, 179].

1.4 ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Über 2 Milliarden Menschen haben sich im Laufe Ihres Lebens einmal mit HBV infiziert, mehr als 300 Millionen leiden an einer chronischen Infektion [65]. HBV stellt heute zudem die häufigste Ursache für eine Leberfibrose bzw. -zirrhose und das HCC dar. Aufgrund der Fähigkeit sich in viele verschiedene Gewebetypen zu differenzieren rücken adulte Stammzellen, z.B. aus dem KM, in den Fokus aktueller Forschung. Ein therapeutischer Nutzen einer KMT auf die hepatische Fibrose konnte unter anderem in einem Modell der sklerosierenden Cholangitis oder in CCl₄induzierter-Fibrose gezeigt werden [18, 159]. Bisher liegen keine Daten zu dem Einsatz einer KMT in Bezug auf eine HBV-bedingte Fibrose im Tiermodell vor. Klinische Studien in denen Patienten mit Leberfibrose eine autologe KMT erhielten, zeigten gute Ergebnisse [180-183]. Die in dieser Arbeit verwendete HBV-transgene Maus-Linie ist seit langem bekannt [171] und ist extensiv in Bezug auf vielerlei Faktoren untersucht worden [87, 178, 179]. Die Hepatozyten dieses Mausmodells überexprimieren LHB und verursachen so eine andauernde hepatische Schädigung der Mäuse, die einer chronischen Hepatitis mit HCC-Entstehung ähnelt [171].

Ausgangspunkt der Arbeit war die Frage:

Führt eine KMT von gesunden Spendermäusen in HBV-transgenen Mäusen zu einer Verbesserung von Lebergrading und Leberstaging?

Allgemeine hepatische Funktion sowie Ausmaß der Leberfibrose wurden mittels des Nachweises der Aktivität der Serum-ALT und der alkalischen Phosphatase (AP), der Bestimmung des Gesamtgehalts an hepatischem Hydroxyprolin sowie dem Nachweis verschiedener fibrosetypischer Marker in q-PCR (col1a1, MMPs, TIMP etc.) untersucht. Eine zentrale Methode dieser Arbeit war zudem die Histologie bzw. die Immunhistochemie. Sie umfasste die Verwendung allgemeiner histologischer Analysen mittels H&E-Färbung, fibrosespezifischer Anwendungen wie der Sirius-Rot-Färbung oder z.B. dem Nachweis Desmin-positiver HSCs oder HBsAg-positiver Hepatozyten.

Der Erfolg der KMT wurde mittels des Nachweises GFP-positiver Zellen geführt. Die hepatische Genexpression der Mäuse wurde zusätzlich noch mittels einer Microarray-Analyse auf interessante Muster untersucht.

Durch die Transplantation der gentechnisch markierten Stammzellen, isoliert aus phänotypisch gesunden Mäusen in das HBV-transgene Mausmodell, sollen die Möglichkeit der Rekrutierung von Vorläuferzellen in die Leber sowie deren potenzieller therapeutischer Nutzen im Rahmen der HBV-bedingten Fibrogenese untersucht werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 MAUSLINIEN

2.1.1 Verwendete Mauslinien

Alle Mäuse stammen aus dem zentralen Tierstall der Justus-Liebig-Universität Gießen, ZTL, Frankfurter Str. 125, 35392 Gießen.

Tabelle 1 zeigt die, in den Experimenten untersuchten Stämme.

Mauslinie:	Erklärung:
C57BL/6J-Tg(Alb1HBV)44Bri/J	Ursprüngliche transgene HBV-Mauslinie auf C57BL/6J Basis [171].
BALB/c-Lm	Mauslinie auf BALB/c Basis. Kontrollgruppe (= Littermates). Abkürzung: Lm
BALB/c-Tg(Alb1HBV)	Transgene HBV-Mauslinie auf BALB/c Basis. Abkürzung: Tg
Tx-BALB/c-Lm	Transplantierte Mauslinie auf BALB/c Basis. Transplantierte Kontrollgruppe. Abkürzung: Lm-Tx
Tx-BALB/c-Tg(Alb1HBV)	Transplantierte transgene HBV-Mäuse auf BALB/c Basis. Abkürzung: Tg-Tx
BALB/c-Tg(ACTB-EGFP)1Osb/J	Transgene GFP-Mauslinie auf BALB/c Basis.
CJ.129P2-Abcb4^{tm1Bor}/J	<i>Abcb4</i> -knockout Mauslinie auf BALB/c Basis. Abkürzung: Abcb4^{-/-}

Tabelle 1. Auflistung der in den Experimenten verwendeten Mauslinien. Es wurden Tiere des Stamms BALB/c verwendet.

Die transgenen HBV-Maus Linien wurden von Herrn Prof. Dr. Kurt Reifenberg, Leiter der Zentralen Versuchstiereinrichtung (ZVTE) der Universität Mainz zur Verfügung gestellt. Die Mäuse des ursprünglichen Stamms C57BL/6J-Tg(Alb1HBV)44Bri/J (auf C57BL/6-Basis) entwickeln eine leichte entzündliche Leberfibrose. Diese Inzuchtlinie wurde mittels der Kreuzung von hemizygoten transgenen Männchen auf Weibchen auf C57BL/6-Basis vermehrt. Durch die Rückkreuzung auf den Fibrose-suszeptiblen Stamm BALB/c [184] sollte die Ausprägung der hepatischen Fibrose gesteigert werden. Deshalb wurden Mäuse vom Stamm C57BL/6J-Tg(Alb1HBV)44Bri/J und C57BL/6J-Tg in mindestens 6 Generationen auf BALB/c zurück gekreuzt. Dabei ent-

stand die HBV-transgene Mauslinie BALB/c-Tg(Alb1HBV) (Tg) sowie die Kontrollgruppe BALB/c-Lm (Lm). Die Tg-Mäuse sind nicht infektiös und können unter S1-Bedingungen gehalten werden. Als Kontrollgruppe der Tg wurden Mäuse des Stamms BALB/c-Lm als „Littermates“ (Lm) verwendet. Lm sind Tiere der Kontrollgruppe, die im selben Käfig unter gleichen Bedingungen wie die Experimentalgruppe gehalten werden. Konträr zu der Entwicklung einer hepatischen Fibrose in Tg, tritt bei Lm kein pathologischer Phänotyp auf. Sie eignen sich daher als Gesund-Kontrolle [185]. Die GFP-transgene Mauslinie wurde für die Transplantations-Experimente benötigt. Durch das Einbringen von GFP in die Mäuse, erscheint jedes Gewebe der GFP-transgenen Mäuse, bis auf Erythrozyten und Haarfollikel, unter einem blauen Anregungslicht grün [186].

2.1.2 Knochenmarktransplantation

Für die Untersuchung des Einflusses der Transplantation wurden GFP-Reportgen markierte BALB/c Mäuse verwendet. Diese wurden von Herrn Prof. Dr. Robert Voswinkel aus dem Zentrum für Innere Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Verfügung gestellt. 12 Wochen alte HBV-transgene BALB/c-Mäuse (Tg-Gruppe n = 15, Kontroll-Gruppe n = 5) sowie ihre 12 Wochen alten korrespondierenden Lm wurden mit 11 Gy aus einer ⁶⁰Co-Quelle (in Kooperation mit Dr. Wallbott, Strahlencentrum JLU, Leihgesterner Weg 217, 35392 Gießen, Aktenzeichen: V54-19c 20-15(1) GI 20/10-Nr.10/2008) tödlich Ganzkörper bestrahlt. Danach wurden beiden Gruppen 5×10^6 Donor-KM-Zellen, isoliert aus BALB/c-GFP-transgenen Mäusen, in 0,1 ml Kochsalzlösung (1) mittels einer sterilen 30G Kanüle (2) in die seitliche Schwanzvene injiziert. Dies bewirkte einen weitgehenden Austausch des KM [187]. Die Isolation der KM-Zellen erfolgte durch Ausspülen von hinterem Unter- und Oberschenkelknochen (Tibia und Femur) von 10-12 Wochen alten, männlichen BALB/c-GFP-Reporterger Spendermäusen mit Zellkulturmedium (3). Danach wurden die Zellen vereinzelt, gereinigt und gezählt. Pro Spendermaus konnten mit dieser Methode $5-7 \times 10^7$ BMCs gewonnen werden. KMT- und Kontrollgruppe wurden 14 Wochen bzw. 40 Wochen später getötet († mit 26 bzw. 52 Wochen). Da Donorzellen sowie Empfängerorganismus aus der gleichen Inzuchtlinie stammten (BALB/c), also genetisch identisch waren, handelte es sich um eine syngene KMT.

Geräte/Materialien:

- (1) NaCl 0,9 %, Fa. Braun
- (2) Sterican Kanülen 30G, Fa. B. Braun
- (3) RPMI 1640 # P0418500 + 1 % P30-8100 FCS, Fa. PAN-Biotech, Aidenbach

2.1.3 Probenentnahme und Lagerung

Die Mäuse wurden per CO₂-Inhalation getötet. Alle beteiligten Mitarbeiter waren im Umgang mit den Tieren geschult. Anschließend wurde die Leber exenteriert sowie venöses Blut abgenommen. Die Leberorgane und die Serumproben wurden kurze Zeit später in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.2 KLINISCHE CHEMIE

Die Parameter der klinischen Chemie wurden auf einem Reflotron-Gerät (1) erhoben. Dabei wurden die ALT sowie ALP in den Seren der Mäuse mittels Teststreifen (2) gemessen. Der Strichprobenumfang betrug dabei pro Gruppe mindestens 5 bis 15 Mäuse. Zudem wurden für jede Maus Doppelmessungen durchgeführt und der Mittelwert gebildet.

Geräte/ Materialien:

- (1) Reflotron Plus[®] Analyser, Fa. Roche, Mannheim
- (2) Reflotron[®] Teststreifen: ALT, ALP, Fa. Roche, Mannheim

2.3 HISTOLOGISCHE METHODEN

Teile der Lebern wurden für histologische Fragestellungen entweder in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet oder in ein Einbettmedium zum Kryoschneiden (1) eingebettet und bei -80 °C (2) gelagert.

Geräte/ Materialien:

- (1) Tissue-Tek[®] O.C.T.[™] Compound, # 4583, Fa. Sakura, Leiden, Niederlanden
- (2) Gefrierschrank MDFU 6086S, Fa. Sanyo

2.3.1 Einbettung in Paraffin

Teile der entnommenen Lebern wurden in 1 % Paraformaldehyd (PFA) über Nacht gelagert und in PBS gewaschen. Anschließend wurden sie in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert, in Paraffin eingebettet (1) und mithilfe des Mikrotoms (2) in 3-5 µm feine Scheiben geschnitten. Nach einem kurzen Aufenthalt im Wasserbad (3) bei 40 °C wurden die Schnitte auf einen Objektträger (4) überführt und später bei 40 °C auf einer Heizplatte (5) getrocknet. Gelagert wurden die Objektträger bei Raumtemperatur.

1 % PFA-Lösung: 1 ml 37 % PFA-Lösung (6) in 36 ml Aqua dest. lösen

Geräte/ Materialien:

- (1) Einbett- Maschine EG1140H, Fa. Leica, Wetzlar, Deutschland
- (2) Microtom RM 2165, Fa. Leica, Wetzlar
- (3) Wasserbad H1210, Fa. Leica, Wetzlar
- (4) Objektträger Super Frost Ultraplus, Fa. R. Langenbrinck
- (5) Heizplatte H 1220, Fa. Leica, Wetzlar
- (6) 37 % Paraformaldehyd-Lösung, # 1.03999.1000, Fa. Merck, Darmstadt

2.3.2 Immunhistochemie mit Paraffin

Nach dem ca. 40 – 60 min langen Entparaffinieren der Leberschnitte in einem Trockenschrank (1) bei 60 °C wurden die Objektträger in einer absteigenden Alkoholreihe (3x 10 min Xylol, 2x 5 min 99,6 % Ethanol, 5 min 96 % Ethanol, 5 min 70 % Ethanol (alle aus Apotheke der Universität Gießen)) und zuletzt in 5 min Aqua dest. rehydriert. Nach einem 5 min langen Waschen in PBS (pH 7,4) konnte mit der Antigen-Demaskierung bzw. dem Antigen-Retrieval fortgeführt werden. Beim Antigen-Retrieval wird die teilweise beim Einbetten verlorengegangene Immunreaktivität wiederhergestellt, d.h. Epitope auf den Schnitten werden wieder „freigelegt“. Für die Antigen-Demaskierung mittels Citratpuffer wurden die Schnitte in einer Plastikkuvette in einer Mikrowelle (2) 11x 2 min bei 600 Watt in Citratpuffer erhitzt. Nach dem Abkühlen der Objektträger auf Raumtemperatur wurden sie 10 min lang fließend (unter dem Wasserhahn) gewässert und 2x 5 min mit PBS gewaschen. Um die endogene Peroxidaseaktivität der Leberschnitte zu blockieren wurden sie 10 min lang mit 3 % H₂O₂ (3) (30 % H₂O₂ mit PBS verdünnt) in einer Feuchtkammer behandelt und danach erneut 10 min fließend gewässert. Nach dem 2x 5 min langen Waschen in PBS-Puffer erfolgte das Blockieren bzw. das Absättigen der unspezifischen Bindungsstellen der Schnitte zur besseren Anheftung des Antikörpers an spezifische Strukturen. Dies geschah mithilfe spezieller Kits auf jeden Antikörper abgestimmt, z.B. mit 2,5 % normal horse serum 20 min lang. Nach dem Dekantieren der Objektträger und 5 min langen Waschen mit PBS, erfolgte die Beladung der Schnitte mit dem jeweiligen spezifischen Antikörper in unterschiedlichen Konzentrationen (siehe Tabelle 2) in 10 % bovinen Serum Albumin (BSA) (5) über Nacht bei 4 °C. Anschließend wurde 2x 5 min in PBS gewaschen und die Schnitte mit dem entsprechenden sekundären Antikörper (6), 30 min in der Feuchtkammer inkubiert. Nach 3x 5 min Waschen in PBS, erfolgte das Färben der Schnitte anhand von zwei verschiedenen Substraten (7,8). Die Kontrolle der Reaktion erfolgte laufend unter einem Mikroskop (9). Nun wurde 5 min lang fließend gewässert und ggf. anschließend noch ca. 3 min lang mittels Methylgrün (10) auf einer 60 °C heißen Heiz-

platte (11) gegengefärbt. Nach dreimaligem Spülen mit Aqua dest. wurden die Objektträger in einer aufsteigenden Alkoholreihe (5 min 96 % Ethanol, 2x 5 min Isopropanol, 3x 5 min Xylol) wieder dehydriert. Nach dem Eindecken mit Pertex (12) und Deckplättchen wurden die Objektträger getrocknet. Die histologische Begutachtung erfolgte auf einem Mikroskop der Firma Leica (13).

Verwendete Lösungen:

PBS (10x): 80 g NaCl (14) + 2g KCl (15) + 11,5g Na₂HPO₄ (16) + 2,45 g KH₂HPO₄ (17) wurden erst in 900ml Aqua dest. gelöst und anschließend bis auf ein Gesamtvolumen von 1000 ml mit Aqua dest. aufgefüllt.

PBS (1x): 100 ml der PBS-Stammlösung (10x) wurden in 900 ml Aqua dest. gelöst. Anschließend Titration mit HCl (18) bis pH 7,4

Citratpuffer Ansatz:

Stammlösung A: 21,01g 0,1M Zitronensäure (C₆H₈O₇) (19) mit Aqua dest. auf 1000 ml aufgefüllt. pH 2,1

Stammlösung B: 29,41g 0,1M Trinatriumcitrat-Dihydrat (C₆H₉Na₃O₉) (20) mit Aqua dest. auf 1000 ml aufgefüllt. pH 8,4

Gebrauchslösung: 9 ml Puffer A + 41 ml Puffer B mit Aqua dest. auf 500 ml aufgefüllt. pH 6,0

Geräte/ Materialien:

- (1) Trockenschrank T12, Fa. Heraeus, Hanau
- (2) Mikrowelle, Fa. Alaska
- (3) H₂O₂, #1.07210.1000 Fa. Merck, Darmstadt
- (4) 2,5 % normal horse Serum, Fa. Vector Lab, #S-2012
- (5) BSA, # K41-001-500, Fa. PAA, Pasching, Österreich
- (6) ImmPRESS Reagent Peroxidase Kits, Fa. Vector Lab, #MP-7401 (Anti-Rabbit), #MP-7402 (Anti-Mouse), #MP-7404 (Anti-Rat), #MP-7405 (Anti-Goat), #MP-7444 (Anti-Rat, Mouse adsorbed), M.O.M Kit, # PK-2200
- (7) VECTOR VIP Peroxidase Substrate Kit, Fa. Vector Lab, #Sk-4600
- (8) DAB Peroxidase Substrate Kit, Fa. Vector Lab, #SK-4100
- (9) Mikroskop DMIL, Fa. Leica, Wetzlar
- (10) Vector® Methyl Green Fa. Vector Lab, #H-3402

- (11) Heizplatte H 1220, Fa. Leica, Wetzlar
 - (12) Pertex Eindeckmedium, Fa. Medite, Bergdorf
 - (13) Leitz DMRB Durchlichtmikroskop, #3566, Fa. Leica, Wetzlar
 - (14) NaCl, #31434, Fa. Sigma Aldrich, Steinheim
 - (15) KCl, #6781.3, Fa. Carl Roth, Karlsruhe
 - (16) Na₂HPO₄, #3904.2, Fa. Carl Roth, Karlsruhe
 - (17) KH₂HPO₄, #P030.1, Fa. Carl Roth, Karlsruhe
 - (18) HCl, #84422-12, Fa. Sigma Aldrich, Steinheim
 - (19) Citronensäure, # 1002440500, Fa. Merck, Darmstadt
 - (20) Trinatriumcitrat-Dihydrat, #1.06448.1000, Fa. Merck, Darmstadt
- Pipettenspitzen, Fa. Sarstedt, Nümbrecht
 Reaktionsgefäße Safe Seal, Fa. Sarstedt, Nümbrecht

2.3.3 Sekundärantikörper Immunhistochemie

Gesuchtes Protein	Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller	Katalog Nummer
A6	monoclonal	Ratte	1:50	Direkt von Valentina Factor (NIH, Bethesda, USA) erhalten	
Ck7	monoclonal	Maus	1:100	Chemicon	Mab3226
Ck19	polyclonal	Kaninchen	1:100	Abcam	Ab15463
Desmin	monoclonal	Kaninchen	1:100	Thermo Fisher Scientific	PA1-27003
GFP	polyclonal	Ziege	1:100	Rockland	600-101-215
HBsAg	polyclonal	Ziege	1:50	IMGENEX	IMG-80013
p21	polyclonal	Kaninchen	1:50	Santa Cruz	sc-397
p27	polyclonal	Kaninchen	1:50	Santa Cruz	sc-528
Sox9	polyclonal	Kaninchen	1:50	Santa Cruz	sc-20095

Tabelle 2: In der Immunhistochemie verwendete sekundäre Antikörper und die angewandte Konzentration.

2.3.4 Isotypenkontrolle

Bei jeder immunhistochemischen Färbereihe wurde von Beginn an eine Isotypenkontrolle mitgeführt. Diese diente dazu eine eventuell unspezifische Bindung des Pri-

märantikörpers an Strukturen des Gewebeschnitts aufzudecken. Dazu wurden anstatt des Primärantikörpers, IgG Antikörper aus der gleichen Spezies, z.B. Ziege (1) in der gleichen Konzentration verwendet. Nachfolgend wurden die Gewebeschnitte mit der Isotypenkontrolle exakt gleich wie die eigentliche Versuchsgruppe weiter behandelt. Die Isotypkontrollen fielen durchwegs negativ aus, so dass von keiner unspezifischen Bindung der Primärantikörper ausgegangen werden konnte.

Geräte/Materialien:

- (1) Ziege IgG ChromPure, Fa. Jackson Immuo Research, Suffolk, Uk
- (2) Maus IgG ChromPure, Fa. Jackson Immuo Research, Suffolk, Uk
- (3) Ratte ChromPure, Fa. Jackson Immuo Research, Suffolk, Uk
- (4) Kaninchen ChromPure, Fa. Jackson Immuo Research, Suffolk, Uk

2.3.5 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Um eine allgemeine histologische Untersuchung durchzuführen, wandten wir die am weitesten verbreitete Methode, die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H&E-Färbung) [188] an. Hämatoxylin färbt basophile Strukturen, wie z.B. DNA im Zellkern blau. Eosin hingegen färbt alle acidophilen Strukturen, wie z.B. Zellplasmaproteine rot [189].

Die Proben wurden über Nacht bei 37 °C erwärmt, entparaffiniert sowie in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert (siehe 2.3.2). Anschließend wurden die Objektträger 5 min lang mit Hämalaun-Lösung (1) bedeckt und danach 5 min lang in Leitungswasser gewaschen. Nach dem 1 min langen Bedecken der Objektträger mit Eosin (2) wurde erneut ca. 3-4 min in Leitungswasser gewaschen. Danach wurden die Objektträger in einer aufsteigenden Alkoholreihe (2 min 96 % Ethanol, 2x 5 min Isopropanol, 3x 5 min Xylol) wieder dehydriert. Nach dem Abdecken mit Pertex (3) und Deckplättchen wurden die Objektträger getrocknet und untersucht.

Geräte/ Materialien:

- (1) Hämalaun Sauer nach Mayer, # T865.2, Fa. Carl Roth, Karlsruhe
- (2) 0,5 % Eosin Y, #676607, Fa. Fisher Scientific
- (3) Pertex Eindeckmedium, Fa. Medite, Bergdorf

2.3.6 Sirius-Rot-Färbung

Zur histologischen Darstellung und Beurteilung des Kollagengehalts der Mäuselebern wurden die Präparate mit Sirius-Rot behandelt [190, 191]. Dabei werden Kollagenfa-

tern Typ I spezifisch rot angefärbt. Bei Betrachtung unter polarisiertem Licht kann man die Kollagenfasern als gelbe/rote doppelbrechende Stränge identifizieren.

Die Proben wurden über Nacht bei 37 °C erwärmt, entparaffiniert sowie in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert (siehe 2.3.2). Danach wurden die Präparate für 90 min mit Sirius-Rot-Lösung bedeckt sowie 2x 5 min mit einer 0,5 %igen Essigsäurelösung behandelt. Abschließend erfolgte die Dehydrierung mit einer aufsteigenden Alkoholreihe sowie das Eindecken mit Pertex (siehe 2.3.2).

Verwendete Lösungen:

Sirius-Rot-Lösung: 0,1 g Siriusrot-Farbstoff (1) + 100 ml Pikrinsäure (2), pH: 2,0

Essigsäurelösung: 300 ml Aqua dest. +1,5 ml Essigsäure (3)

Geräte/ Materialien:

(1) Sirius-Rot-Farbstoff, #09400, Fa. Polysciences, Heidelberg

(2) Pikrinsäure, #80456 Fa. Sigma Aldrich, Steinheim

(3) 100 % Essigsäure, #1000631000, Fa. Merck, Darmstadt

2.3.7 Seneszenz-assoziiertes beta-Galaktosidase-Assay

Der Seneszenz-assoziierte beta-Galaktosidase (SABG)-Assay ist der am meisten verwendete Biomarker für die zelluläre Seneszenz. Man vermutet, dass sich die lysosomale, saure β -Galaktosidase spezifisch in seneszenten Zellen anreichert [192]. Man kann eine erhöhte Aktivität an einem blauen zytosolischen Präzipitat in den Zellen erkennen. Verwendet wurden Kryogewebeschnitte, da ein SABG-Assay nur an nativem Gewebe nachgewiesen werden kann. Die Schnitte wurden für 15 min bei Raumtemperatur in SABG-Fixativ fixiert, anschließend 3x in SABG-PBS gewaschen. Nun konnten die Leberschnitte mit der frisch zubereiteten X-gal-Lösung, über Nacht bei 37 °C in einer Feuchtkammer inkubiert werden. Nach drei weiteren SABG-PBS-Waschvorgängen je 1 min wurden die Proben mit einem Medium (1) eingedeckt und im Dunkeln bei 4 °C gelagert.

Verwendete Lösungen:

SABG-Fixativ: 0,5 % Gluteraldehyd (2) in SABG-PBS (pH 7.2)

SABG-PBS: PBS + 1 mM $MgCl_2$ (3), titriert auf pH 6.0 für humane Gewebe

X-Gal-Lösung: 1 mg/ml X- β -gal (4) + 50 μ l/ml 20x Kaliumzyanidlösung + SABG-PBS. Die Lösung wurde frisch angesetzt oder maximal 2 Wochen bei -20 °C aufbewahrt.

20x Kaliumzyanidlösung: 820 mg $K_3Fe(CN)_6$ (5) + 1,05 g $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ (6) auf 25 ml mit PBS auffüllen. Bei 4 °C aufbewahren.

Geräte/Materialien:

- (1) Fluorescent Mounting Medium, #S3023, Fa. Dako, Hamburg
- (2) Gluteraldehyd 25 %, #1.042339, Fa. Merck
- (3) $MgCl_2$, #814733, Fa. Merck
- (4) Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galaktosid (=X- β -gal), Fa. Carl Roth, Karlsruhe
- (5) $K_3Fe(CN)_6$, #1.04973, Fa. Merck
- (6) $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$, #1.04984, Fa. Merck

2.4 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

2.4.1 RNA-Isolierung

Für verschiedene Methoden wie PCR oder Microarray ist es notwendig RNA aus den entnommenen Lebern der Mäuse zu isolieren. Dies führten wir nach Herstellerangaben anhand des RNeasy Mini Kit von Qiagen (1) durch. Für die Isolierung der RNA wurde ein eigens dafür vorgesehener Pipetten-Satz verwendet. Bei dieser Methode der RNA-Isolation, kommt es durch die Verwendung eines Größenfilters nur zur Anreicherung von RNA länger als 200 Nukleotide. Dadurch kommt es zum bevorzugten Ansammeln von *messenger* RNA (mRNA), da andere RNA-Arten wie tRNA kleiner als 200 Nukleotide sind. Von den bei -80 °C aufbewahrten Lebern wurden jeweils 20-25 mg Gewebe abgewogen und in 1,5 ml Eppendorf-Cups auf Trockeneis überführt. Mit 600 μ l eines Lysepuffers (2) wurde die Leber mechanisch homogenisiert (3). Danach wurde das Homogenisat auf die Shredder-Säule übertagen und 2 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Shredders, wurde das Lysat mit 600 μ l 70 % Ribonuklease (RNase)-freiem Ethanol (4) versetzt, gemischt und auf eine Easyspin-Säule (5) übertragen und 15 Sekunden mit 8000 x g zentrifugiert. Dieser Schritt wurde mit dem Verwerfen des Durchflusses zweimal wiederholt, mit ihm wurde die Ausfällung der RNA erreicht. Die Säule wurde in ein neues Auffangröhrchen überführt und mit 700 μ l Waschpuffer RW1 (6) versetzt und erneut 15 Sekunden lang bei 8000 x g zentrifugiert. Ein erneutes Überführen der Easyspin-Säule in ein neues Auffangröhrchen und behandeln mit 500 μ l Waschpuffer RPE (7) folgte. Eine 15 Sekunden lange Zentrifugation bei 8000 x g, das Verwerfen des Durchflusses und eine Wiederholung des vorherigen Schrittes schlossen sich an. Hiermit wurde sichergestellt, dass kein Ethanol die anschließende RNA-Elution stören konnte. Danach wurden die Säulen in neue, in Eis

gelagerte Eppendorf-Cups überführt und die Membran mit 40 µl RNase-freiem Wasser (8) benetzt. Nach 5 min Inkubation wurde noch 1 min bei 8000 x g zentrifugiert um die RNA zu eluieren. Die so gewonnene mRNA wurde nun mit dem Desoxyribonuklease (DNase)-Kit (9) behandelt, dies entfernt potenziell vorhandene DNA. Dafür wurde jedem Eppendorf-Cup mit der in 40 µl Aqua dest. eluierten RNA ein Reaktionsansatz mit 4 µl 10x DNase Turbo Buffer (10) sowie 1 µl Turbo DNase (11) zugefügt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 4,5 µl DNase Inactivation Reagent (12) und einer 5 min langen Inkubation bei Raumtemperatur, wurde 0,5 µl RNase-freies Wasser (8) hinzugefügt und 1,5 min bei 10.000 x g zentrifugiert. Nachdem die Überstände in ein neues Eppendorf-Cup überführt worden waren, wurde mit der photometrischen Quantifizierung (13) der RNA fortgefahren. Jeweils 1 µl der neu gewonnen RNA wurde auf das Nano-Drop-Photometer aufgetragen und bei 260 nm Wellenlänge quantifiziert. Zur Kontrolle der Reinheit der isolierten RNA, wurde das Verhältnis der Absorption bei 260 nm sowie 280 nm bestimmt (A_{260}/A_{280}) [193]. DNA und RNA absorbieren, wegen der in ihnen enthaltenen Nucleinsäuren hauptsächlich ultraviolettes Licht bei 260 nm, verunreinigendes Protein hingegen absorbiert bei 280 nm. Ein A_{260}/A_{280} -Verhältnis von 2.0 gilt als rein für RNA, ein Verhältnis von 1,8 für DNA. Die Konzentration der RNA wurde mit folgender Formel berechnet:

$$C_{RNA} = (A_{260} - A_{LW}) * 40 * V$$

C_{RNA} = RNA Konzentration in µg/ml
 A_{260} = Absorption der Probe bei 260 nm
 A_{LW} = Absorption der Leerwert-Probe bei 260 nm
 40 = Multiplikationsfaktor
 V = Verdünnungsfaktor

Geräte/ Materialien:

- (1) RNeasy Mini Kit, # 74104, Fa. Qiagen, Hilden
- (2) RTL Buffer (Fa. Qiagen) und Mercaptoethanol (Fa. Carl Roth, Karlsruhe) im Verhältnis 1:10
- (3) Homogenizer Ultra Turrax T8, Fa. Ika Werke, Staufen
- (4) Ethanol, Apotheke der Justus Liebig Universität Gießen
- (5) RNeasy Spin Column, Fa. Qiagen, Hilden
- (6) RW1 Buffer, Fa. Qiagen, Hilden
- (7) RPE Buffer, Fa. Qiagen, Hilden
- (8) RNase-freies Wasser. Fa. Qiagen, Hilden

- (9) Turbo DNA-free, Fa. Ambion, # AM 1907, Carlsbad, USA
 - (10) 10x DNase Turbo Buffer, Fa. Ambion, Carlsbad, USA
 - (11) Turbo DNase, Fa. Ambion, Carlsbad, USA
 - (12) DNase Inactivation Reagent, Fa. Ambion Carlsbad, USA
 - (13) Nano Drop ND 1000 Spectrophotometer, Fa. Thermo Scientific
- Pipettenspitzen, Fa. Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße Safe Seal, Fa. Sarstedt, Nümbrecht
RNase-freie Pipettenspitzen mit Filter, Fa. Greiner, Bio-One, Essen

2.4.2 RNA-Agarose-Gel

Bei Anlage eines elektrischen Feldes an Nukleinsäuren, werden diese nach Masse und Konformation aufgetrennt. Bei der Elektrophorese wandern Nukleinsäuren aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatreste zur positiv geladenen Anode. Je größer die Nukleinsäure, desto langsamer wandert sie durch das Agarose-Gel. Nach der Isolierung im vorhergehenden Schritt, wurde die gewonnene RNA noch einer Qualitäts- sowie Quantitätskontrolle mittels eines RNA-Agarose-Gels unterzogen. Die Proben wurden mit Ethidiumbromid versetzt. Ethidiumbromid macht es möglich die RNA-Banden sichtbar zu machen, da es in die RNA interkaliert und unter UV-Licht fluoresziert. Das Agarose-Gel wurde 30 min vor Benutzung gegossen. Dazu wurden Agarose, Aqua dest. sowie MOPS-Puffer (siehe Lösungen) in einer Mikrowelle (1) 3x aufgekocht. Das im MOPS-Puffer enthaltene DECP dient der Inaktivierung von RNasen. Nach dem Abkühlen der Lösung wurde auf einer Heizplatte (2), bei 60 °C unter dem Abzug 11,25 ml Formaldehyd (3) hinzugefügt. Nach einem weiteren Abkühlschritt wurde maximal 30 min später 1x MOPS-Laufpuffer dazugegeben und auf das Polymerisieren des Gels gewartet. Je 1 µl der zu untersuchenden mRNA-Proben wurde in 0,5 ml Eppendorf-Cup mit 1 µl RNA-Lade-Puffer vermischt und für 10 min bei 65 °C in einem Thermomixer (4) denaturiert und sofort auf Eis gestellt. Nach einer kurzen Zentrifugation (5) der Reaktionsgefäße, konnten die Geltaschen mit jeweils 2 µl des RNA-Puffer-Gemischs beladen werden. Die Elektrophorese-Kammer (6) wurde mit 65 V 1 h lang betrieben. Im Anschluss wurden unter UV-Licht, in einer Foto-Kammer (7) die mittels Ethidiumbromid sichtbar gemachte Auftrennung der RNA in 18S und 28S Untereinheiten begutachtet und dokumentiert (siehe Abb. 10). Hierbei konnte auch auf eine eventuelle Verunreinigung der RNA mit DNA geschlossen werden.

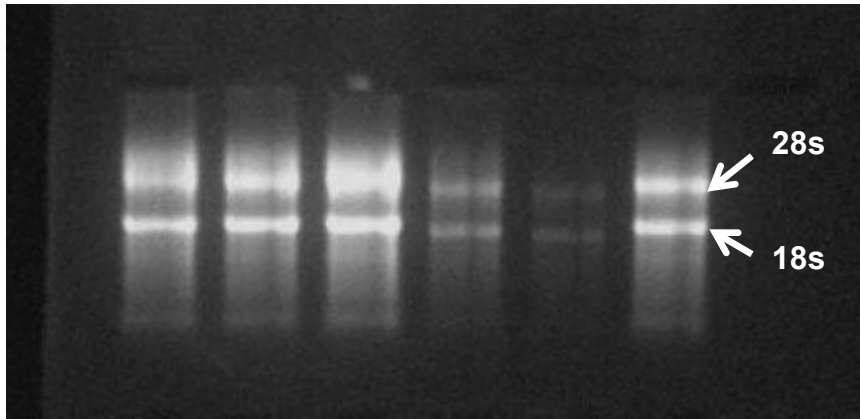


Abb. 10. Auftrennung der mRNA in 28S- und 18S-Fraktion. Ausschnitt aus eigenem, unter UV-Licht erstelltem Bild.

Verwendete Lösungen:

- Gel: 1,2 g Agarose (8) + 123,75 ml Aqua dest +15 ml 10x MOPS
- 10x MOPS: 41,8 g MOPS (9) + 6,8 g NaAc (10) mit DEPC-Wasser auf 1000 ml mit Aqua dest. auffüllen. pH 7,0
- DEPC-Wasser: 1ml DEPC (11) + 999 ml Aqua Dest. über Nacht bei 37 °C im Brutschrank (12) inkubieren. Danach wurde autoklaviert (13)
- 2x RNA-Lade-Puffer: 800 µl 10x MOPS + 1330 µl 6x Puffer RT + 1600 µl Formaldehyd (3)+ 4000 µl Formamid (14)+ 50 µl Ethidiumbromid (15)+ 250 µl DEPC-Wasser auf 10 ml mit Aqua dest. auffüllen.
- 6x Puffer RT: 25mg Bromphenol Blau (16) + 25 mg Xylene Cyanol FF (17) + 1,5 g Ficoll 400 (18) mit Aqua dest. auf 10 ml auffüllen.

Geräte/Materialien:

- (1) Mikrowelle, Fa. Alaska
- (2) Heizplatte H 1220, Fa. Leica, Wetzlar
- (3) 37 % Paraformaldehyd-Lösung, # 1.03999.1000, Fa. Merck, Darmstadt
- (4) Thermomixer 5436, Fa. Eppendorf, Hamburg
- (5) Zentrifuge Mikro 2000, Fa. Hettich, Tuttlingen
- (6) Elektrophorese-Kammer, Fa. Roth, Karlsruhe
Stromversorgung Consort EV243, Fa. Pharmacia Biotech, Cambridge, England
- (7) Infinity2-2, Fa Lumenera Corporation, Ottawa, Canada
- (8) Agarose NEEO, #2267.1, Fa. Merck, Darmstadt

- (9) MOPS 99,5 %, #M1254, Fa. Sigma Aldrich, Steinheim
 - (10) NaAc, #KMF08-319, Fa. KMF, Lohmar
 - (11) DEPC, #298711, Fa. Merck, Darmstadt
 - (12) Brutschrank IG150, Fa. Jouan, Unterhaching
 - (13) Autoklav, Fa. Memmert, Schwabach
 - (14) Formamid, Fa. Sigma Aldrich, Steinheim
 - (15) Ethidiumbromid 1 %, # 2218, Fa. Roth, Karlsruhe
 - (16) Bromphenolblau, #15375, Fa. Serva, Heidelberg
 - (17) Xylene Cyanol, #X4126, Fa. Sigma Aldrich, Steinheim
 - (18) Ficol 400, # F-2637, Fa. Sigma Aldrich, Steinheim
- Pipettenspitzen, Fa. Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße Safe Seal, Fa. Sarstedt, Nümbrecht
RNase-freie Pipettenspitzen mit Filter, Fa. Greiner, Bio-One, Essen

2.4.3 Transkription von mRNA in cDNA

Um die isolierte mRNA in der Polymerase-Kettenreaktion (engl. *Polymerase Chain Reaction*, PCR) weiter untersuchen zu können, muss sie erst revers transkribiert werden. Da die in der PCR verwendete DNA-Polymerase keine RNA als Substrat verwenden kann, wird aus mRNA mittels des Enzyms reverse Transkriptase (RT) sog. *Complementary DNA* (cDNA) synthetisiert. Die RNA, die Vorlage für die Synthese der cDNA, ist schon prozessiert und enthält deshalb keine Introns mehr. Zum Starten der Transkription von mRNA in cDNA benötigt die RT eine Startsequenz, den Primer. Dieser besteht aus einem kurzen, komplementären DNA-Abschnitt welcher sich an den Poly A- Schwanz der RNA bindet. Der Primer gibt folglich den zu amplifizierenden Teil der RNA der zu untersuchenden Probe vor. Mit Kenntnis der Basenabfolge des zu untersuchenden Proteins ist es möglich einen dafür passenden Primer zu konstruieren. Dieser lagert sich dann komplementär an die Proben-RNA an und die RT kann beginnen die entsprechende cDNA zu synthetisieren.

Mit der Konzentrationsbestimmung der RNA der unterschiedlichen Proben im vorhergehenden Schritt (siehe 2.4.1), wurde die für eine End-Konzentration von 1 µg benötigte RNA-Menge berechnet und in 15 µl RNase freiem Wasser (1) gelöst. Die eigentliche reverse Transkription erfolgte mit dem iScript cDNA Synthesis Kit (2).

Jeder Versuchsansatz enthielt pro Reaktion:

5x iScript reaction mix	4 μ l
iScript reverse transcriptase	1 μ l
Nuclease-free water	x μ l
RNA-Vorlage	x μ l
<u>Gesamtvolumen</u>	<u>20μl</u>

Die Versuchsansätze wurden in einem Eppendorf-Cup vermengt und anschließend in einen Thermocycler (3) nach dem iScript Herstellerprotokoll (5 min bei 25 °C, 30 min bei 42 °C, 5 min bei 85 °C) inkubiert. Die spezifische Abfolge der verschiedenen Temperaturstufen ermöglichte erst die Reaktion: 25 °C begünstigt das Anlagern bzw. Hybridisieren des Primers an die RNA-Matrize. In der nachfolgenden 42 °C -Phase wurde die optimale Wirktemperatur der RT erreicht, so dass die reverse Transkription die Synthese der cDNA erfolgen konnte. Durch das kurzzeitige Erhitzen auf 85 °C wurde das Enzym RT denaturiert. Die so gewonnene cDNA konnte nun in der q-PCR verwendet werden.

Geräte/ Materialien:

- (1) RNase freies Wasser, Fa. BIO-Rad, Hercules, USA
 - (2) iScript cDNA Synthesis Kit, Fa. BIO-Rad, # 170-8890, Hercules, USA
 - (3) Thermocycler T3, Fa. Biometra, # 3100-810-10, Göttingen
- Pipettenspitzen, Fa. Sarstedt, Nümbrecht
 Reaktionsgefäße Safe Seal, Fa. Sarstedt, Nümbrecht
 RNase-freie Pipettenspitzen mit Filter, Fa. Greiner, Bio-One, Essen

2.4.4 q-PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (engl. *Real time quantitative polymerase chain reaction*, q-PCR) stellt die bewährteste Methode zur Amplifizierung und Analyse von spezifischen DNA-Abschnitten dar [194]. Die zu vervielfältigenden Teile der DNA werden über sequenzspezifische Startnukleotide, die Primer bestimmt. Die Verlängerung der Primer erfolgt über die Anlagerung bzw. Hybridisierung der Primer an den entsprechenden komplementären DNA-Strang. Die Synthese der DNA, bzw. die Anlagerung und Polymerisation der Desoxyribonukleotide wird durch eine thermostabile Polymerase (hier: Taq-DNA-Polymerase) bei 72 °C (Wirkmaximum des Enzyms) katalysiert.

Nach der Elongation wird auf 95 °C erhitzt um den zu amplifizierenden Abschnitt (die Matrize) sowie die Primer und das neu entstandene Syntheseprodukt wieder voneinander zu trennen (Denaturierung). Die erneute Anlagerung der Primer (Annealing) erfolgt je nach verwendetem Primer mit unterschiedlicher Temperatur, z.B. bei 57 °C. Anschließend wird der Ansatz wieder auf 72 °C erhitzt, so dass sich Matrize, Primer und nun auch die neu entstandenen Syntheseprodukte hybridisieren können um wiederum neue DNA-Amplifikate herzustellen. Mit der wiederholten Abfolge von Annealing, Elongation sowie Denaturierung lassen sich die gewünschten Abschnitte der DNA exponentiell vervielfältigen. Um die Amplifikation der Komplementärstränge zu quantifizieren wird ein DNA-bindender Fluoreszenzfarbstoff (SYBR Green I) verwendet. Dieser lagert sich während der PCR, am Ende der Elongation, in die doppelsträngige DNA ein. Der dabei entstehende Komplex aus Fluoreszenzfarbstoff und DNA hat ein Absorptionsmaximum für blaues Licht bei der Wellenlänge $\lambda_{\text{max}} = 494 \text{ nm}$, bei $\lambda_{\text{max}} = 521 \text{ nm}$ sendet er grünes Licht aus. Die Intensität der Fluoreszenz ist proportional zu der Anzahl an PCR-Produkten. Mit mehreren Zyklen vermehrt sich die Anzahl der DNA-Amplifikate erst exponentiell, danach nur noch linear, bis sie sich einer Sättigungsgrenze annähert. Durch die Messung der Fluoreszenz in der exponentiellen Phase der Zyklen lassen sich quantitative Aussagen über das Vorliegen des gesuchten DNA-Abschnitts treffen. Da die Erfassung der Fluoreszenz in Echtzeit während der PCR-Reaktion erfolgt, spricht man von der *real time* PCR.

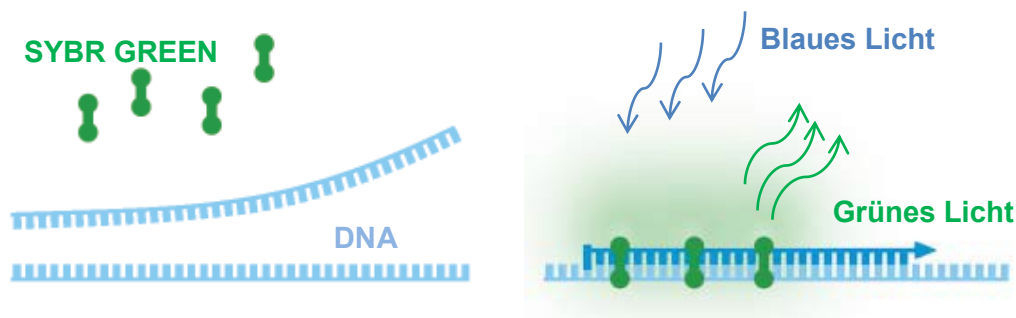


Abb. 11. Prinzip der q-PCR mit SYBR Green. SYBR Green bindet sich an doppelsträngige DNA. Dies geschieht während der Elongation. Bei Beleuchtung mit blauem Licht, emittiert der Komplex aus DNA und SYBR-Green-Fluoreszenzfarbstoff grünes Licht. Da die Intensität der Fluoreszenz proportional zu den doppelsträngigen PCR-Produkten ist, lässt sich die Amplifikation der DNA quantifizieren. Mit freundlicher Genehmigung von Roche®. Modifiziert nach [195].

Das Gesamtvolumen des Versuchsansatzes für jede Probe betrug 12,5 µl und setzte sich wie folgt zusammen:

Versuchsansatz (1x):	
SYBR green Super Mix/ Rox:	6,30 µl
Primer:	1,25 µl
Aqua dest.:	4,45 µl
cDNA	0,50 µl
Gesamtvolumen	12,5 µl

Der SYBR Green qPCR Super Mix (1) besteht u.a. aus: Taq-DNA-Polymerase, dATP, dCTP, dUTP, dGTP, MgCl₂ sowie SYBR Green I. Die verwendeten Primer sowie deren Annealingtemperaturen sind in **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** aufgeführt. In jedem Versuchslauf wurden 2 Negativkontrollen (Versuchsansatz ohne cDNA) mitgemessen. Um etwaige Verunreinigungen oder Pipettierfehler auszugleichen wurde für jeden Primer Doppelmessungen durchgeführt und anschließend die Mittelwerte verwendet. Alle Werte wurden auf die Expression des Housekeeping-Gens 18S rRNA normalisiert und nach der $\Delta\Delta C_t$ -Methode [196] berechnet. Das Gen 18S rRNA wird konstitutiv exprimiert, es ist unabhängig vom Zelltyp oder äußeren Einflüssen und wird daher nicht reguliert. Der Ct-Wert (engl. *Cycle threshold*) beschreibt den Punkt an dem in einer PCR eine Fluoreszenz erstmalig über den Hintergrundwert ansteigt. Dieser Wert liegt im exponentiellen Teil der Fluoreszenzkurve. Der Ct-Wert wird über die Menge der im Versuchsansatz vorliegenden DNA positiv beeinflusst. So lässt sich z.B. mithilfe des Ct-Werte-Vergleichs zweier unterschiedlicher Proben sagen, in welcher Probe vor der Vervielfältigung mehr DNA enthalten war. Durch die Differenz der Ct-Werte des zu messenden Gens sowie des 18S rRNA-Gens, ergab sich der Wert der Vervielfältigung der Genexpression. Am Ende jeder PCR wurde die sog. Schmelzkurve bestimmt. Da jedes in der PCR entstandene Reaktionsprodukt aufgrund seiner individuellen Zusammensetzung einen unterschiedlich frühen oder späten Schmelzpunkt hat (abhängig von der Anzahl der Wasserstoffbindungsbrücken), kann man in der Dissoziationskurve auf eine mögliche Verunreinigung schließen. Bei Eintreten des Schmelzpunktes wird der Fluoreszenzfarbstoff freigesetzt, es kann ein Anstieg der Fluoreszenz registriert werden. Die q-PCR erfolgte in einem Gerät der Firma Roche (2). Die Daten wurden mit Hilfe der Software MXpro (3) ausgewertet. In Abb. 12. Temperaturprofil der PCR., Tabelle 3 zeigt die verwendeten Primer.

Gen	Annealingtemperatur	Hersteller	Katalog #
<i>18s rna</i>	57 °C	Qiagen	QT01036875
<i>Afp</i>	57 °C	Qiagen	QT00174020
<i>Col1a1</i>	57 °C	Qiagen	QT00162204
<i>Ctgf</i>	57 °C	Qiagen	QT00096131
<i>lfn γ</i>	57 °C	Qiagen	QT01038821
<i>Mmp2</i>	57 °C	Qiagen	QT00116116
<i>Mmp7</i>	57 °C	Qiagen	QT00110012
<i>Mmp9</i>	57 °C	Qiagen	QT00108815
<i>Mmp13</i>	57 °C	Qiagen	QT00111104
<i>Spp1</i>	57 °C	Qiagen	QT00157724
<i>Tgf β</i>	57 °C	Qiagen	QT00145250
<i>Timp1</i>	57 °C	Qiagen	QT00996282
<i>Tnf-α</i>	57 °C	Qiagen	QT00104006

Tabelle 3: In der q-PCR verwendete Primer sowie deren Annealingtemperatur.

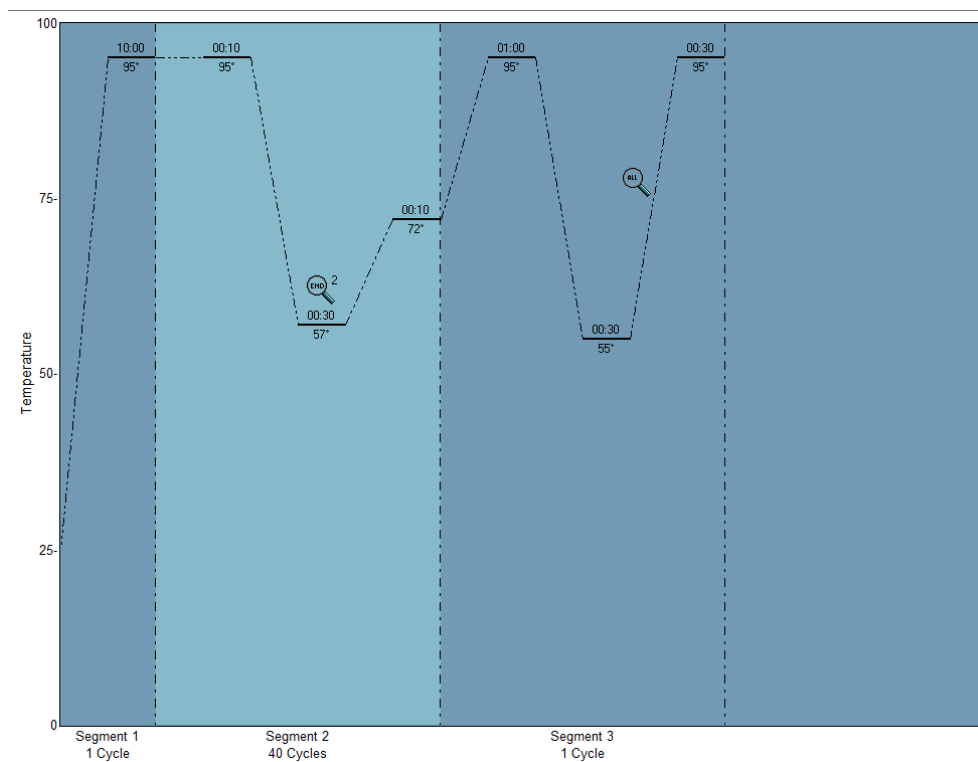


Abb. 12. Temperaturprofil der PCR. Zuerst wurde der Versuchsansatz für 10 min bei 95 °C denaturiert. Nun begann der eigentliche Zyklus mit einer 30 Sekunden langen Phase bei 95 °C zur Auftrennung der Doppelstränge. Bei 57 °C erfolgte für 30 Sekunden das Annealing, die Primer-Hybridisierung. Mit einer 10-sekündigen Phase, in der bei 72 °C die Polymerisation der DNA erfolgte, endete der Zyklus. Diese Abfolge wurde vierzigmal wiederholt. Nach dem Ablauf des letzten Zyklus wurde eine Schmelzkurve generiert. Dabei wurde ausgehend von 55 °C auf 95 °C erhitzt um die Doppelstränge zu trennen und dabei den Fluoreszenzfarbstoff freizusetzen. Bild: Screenshot der Software MXpro (3).

Geräte/ Materialien:

- (1) Platinum SYBR Green qPCR Super Mix, #11733-038, Fa. Invitrogen, Carlsbad, USA
- (2) Multiplex quantitative PCR- System MX 3000P, #401512, Fa. Stratagene, Waldbronn
- (3) MXpro, Fa. Corbett Research, Australien
- PCR Strips, #3418, Fa. Thermo Scientific
- Pipettenspitzen, Fa. Sarstedt, Nümbrecht
- Reaktionsgefäße Safe Seal, Fa. Sarstedt, Nümbrecht
- RNase-freie Pipettenspitzen mit Filter, Fa. Greiner, Bio-One, Essen

2.4.5 Genotypisierung

Um die Mäuse in Kontroll- oder Versuchsgruppe einzuordnen wurde die DNA der Mäuse auf das Vorhandensein des Transgens untersucht. Dafür wurde zuerst aus abgeschnittenen Mäuseschwänzen DNA isoliert und diese anschließend mit Transgenspezifischen Primern in der q-PCR untersucht.

2.4.5.1 Isolation der DNA

Die Aufreinigung der DNA aus Mäuseschwänzen wurde mittels dem DNeasy Blood & Tissue Kit (1) durchgeführt. Nach dem Zusetzen von jeweils 180 µl ATL Puffer (2) sowie 20 µl Proteinase K (3) wurde der Ansatz gevortext (4) und für 24 h bei 56 °C in einem Thermomixer (5) inkubiert. Nach Ende der Inkubation wurden 200 µl AL Puffer (Qiagen) zum Lysieren sowie 200 µl Ethanol (96-100 %) (6) hinzugefügt und alles gut gemischt. Das Gemisch und das Präzipitat wurden danach auf die DNeasy Mini Spin Säulen (7) aufgetragen und anschließend bei 8000 rpm zentrifugiert (8). Nach Entleeren der Collectiontubes (Qiagen) wurde mittels Zugabe von 500 µl AW1 Puffer (9) das Waschen begonnen. Dann erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 8000 rpm für 1 min. Das Zentrifugat wurde verworfen, die Säule mit 500 µl AW2 Puffer (10) beladen sowie für 1 min bei 8000 rpm zentrifugiert. Nach Entfernen der Collectiontubes wurden die Säulen mittels 40 µl Aqua dest. in neue 1,5 ml Eppendorf-Cups eluiert sowie eine Minute bei 8000 rpm zentrifugiert. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

Geräte/ Materialien:

- (1) DNeasy Blood & Tissue Kit, Fa. Qiagen, Hilden # 69506
- (2) ATL Puffer, Fa. Qiagen, Hilden
- (3) Proteinase K, Fa. Qiagen, Hilden

- (4) Vortex Mixer 7-2020, Fa. neoLab, Heidelberg
- (5) Thermomixer 5436, Fa. Eppendorf, Hamburg
- (6) Ethanol 96-100 %, Apotheke der Justus Liebig Universität Gießen
- (7) DNeasy Mini Spin Column, Fa. Qiagen, Hilden
- (8) Zentrifuge Mikro 2000, Fa. Hettich, Tuttlingen
- (9) AW1 Puffer, Qiagen, Hilden
- (10) AW2 Puffer, Qiagen, Hilden
- Pipettenspitzen, Fa. Sarstedt, Nümbrecht
- Reaktionsgefäße Safe Seal, Fa. Sarstedt, Nümbrecht

2.4.5.2 q-PCR mit Alb1-HBV-Primer

Die im vorherigen Schritt gewonnene DNA der Mäuse wurde mittels q-PCR auf die An- bzw. Abwesenheit von Transgen-Kopien im Mausgenom untersucht. Hierbei wurden zwei Primer mit umgekehrt-komplementärer Basenpaarung eingesetzt, welche die jeweiligen Enden des zu amplifizierenden Produkts markierten. Die Primer wurden spezifisch für das Transgen zusammengestellt.

Primer		Sequenz 5´ - 3´	Hersteller
Transgen	Sense	AACATGGAGAACATCACATC	MWG Eurofins
	Antisense	AGCGATAACCAGGACAAGTT	
Interne Positivkontrolle	Sense	ATGTACTGGTCCCGCATGGC	MWG Eurofins
	Antisense	TTTGCAGGACTCCTACCGGG	

Tabelle 4. In der Genotypisierung verwendete Primer. Alle Primer wurden mit einer Annealingtemperatur von 57 °C verwendet.

Die q-PCR-Läufe wurden mit dem Programm MXpro (1) mit folgendem Temperaturprofil und Versuchsansätzen auf einem Gerät der Firma Stratagene (2) durchgeführt:

Versuchsansatz (1x):		Temperaturprofil:	
SYBR green Super Mix/ Rox (3):	12,6 µl	95 °C - 3 min	
Sense Primer:	0,3 µl	95 °C - 30 Sekunden	
Antisense-Primer	0,3 µl	57 °C - 30 Sekunden	
Aqua dest.:	10,8 µl	40x Zyklen	
DNA	1,0 µl	72 °C - 30 Sekunden	
Gesamtvolumen	25 µl	72 °C - 3 min	

In der DNA-Gelelektrophorese wurden die Syntheseprodukte der PCR, darunter mögliche Transgen-Kopien, der Größe nach aufgetrennt und mit Ethidiumbromid (4) sichtbar gemacht. Im Anschluss der PCR wurde die amplifizierte DNA mit 6x Probenpuffer (5) versetzt und zur Analyse im 1,5 %igen Agarose-Gel (6) in 1x TAE-Puffer (7) mit einer Ethidiumbromidkonzentration von 60 ng/ml elektrophoretisch aufgetrennt. Zusätzlich wurde ein Größenstandard (8) mitaufgetragen. Anhand des Standards war es möglich die Größe der Syntheseprodukte abzuschätzen. Die erwartete Basenlänge der Syntheseprodukte beträgt für das Transgen 223 bp und für die interne Positivkontrolle 113 bp. Die Detektion der Banden erfolgte unter UV-Licht (9). Das Produkt der Positivkontrolle musste in jeder Probe nachweisbar sein. Zusätzlich wurde in jedem Lauf eine Negativkontrolle mit Aqua dest. anstatt DNA mitgeführt.

Geräte/Materialien:

- (1) MXpro, Fa. Corbett Research, Australien
- (2) Multiplex quantitative PCR-System MX 3000P, #401512, Fa. Stratagene, Waldbronn
- (3) Platinum SYBR Green qPCR Super Mix, #11733-038, Fa. Invitrogen, Carlsbad, USA
- (4) Ethidiumbromid 1 %, # 2218, Fa. Roth, Karlsruhe
- (5) 6x Probenpuffer, # R0611, Fa. Thermo Scientific
- (6) Agarose NEE0, #2267.1, Fa. Merck, Darmstadt
- (7) UltraPure™ DNA Typing Grade® 50X TAE Buffer, Fa. Gibco, Zug, Schweiz
- (8) Gene Ruler DNA Ladder Mix, # SM0334, Fa. Thermo Scientific
- (9) Infinity2-2, Fa Lumenera Corporation, Ottawa, Canada

2.4.6 Microarray

Mit Hilfe von Microarray-Analysen lassen sich Aussagen über die differentielle Genexpression einer großen Anzahl von Genen treffen. Mit dem verwendeten Microarray-Chip der Firma Agilent (5) kann das gesamte Maus-Genom untersucht werden. Auf einem Chip können bis zu 4 verschiedene Proben mit je 44 000 Spots analysiert werden. In jedem Spot befindet sich eine Sequenz aus 60 Nukleotiden, die in einem speziellen Verfahren auf einen Glasträger gedruckt werden. Generell benötigt eine Genexpressions-Analyse mit einem Microarray-Chip mehrere Schritte:

1. Gewinnung von RNA aus Probenmaterial.
2. (indirektes) Markieren bzw. Labeln der cRNA mit Fluoreszenz-Nukleotiden.
3. Fragmentieren der cRNA.
4. Hybridisieren der cRNA auf den Microarray-Chip.
5. Auslesen und Auswertung des Microarray-Chips.

Die Microarray Experimente wurden mittels einer Zwei-Farben-Hybridisation durchgeführt. Um Färbungs-spezifische Effekte zu kompensieren wurde die Färbung gegenseitig getauscht. Die Gewinnung der RNA der 4 Mäuse-Gruppen (Lm, Tg, Lm-Tx, Tg-Tx) wurde mit der TRIzol-Reagent-RNA-Aufbereitungsmethode (1) durchgeführt. Die Qualität und Quantität der gewonnenen RNA wurde mit Hilfe von einem Agilent 2100 Bioanalytiker (2) und einem Spectrophotometer (3) kontrolliert. Das RNA-Labeling wurde mit dem Low RNA Input Fluorescent Linear Amplification Kit (4) durchgeführt. Während dieses Vorgangs wurden mittels der T7 RNA-Polymerase, in die neu synthetisierte cRNA, spezielle mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Cyanin) markierte Nukleotide eingebaut. Nach der Präzipitation, Aufreinigung und Quantifizierung wurden 1,25 µg der gelabelten cRNA fragmentiert. Dies diente der Optimierung der Hybridisierungskinetik, da kürzere Fragmente (zwischen 50 bis 200 Basen lang) besser an den Microarray-Chip binden können. Nun konnte die fragmentierte cRNA nach Herstellerangaben 17 Stunden lang bei 65 °C auf das 44k Mäuse-Genom-Microarray (5) hybridisiert werden. Das Scannen der Microarray-Chips erfolgte mit einer Auflösung von 5 µm mittels eines DNA-Microarray-Laserscanners (6). Danach wurden die noch nicht verarbeiteten Microarray-Bilddaten mit einer Bild-Analyse-Software (7) untersucht. Die extrahierten MAGE-ML-Dateien wurden mit der Rosetta Resolver Biosoftware (8) analysiert. Die Verhältnis-Profile der einzelnen Hybridisationen wurden fehlergewichtet kombiniert um Verhältnis-Experimente durchzuführen. Ein Cut-off von einem 1,5x Fold Change zusammen mit einer Antikorrelation der Verhältnis-Profile wurde auf die Experimente angewandt. Dadurch wurde eine hohe Signifikanz ($p < 0,01$) erreicht. Die hier präsentierten Daten wurden in der Datenbank des NCBI Gene Expression Omnibus (GEO; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>) gespeichert und sind über die Accession-Nummer GSE40826 zu erreichen.

Geräte/Materialien:

- (1) TRIzol® Reagent, # 15596026, Fa. Invitrogen
- (2) Agilent 2100 Bioanalytiker, Fa. Agilent Technologies
- (3) NanoDrop 1000 Spectrophotometer, Fa. Kisker
- (4) Low RNA Input Fluorescent Linear Amplification Kit, Fa. Agilent Technologies

- (5) Whole Mouse Genome Microarray Kit 4x44K, # G4122F, Fa. Agilent Technologies
- (6) GSI Lumonics Scanarray 3000, Fa. Agilent Technologies
- (7) Image Analysis/Feature Extraction software G2567AA, Version A.9.5.1, Fa. Agilent
- (8) Rosetta Resolver Biosoftware, Version 6.1, Fa. Rosetta Biosoftware

2.4.7 Hydroxyprolin-Assay

Hydroxyprolin (Hyp) entsteht durch Hydroxylierung der im Kollagen vorkommenden Aminosäure Prolin. Mittels Säurehydrolyse kann man den Hyp-Gehalt von organischen Gewebeproben bestimmen und so rechnerisch auf den Gesamtkollagengehalt schließen. Das ursprüngliche Verfahren nach Woessner [197] wurde, um Proben mit niedrigem Hyp-Gehalt ausreichend zu erfassen nach Stegemann und Stalder [198] modifiziert. Die Proben wurden in Anwesenheit von hochkonzentrierter Säure bei 110 °C hydrolysiert. So wurden vorhandene Proteine in Ihre Aminosäuren zerlegt. Nachfolgend wurde eine für die Aminosäure Hyp spezifische Färbereaktion angewandt. Die Oxidation des Hyps durch Chloramin-T sowie die Bildung eines Chromophors mit Hilfe von Ehrlich-Reagenz (4-Dimethylaminobenzaldehyd), ist die Grundlage der photometrischen Messung des Hyp-Gehalts. Mit einer kolometrischen Messung durch ein Photometer (Extinktion bei 565 nm) konnte anschließend der Gehalt an Kollagen errechnet werden. Jeweils 50 mg Mäuseleber wurden in 1 ml 6N HCL (1) (Volumen der Einwaa-ge angepasst) gelöst und mechanisch homogenisiert (2). Nach 16 h Inkubation bei 110 °C im Trockenschrank (3) wurde 5 min bei 14000 rpm zentrifugiert (4) und anschließend das Homogenisat mit einem Spritzen-Filter gefiltert (5). Aus dem Überstand wurden 2x 15 µl (zweifache Messung pro Maus) in ein 1,5 ml Eppendorf-Cup pipettiert, dabei entspricht 15 µl gleich 0,75 mg Lebergewebe. Es erfolgte die Zugabe von 15 µl Ethanol (6), anschließend wurden die Proben 15 min lang unter Stickstoff bei 55 °C eingengt. Für die kolometrische Messung war es notwendig mehrere Standards mit einer genau definierten Menge (640 ng/ 50 µl, 320 ng/ 50 µl, 160 ng/ 50 µl, 80 ng / 50 µl, 40 ng/ 50 µl) an Hyp herzustellen. Dazu wurde 50 % Isopropanol (7) mit einer Stammlösung aus in 50 % Isopropanol gelöstem Hyp (8) (100 µg Hyp/ ml) so vermengt, dass oben genannte Konzentrationen entstanden. Eine zusätzliche Leerprobe diente als Negativkontrolle. Proben, Leerprobe sowie Standards wurden gleich behandelt. Nach dem Einengen unter Stickstoff wurde das Kristallat in 50 µl 50 % Isopropanol gelöst und mit dem Vortexer (9) gemischt. Für den folgenden Schritt wurden mehrere Lösungen benötigt: Puffer A, Puffer B und 0,6 % Chloramin-T Lösung sowie Ehrlich-Reagenz-Lösung. Durch Zugabe von jeweils 100 µl 0,6 % Chloramin-T Lösung in 50 µl Hyp-Standard und 50 µl Proben wurde die spezifische Färbung von Hyp in Gang

gesetzt. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden 100 µl frisch zubereitete Ehrlich-Reagenz-Lösung zum Ansatz hinzugefügt. Danach wurde erneut mit dem Vortexer gemischt und bei 50 °C 45 min inkubiert. In diesem letzten Schritt läuft, abhängig vom Hyp-Gehalt die Farbreaktion ab. Nun konnte im Elisa-Reader (10) die Absorption bei 570 nm Wellenlänge gegen die Leerprobe gemessen werden. Jede Probe wurde zweimal gemessen, es wurde Mittelwert der Adsorptionen verwendet. Die Berechnung des Hyp-Gehalts konnte mit folgender Formel erfolgen:

$$A / K \times F = C_{\text{Hyp}}$$

$C_{\text{Hyp}} = \mu\text{g Hyp/ g Leber}$
 A = Adsorption der jeweiligen Probe
 K = Regressionskoeffizient der Standardkurve
 F = Verdünnungsfaktor (hier 1,33)

Verwendete Lösungen:

Puffer A:	3,4 g NaOH (11)+ 3,4 g Zitronensäure-Monohydrat (12) + 12 g Natriumacetat-Trihydrat (13) auf 100 ml Aqua dest. aufgefüllt
Puffer B:	60 ml Isopropanol + 33 ml Aqua dest. + 39 ml Puffer A
0,6 % Chloramin-T Lösung:	300 mg Chloramin T (14) + 50 ml Puffer B
Ehrlich-Reagenz-Lösung:	3 g Ehrlich-Reagenz (15) + 26 ml Isopropanol + 8 ml 50 % Perchlorsäure (16).

Geräte/ Materialien:

- (1) HCl, #84422-12, Fa. Sigma Aldrich, Steinheim
- (2) Homogenizer Ultra Turrax T8, Ika Werke, Staufen
- (3) Trockenschrank T12, Fa. Heraeus, Hanau
- (4) Zentrifuge Mikro 200R, Fa. Hettich, Tuttlingen
- (5) Minisart SRP 4, #17820, Fa. Sartorius
- (6) Ethanol, Apotheke der Justus Liebig Universität Gießen
- (7) Isopropanol, Apotheke der Justus Liebig Universität Gießen
- (8) L-4-Hydroxyprolin, # H5,440-9, Fa. Sigma Aldrich, Steinheim
- (9) Vortex Mixer 7-2020, Fa. neoLab, Heidelberg
- (10) Microplate ELISA-Reader Fusion, Fa. HP
- (11) NaOH, #1.06498.1000, Fa. Merck, Darmstadt

- (12) Zitronensäure-Monohydrat, # 1002440500, Fa. Merck, Darmstadt
 - (13) Natriumacetat-Trihydrat, # 1062655000, Fa. Merck, Darmstadt
 - (14) Chloramin T-Trihydrat, #1.024260250, Fa. Merck, Darmstadt
 - (15) Ehrlich Reagenz, #803057, Fa. Merck, Darmstadt
 - (16) Perchlorsäure, #30775, Fa. Sigma Aldrich, Steinheim
- Pipettenspitzen, Fa. Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße Safe Seal, Fa. Sarstedt, Nümbrecht

2.5 STATISTISCHE AUSWERTUNG

Die statistische Auswertung und deren graphische Darstellung erfolgte mit dem Programm SPSS Version 20.0 (SPSS Inc., Chicago, USA). Die Stichprobenanzahl in den einzelnen Messungen sowie in den histologischen Analysen betrug $n = 5-15$. Mittels des Mann-Whitney-U-Tests für unabhängige Stichproben wurde auf Signifikanz der einzelnen Subgruppen getestet. Ein $p < 0,05$ wurde dabei als signifikanter Unterschied definiert. P-Werte $< 0,01$ galten als hoch-signifikant unterschiedlich. Die graphische Darstellung der Signifikanzen erfolgte für $p < 0,05$ mit *, bzw. für $p < 0,01$ mit **. Die Ergebnisse sind als weiße Balkendiagramme des Mittelwerts für Lm bzw. Lm-Tx und als graue Balken für Tg bzw. Tg-Tx dargestellt. Zusätzlich sind die Balken der Tx-gruppe schwarz schraffiert. Der Fehlerbalken entspricht dem einfachen Standardfehler (± 1 SE). Die Ergebnisse der q-PCR Microarray-Analyse wurden als Fold Change dargestellt. Der Fold Change (= x-fache Änderung) trifft eine quantitative Aussage über die Genexpressionen. Er wird positiv wenn die Transkription eines Gens in einer Gruppe (z.B. der Experimentalgruppe) höher liegt als in einer anderen (z.B. der Kontrollgruppe). Dies gilt analog für einen negativen Fold Change, die Transkription des betreffenden Gens ist demnach niedriger als in der Vergleichsgruppe.

3 ERGEBNISSE

3.1 Knochenmarktransplantation in HBV-transgenen Mäusen

3.1.1 Hepatische Schädigung

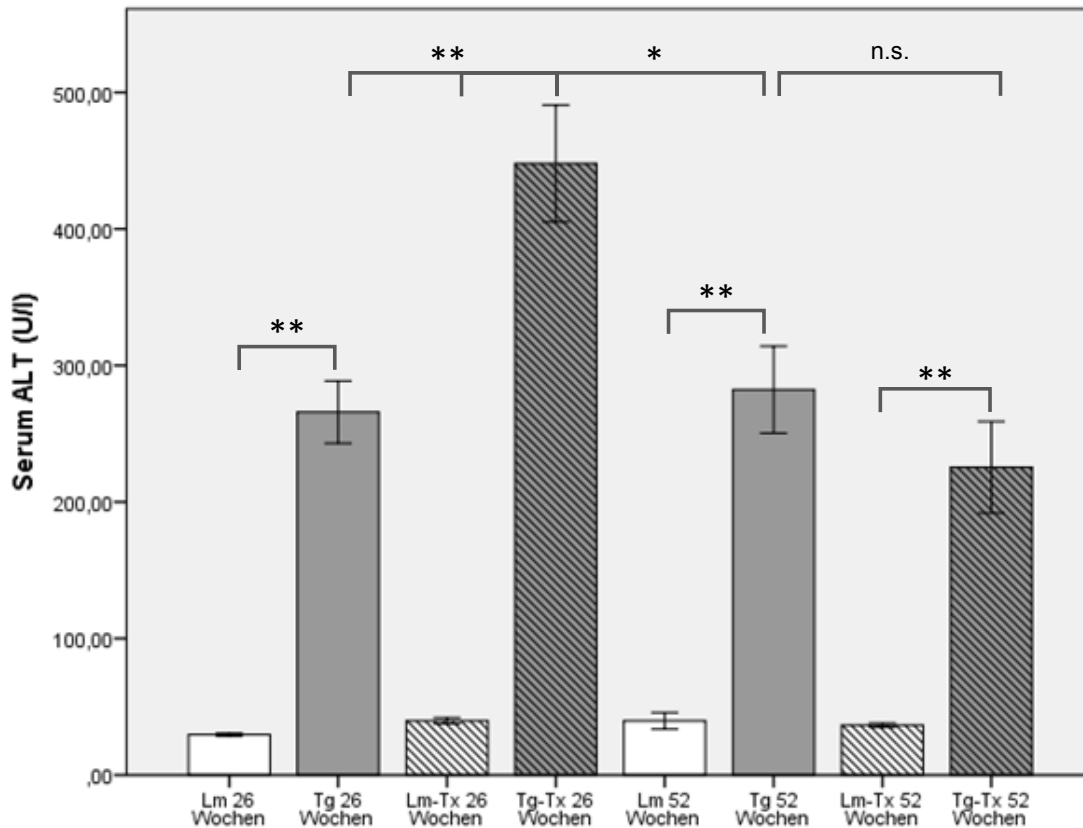


Abb. 13. Erfassung des Leberschadens mittels Serum-Alt. 26 Wochen alte Tg-Tx Mäuse wiesen die höchste Aktivität der ALT im Serum und somit den signifikant höchsten hepatozellulären Schaden auf. Tg und Tg-Tx zeigten zu jeder Zeit eine signifikant höhere Aktivität der ALT als Lm oder Lm-Tx. Vergleich der Mittelwerte der Aktivität der Serum ALT. n = 5-15

Um einen allgemeinen Leberschaden zu quantifizieren wurde die Aktivität der Alanin-Aminotransferase (ALT bzw. ALAT, GPT) im Serum der Mäuse gemessen (siehe Abb. 13). Die Höhe der ALT ist der sensitivste Serummarker einer hepatozellulären Schädigung [199]. Es zeigten sich in den transgenen (Tg) bzw. transgen-transplantierten (Tg-Tx) Mäusen, durchgängig signifikant erhöhte Werte gegenüber den littermate (Lm) bzw. littermate-transplantierten (Lm-Tx) Mäusen. Die Tg- und Tg-Tx-Tiere entwickelten somit einen deutlichen Leberzellschaden. Im Alter von 26 Wochen bestand dieser Zusammenhang auch für die Gegenüberstellung von Tg und Tg-Tx: Tg-Tx wiesen einen hoch signifikant gestiegenen ALT-Wert gegenüber Tg (und Lm) auf. Mit höherem Alter

(52 Wochen) bzw. mit längerer Zeit nach der Transplantation nivellierte sich dieser Unterschied. Überraschenderweise konnten wir demnach feststellen, dass die Knochenmarktransplantation (KMT) in Tg zu einer Aggravation der hepatischen Schädigung führt. Dem entgegengesetzt leiden Tg-Tx-Mäuse im Alter von 52 Wochen unter einem weniger starken Untergang von Hepatozyten. Um einen Einblick in die allgemeine Histologie der Leber zu erlangen, führten wir als nächstes eine H&E-Färbung durch.

3.1.2 Histologische Analyse

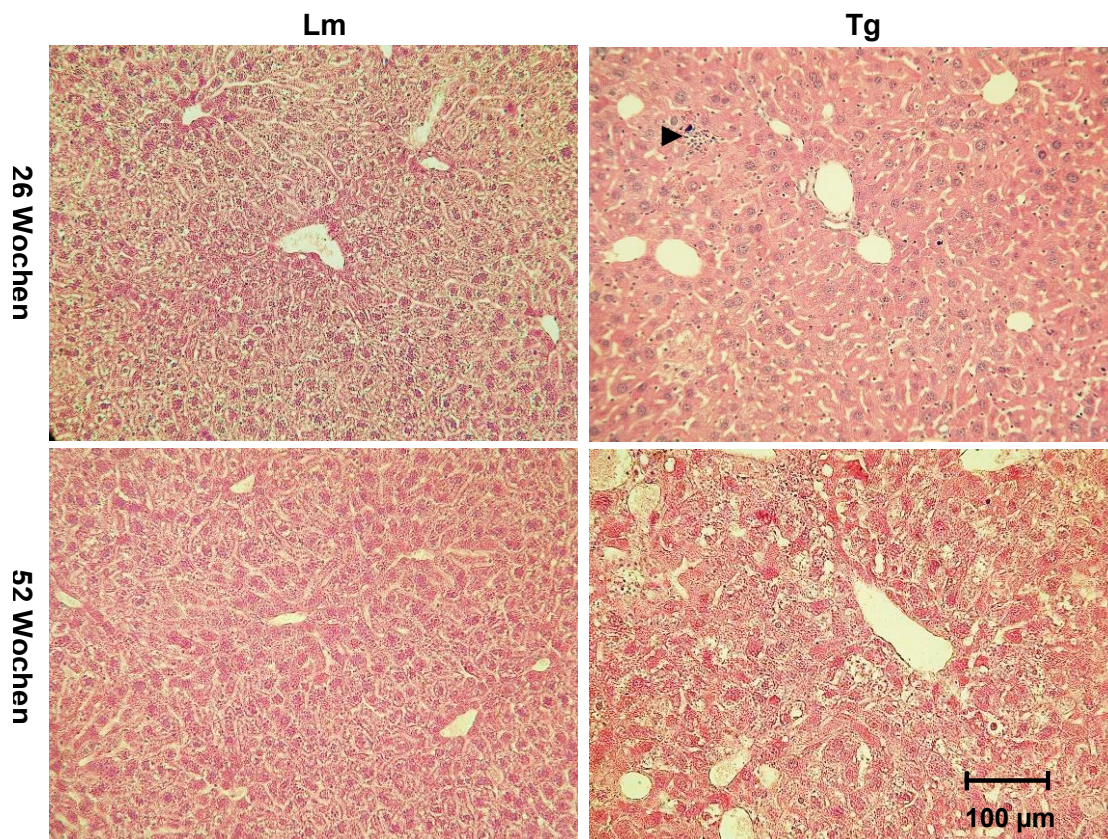


Abb. 14. Histologische Untersuchung der Lm- und Tg-Mäuse. Lm (links) zeigten kaum lymphozytäre Infiltration, bei ansonsten physiologischer Gewebestruktur. In den Tg-Mäusen (rechts) fielen eine portal vermehrte Leukozyteninfiltration (▶) sowie eine Schädigung des Parenchyms mit Beeinträchtigung der Morphologie auf. H&E-Färbung.

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H&E-Färbung) ist die wichtigste und am häufigsten verwendete Färbemethode für die Unterscheidung verschiedener Gewebestrukturen in morphologischen Untersuchungen [188]. Lm zeigten eine physiologische Gewebestruktur und normale Zellgröße, bei vereinzeltm Auftreten von Lymphozyten (siehe Abb. 14). In Tg fielen eine entzündliche, portal vermehrte Leukozyteninfiltration (▶) sowie eine leichte hepatozelluläre Schädigung auf. Die Leukozyten lagen solitär, je-

doch auch in Gruppen angeordnet vor. Das Ausmaß der entzündlichen Aktivität war bei jüngeren Tg (26 Wochen) höher als bei älteren Tg. Bei 52 Wochen alten Tg fand sich eine schwerwiegendere Störung des histologischen Aufbaus als bei 26 Wochen alten Tg. Die Hepatozyten der Tg-Gruppe waren auffällig größer als die der Kontrollgruppe und zeigten interessanterweise Merkmale des sog. *Large liver cell change* (LLCC) [200]. Dazu gehören neben der Vergrößerung der Zelle, ein nukleärer Pleomorphismus mit Hyperchromasie sowie mehrere Kerne. In der pathologischen Untersuchung ergaben sich nach Desmet et al. [201] für Tg im Alter von 26 Wochen ein Grading (Ausmaß der entzündlichen Aktivität) von 1 und ein Staging (Architektur und Fasergehalt) von 0. Die Kontrollgruppe erzielte einen Wert von Grading und Staging 0.

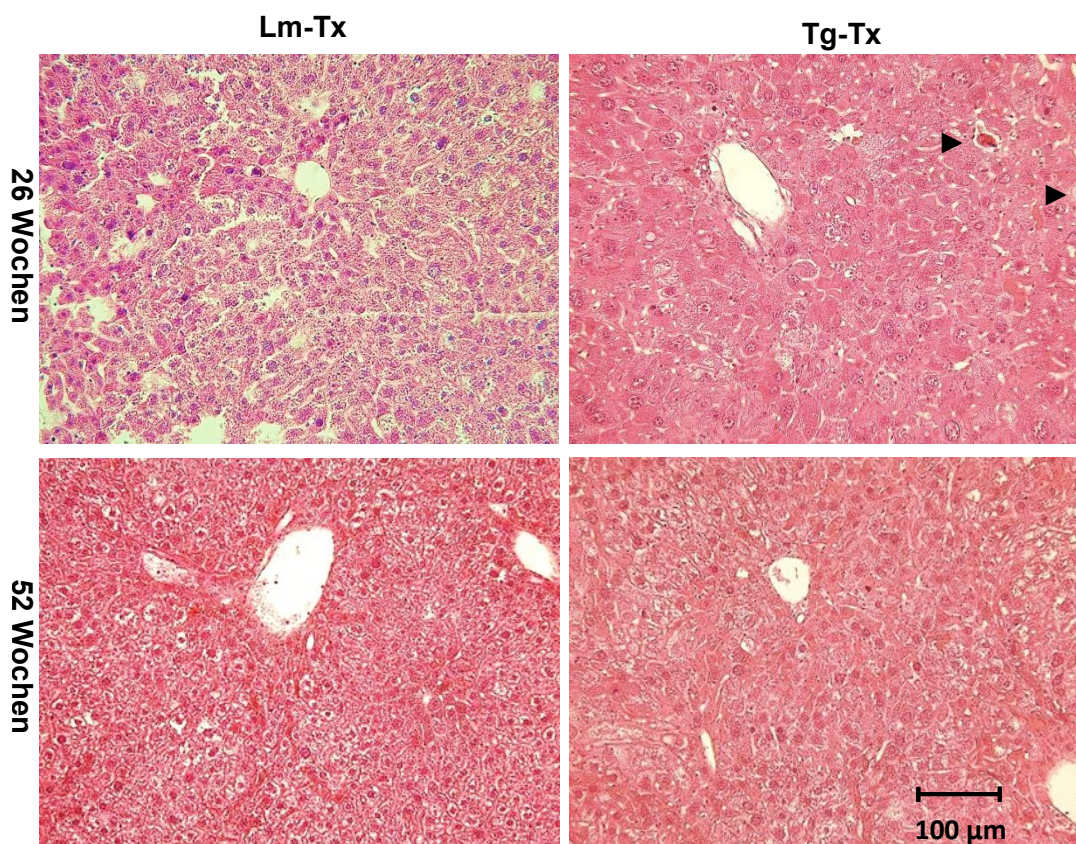
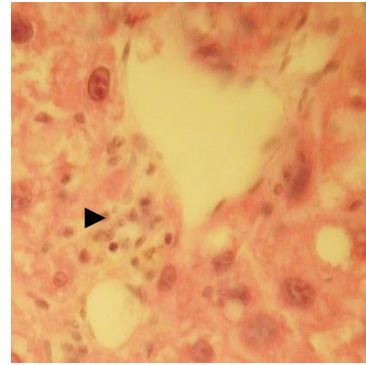


Abb. 15. Histologische Untersuchung der Lm-Tx und Tg-Tx Mäuse. Lm-Tx-Mäuse (links) zeigten auch nach KMT eine unauffällige Morphologie. In Tg-Tx (rechts) fand man einen verstärkten hepatozellulären Schaden mit apoptotischen Hepatozyten bzw. Councilman-Körperchen (►) sowie einer entzündlichen Infiltration. H&E-Färbung.

Lm zeigten, auch nach KMT, eine physiologische Histologie und normale Zellgröße bei vereinzeltm Auftreten von Leukozyten (siehe Abb. 15). In Tg-Tx fielen eine starke Zellschädigung mit konsekutiver Störung des histologischen Aufbaus der Leber sowie ein Einwandern von Entzündungszellen ins Gewebe auf. Die Leukozyten lagen, wie zuvor bei den nicht transplantierten Tieren beobachtet, einzeln jedoch auch als An-

sammlung portal betont vor. Histopathologisch betrachtet, kam es periportal zu dem größten Schaden. Die dort verlaufenden Strukturen (interlobulärer Gallengang, Arteria interlobularis, Vena interlobularis) wurden durch die lymphozytäre Infiltration und die veränderte Morphologie in ihrer Funktion beeinträchtigt. So konnte man portal eine intracanaliculäre sowie v.a. intrazelluläre Cholestase er-



kennen (siehe Abb. 16). Die Zellschädigung wurde unter anderem in dem Auftreten von sog. Councilman-Körperchen (siehe Abb. 15 ►) sichtbar. Diese stellen eosinophile, apoptotische Hepatozyten dar, welche oftmals in viralen Hepatitiden zu finden sind. Das Ausmaß

Abb. 16. Ausschnitt portale Zone aus 52 Wo Tg-Tx.

► Gallepigment weist auf Cholestase hin. H&E-Färbung.

der Größenunterschiede zwischen den einzelnen Hepatozyten, nahm durch die KMT in Tg zu. So fanden sich in Tg-Tx einzelne stark „ballionierte“ Zellen. Entgegen den Ergebnissen der transgenen Gruppe, nahm das Ausmaß der Schädigung der Tg-Tx-Gruppe mit dem Alter leicht ab. Für Tg-Tx-Mäuse im Alter von 26 Wochen ergaben sich nach Desmet et al. [201] ein Staging von 2 und ein Grading von 1. Demnach konnten wir feststellen, dass durch die KMT in Tg keine Amelioration der hepatischen Fibrose bzw. Schädigung herbeigeführt werden konnte, sondern es im Gegenteil zu einer Exazerbation schädigender Prozesse kam. Bei einem histologischen sowie klinischen Vergleich mit anderen Krankheitsbildern, ließen sich Analogien zu der fibrosierenden cholestatischen Hepatitis (FCH) erkennen. Von den histopathologischen Veränderungen die im Rahmen einer FCH auftreten können [112], fanden wir in der Tg-Tx-Gruppe gleich mehrere: ballionierte Hepatozyten, periportale Inflammation und periportale Fibrose sowie eine diskrete Cholestase.

3.1.3 Schädigung der Gallengänge in Tg-Tx-Mäusen

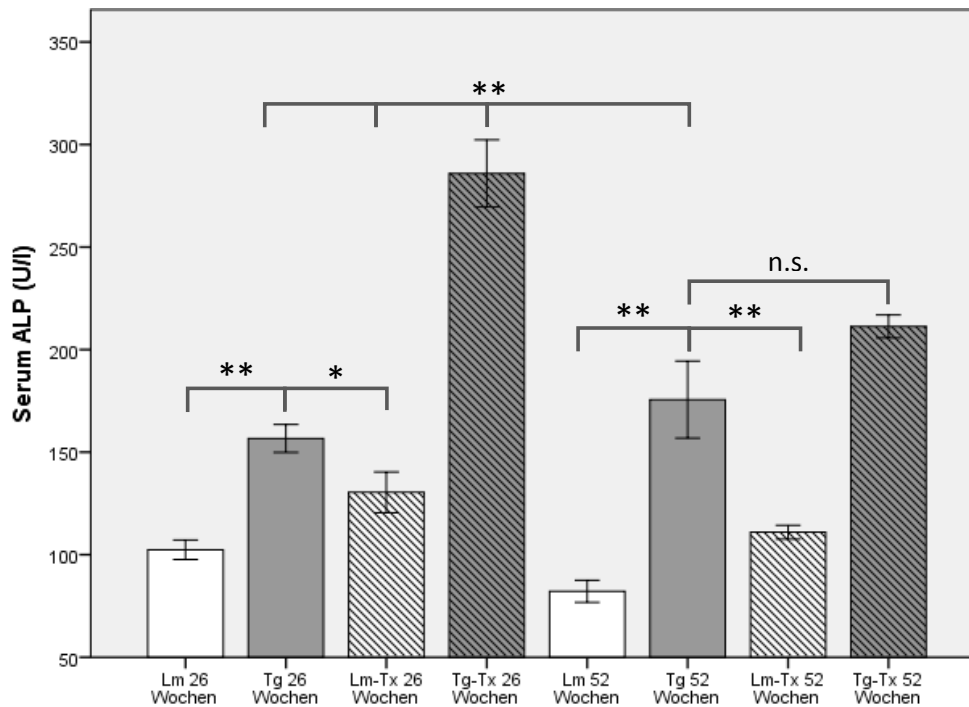


Abb. 17. Hoch signifikante Elevation der AP in Tg. Die KMT bewirkte in Tg Mäusen einen weiteren Anstieg der Cholestaseparameter im Vergleich zu Tg. In Tg-Tx ließen sich die höchsten AP-Werte und somit die schwerwiegendste Gallengangsschädigung finden. Lm- sowie Lm-Tx-Mäuse zeigten signifikant niedrigere Werte der AP. Vergleich der Mittelwerte der Alkalischen-Phosphatase im Serum der Mäuse. Stichprobenumfang n = 5 -15.

Um die zuvor festgestellte Cholestase zu verifizieren und quantifizieren wurde die Aktivität der alkalischen Phosphatase (AP) gemessen. Die AP wird in verschiedenen Organen wie dem Skelettsystem oder der Leber gebildet. Ein erhöhter Wert spricht z.B. für einen Hyperparathyreoidismus oder eine hepatobiliäre Schädigung. Giannini et. al [199] berichten, dass einem Anstieg der Aktivität der Leber-AP, eine Elevation der Gallensäuren voraus gehe. Die Höhe der AP-Werte der Kontrollgruppe lag zu allen Zeitpunkten unter dem Wert der Versuchsgruppe (siehe Abb. 17). Tg hatten gegenüber Lm signifikant höhere Werte. Durch die KMT kam es zu einem steilen Anstieg der AP in Tg. Die AP war in 26 Wochen alten Tg-Tx gegenüber Tg signifikant erhöht. Dieser Unterschied (Tg vs. Tg-Tx) war im Alter von 52 Wochen nicht mehr feststellbar. Wie schon bei der Messung der ALT festgestellt werden konnte, führte die KMT in Tg zu einer hepatischen Schädigung. Die signifikant erhöhten AP-Werte, besonders kurze Zeit nach der KMT (in 26 Wochen alten Tg-Tx-Mäuse, 14 Wochen nach der Transplantation), betonten dabei die biliäre Komponente des pathologischen Prozesses. Die erhöhten Werte der ALT und AP sowie die in der histologischen Analyse festgestellte portal betonte Schädigung und Inflammation unterstreichen eine durch die KMT ausge-

löste hepatobiliäre Pathogenese. Eine mögliche AP-Erhöhung durch eine Pathologie des Skelettsystems war differenzialdiagnostisch unwahrscheinlich.

3.1.4 Expression von HBV-Oberflächenproteinen

Die Grundlage des verwendeten Tiermodelles beruht auf, in das Genom von phänotypisch gesunden BALB/c-Mäusen, gentechnisch eingeschleusten subgenomischen Teilen der HBV-DNA (Genotyp D, Subtyp ayw), welche für die drei Oberflächenproteine (Hepatitis B surface protein, HBs) codiert. Das Transgen wird durch den leberspezifischen Promotor Albumin kontrolliert (siehe 1.3). Um eine grundlegende Funktionskontrolle des Modelles durchzuführen, untersuchten wir alle verwendeten Mäusegruppen auf Expression von HBs bzw. auf fehlende Expression in den Kontrollgruppen (siehe Abb. 18, linke Bildseite). Die Hepatozyten der transgenen Tiere (Tg, Tg-Tx) exprimierten HBs in großem Ausmaß (siehe Abb. 18, rechte Bildseite). Die Kontrollgruppen (Lm, Lm-Tx) zeigten zu keiner Zeit eine Expression der Proteine. Im Alter von 26 Wochen ließ sich in den Tg eine homogene Verteilung von HBsAg über alle abgebildeten Hepatozyten nachweisen. Die HBs-Proteine fanden sich in die Membran der Hepatozyten eingelagert. Mit höherem Alter, entwickelten sich mehrere Knoten auffallend anders aussehender Hepatozyten (►, siehe Abb. 18) in der Leber der transgenen Mäuse. Diese wurden durch Haufen bzw. Knoten von immunohistochemisch HBs-negativen Hepatozyten gebildet. Die Knoten verteilten sich regelmäßig über die Fläche der Schnitte und hatten keinen Bezug zu bestimmten Zonen (portal, zentralvenös etc.). Anzahl und Auftreten der HBs-freien Bereiche wurden durch die KMT positiv beeinflusst. Bei 26 Wochen alten Tg-Tx fanden sich schon Knoten, wobei in Tg diese erst im Alter von 52 Wochen deutlich zu erkennen waren. Zudem wiesen 52 Wochen alte Tg-Tx Mäuse eine höhere Anzahl an Knoten als die gleich alte Tg-Gruppe auf. Diese Regenerat-Foci waren schon von den Erstbeschreibern des Modells beschrieben worden [175].

Nachfolgend war es nötig den Erfolg der in den Experimenten durchgeführten KMT zu kontrollieren. Dafür testeten wir die Leber aus transplantierten sowie nicht transplantierten Tiere auf eine spezifische Färbung von GFP. Die KM-Spenderzellen stammten aus einer GFP-positiven Mauslinie.

ERGEBNISSE

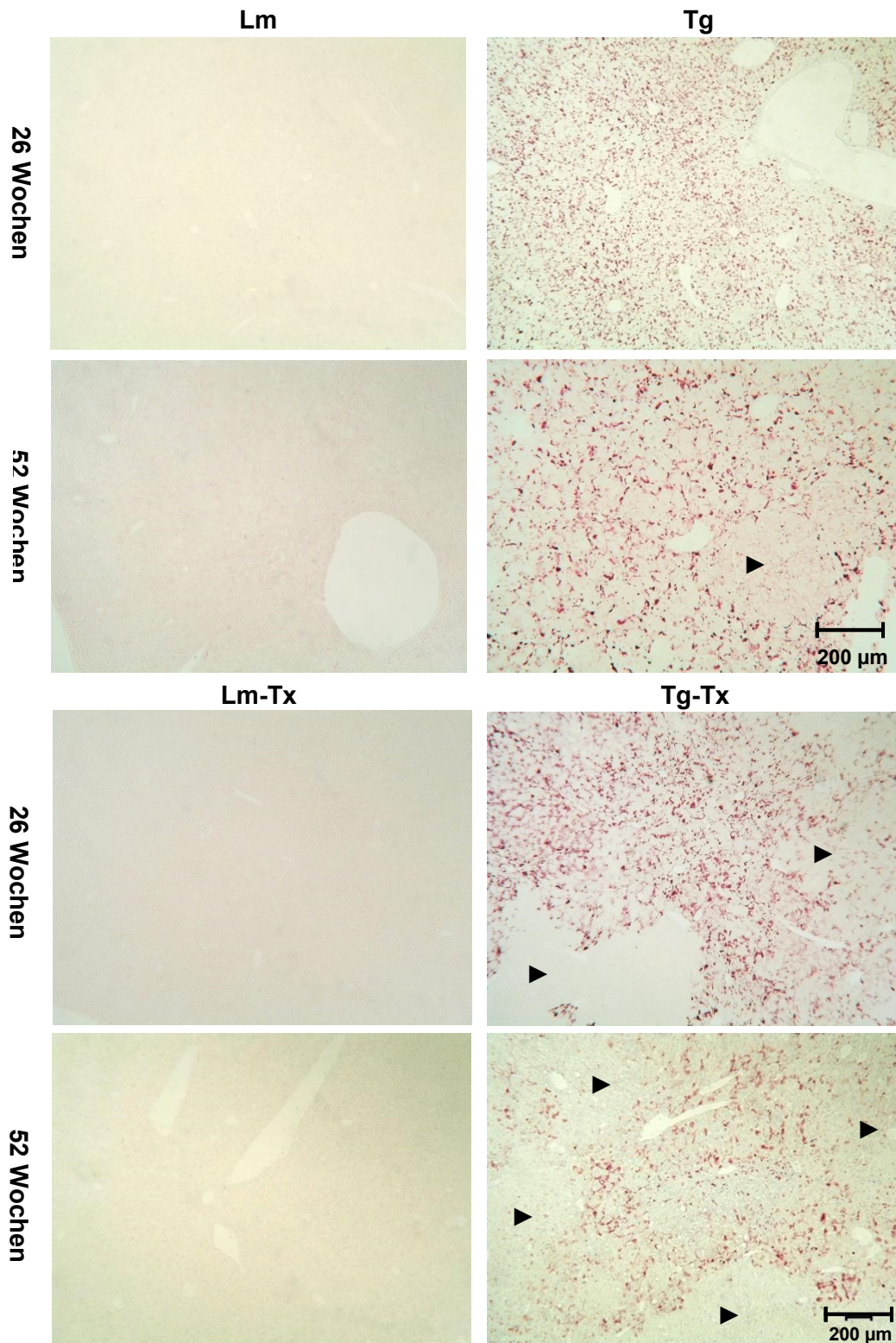


Abb. 18. Die unterschiedliche Expression von HBV-Oberflächenproteinen in der Leber von Tg-Mäusen (oben) und Tg-Tx (unten). Lm (links) zeigten keine, Tg (rechts) starke HBsAg-Expression an den Hepatozyten. In Tg bildeten sich unterschiedlich viele HBsAg-freie Knoten (►). Die Anzahl der Knoten nahm mit höherem Alter und durch die KMT in Tg zu. IHC-Nachweis HBsAg.

3.1.5 GFP-Nachweis

Zwecks einer Erfolgs bzw. Positivkontrolle der Transplantation, stammten die KM-Spenderzellen aus einem phänotypisch gesunden Mäusestamm, der das grün fluoreszierende Protein (GFP) exprimiert. Die GFP-positiven, aufgereinigten KM-Zellen wurden, in die zuvor letal bestrahlte, Versuchs- und Kontrollgruppe injiziert.

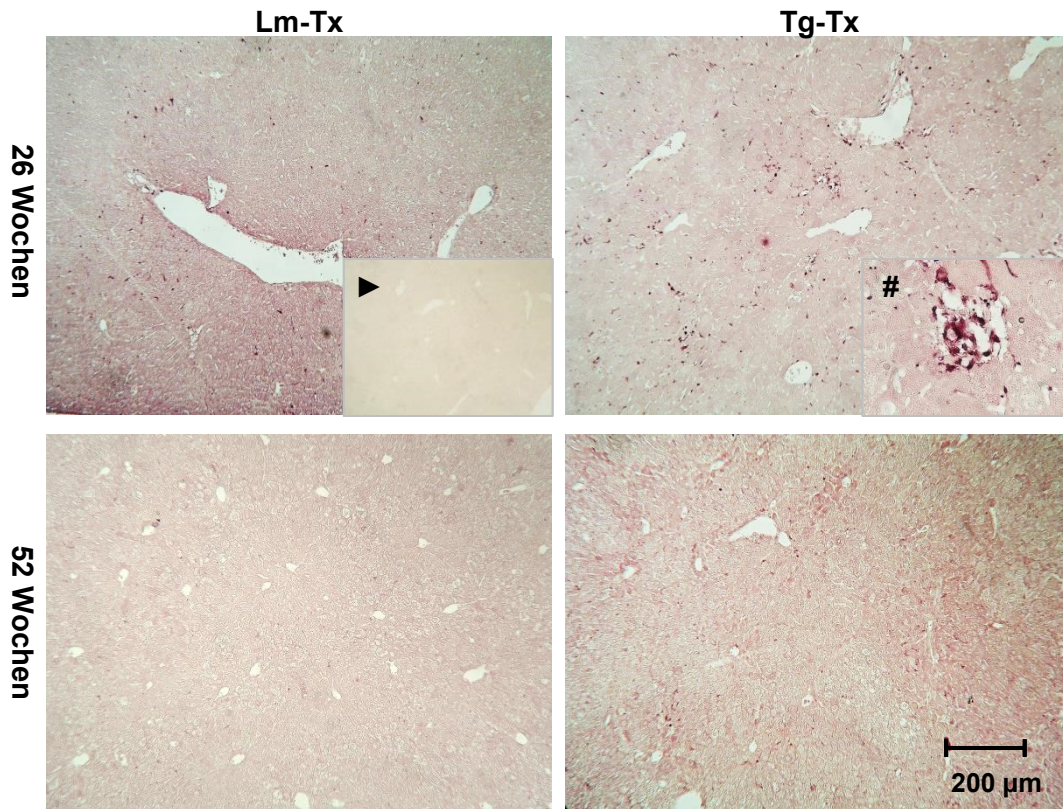


Abb. 19. Expression von GFP-positiven Zellen in der Leber von Lm-Tx (links) und Tg-Tx-Mäusen (rechts). Stärkere Ansiedlung von GFP-positiven Zellen in Tg-Tx-Mäusen. ► **Insert links:** Negativkontrolle 26 Wochen alte Tg-Mäuse (nicht transplantiert). # **Insert rechts:** Ausschnitt aus Tg-Tx-Mäusen, deutliche Ansammlungen von Leukozyten. IHC-Nachweis GFP.

Nach KMT kam es zu unterschiedlich stark ausgeprägter Akkumulation GFP-positiver Zellen in der Leber der Lm- und Tg-Mäuse (siehe Abb. 19). Darunter fiel eine wesentlich stärkere Ansiedlung in Tg-Tx gegenüber Lm-Tx auf. Es ist bekannt, dass im Falle der Schädigung der Leber, vermehrt Stammzellen aus dem KM in das kranke Organ einwandern. Diese Beobachtung konnten wir mit unserem Modell bestätigen. Im Alter von 26 Wochen waren in Tg-Tx wesentlich mehr GFP-positive Zellen nachweisbar als in 52 Wochen alten Tieren. Bei den GFP-positiven Zellen handelte es sich um Leukozyten. Diese fanden sich, bis auf einige Ansammlungen von Leukozyten (siehe #), dis-

seminiert über die Anschnitte der Leber. Der Einschub ► zeigt die Abwesenheit von GFP in 26 Wochen alten, nicht-transplantierten Tg als Negativkontrolle.

3.1.6 Entwicklung von Fibrose

Zur Erfassung des hepatischen Kollagengehalts und besonders um Aussagen über die Lokalisation des Kollagens innerhalb der Leber zu erhalten, wurde eine Sirius-Rot-Färbung angewandt (siehe Abb. 21). Mit dieser lassen sich Kollagen Typ I Fasern unter polarisiertem Licht als gelbe/rote dicke doppelbrechende Fasern identifizieren. Bei Tg fiel eine deutlich vermehrte Färbung von Kollagen gegenüber Lm auf. Eine nochmals verstärkte Färbung, d.h. ein höherer Kollagengehalt ließ sich in 26 Wochen alten Tg-Tx gegenüber Tg sowie Lm-Tx feststellen. In einer stärkeren Vergrößerung wurde das Ausmaß der Kollagendeposition in der portalen Zone in Tg-Tx deutlich sichtbar .

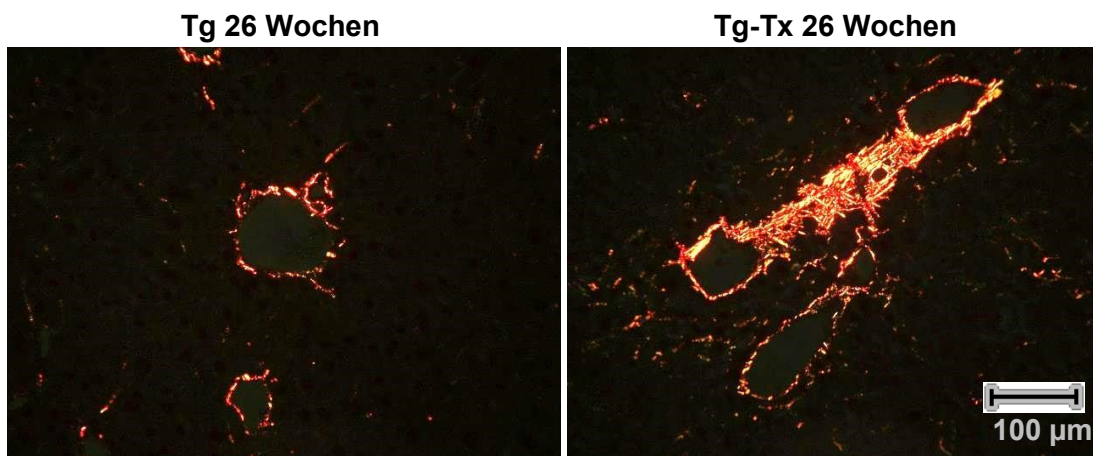


Abb. 20. Portal betonte Fibrose in 26 Wochen alten Tg-Tx-Mäusen (rechts). Die stärkste Deposition von Kollagen fand in der portalen Zone in Tg-Tx statt (Vergleich: Tg links). Durch die Anhäufung von extrazellulärer Matrix in diesem Bereich, kann es zur Beeinträchtigung der dort ablaufenden physiologischen Vorgänge, wie z.B. dem Gallentransport kommen. Ausschnitt portale Zone aus Abb. 21. Sirius-Rot-Färbung in zirkulär polarisiertem Licht betrachtet.

Es kam in dieser Gruppe vermehrt zur Beeinträchtigung der hepatischen Architektur, mit möglicher konsekutiver Störung des Galletransports. Die Kollagenfasern befanden sich in Tg-Tx und in abgeschwächtem Maße in Tg, besonders periportal sowie gelegentlich septal. Es fand sich zudem im Alter von 52 Wochen eine diskrete Zunahme der Kollagenfasern in Tg. In Tg-Tx nahm die Kollagendeposition mit dem Alter leicht ab. Zusammenfassend kann man sagen, dass es in transgenen Mäusen zu einer vermehrten Einlagerung von Kollagen Typ I kam. Die KMT führte in Tg darüber hinaus im Alter von 26 Wochen zu einer aggravierten, portal betonten hepatischen Fibrose. Diese Zuspitzung der Pathologie fügt sich, in das zuvor beschriebene schädigende Bild der KMT in Tg ein.

ERGEBNISSE

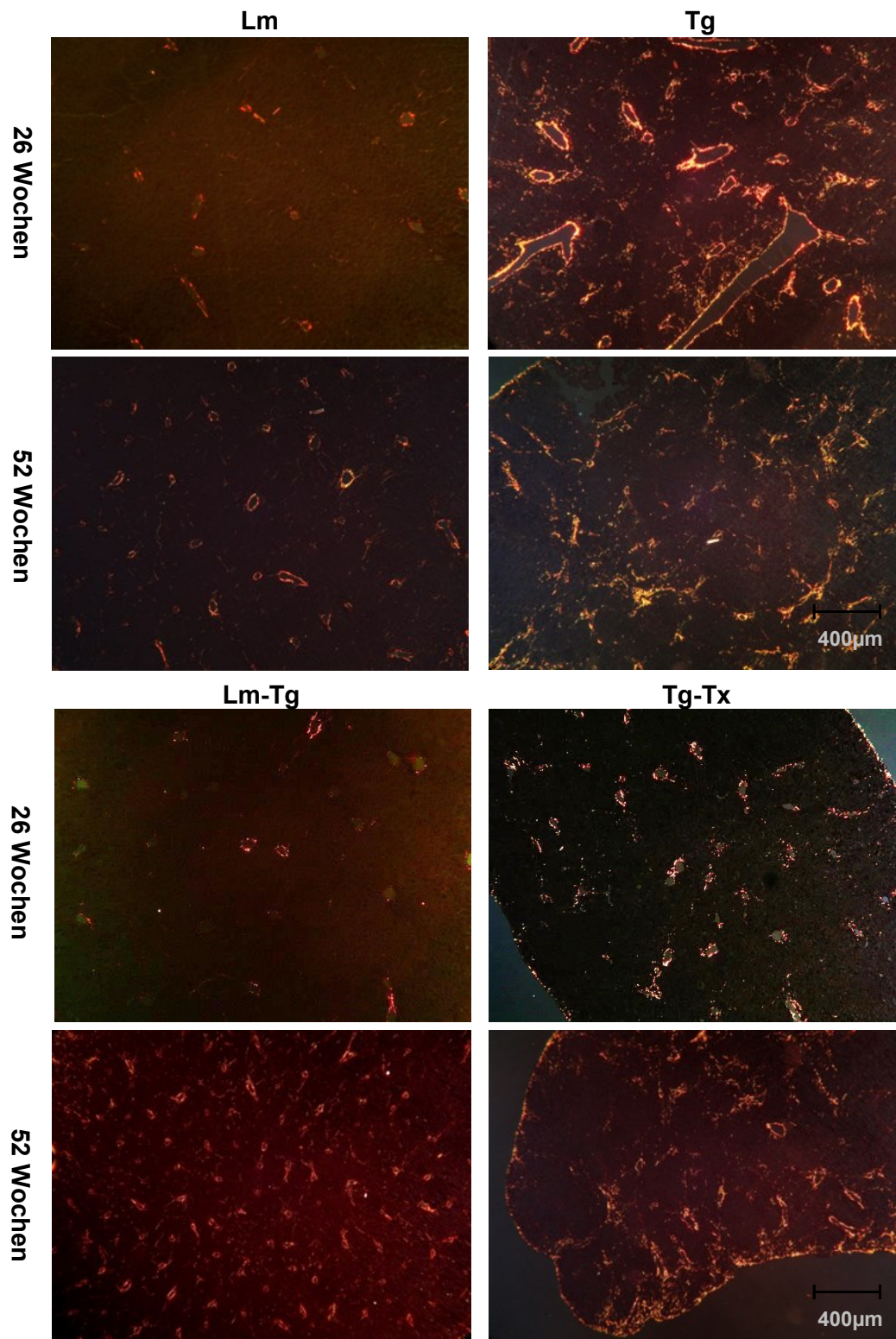


Abb. 21. Verstärkte Kollagenablagerung in Tg (oben) und Tg-Tx (unten). Durch das Einbringen des Transgens in die Mäuse, kam es zur vermehrten Deposition von Kollagen in Tg (rechts) gegenüber Lm (links). Die KMT bewirkte zusätzlich eine nochmals verstärkte Deposition in Tg-Tx gegenüber Tg sowie Lm-Tx. Sirius-Rot-Färbung in zirkulär polarisiertem Licht betrachtet.

Um das Ausmaß der Fibrose in den Mäusen weiter zu erfassen, wandten wir die biochemische Quantifizierung von Hydroxyprolin im Lebergewebe an. Die in dieser Methode nachgewiesene Aminosäure Hydroxyprolin kommt fast ausschließlich in Kollagen vor [197]. Der Hydroxyprolingehalt der Leber von Tg bzw. Tg-Tx, war gegenüber der Kontrollgruppe, Lm bzw. Lm-Tx signifikant erhöht (siehe Abb. 22). Zwar nahm der Gehalt an Hydroxyprolin allgemein im Alter zu, die Unterschiede zwischen Lm und Tg bzw. Lm-Tx und Tg-Tx blieben aber signifikant. Die in der Sirius-Rot-Färbung festgestellten, prägnanten Unterschiede im Kollagengehalt, konnten in der Hyp-Messung nicht bestätigt werden. Ein signifikanter Anstieg des Hydroxyprolingehalts durch die KMT in Tg, konnte weder im Alter von 26 noch von 52 Wochen festgestellt werden.

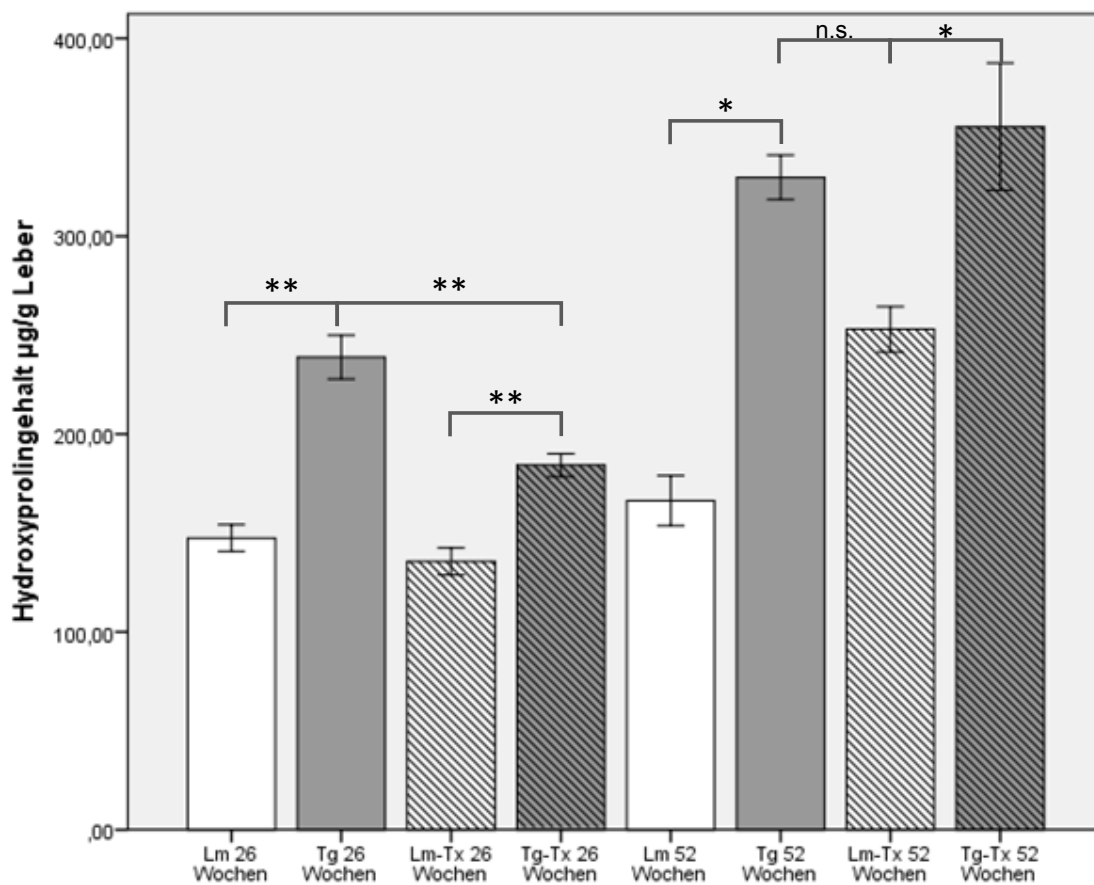


Abb. 22. Signifikant erhöhter hepatischer Hydroxyprolingehalt in Tg und Tg-Tx-Mäusen (gegenüber Lm und Lm-Tx) in allen Altersgruppen. Jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen Tg und Tg-Tx. Vergleich der Mittelwerte. Stichprobenumfang n = 5-15.

3.1.7 Aktivierung von hepatischen Sternzellen

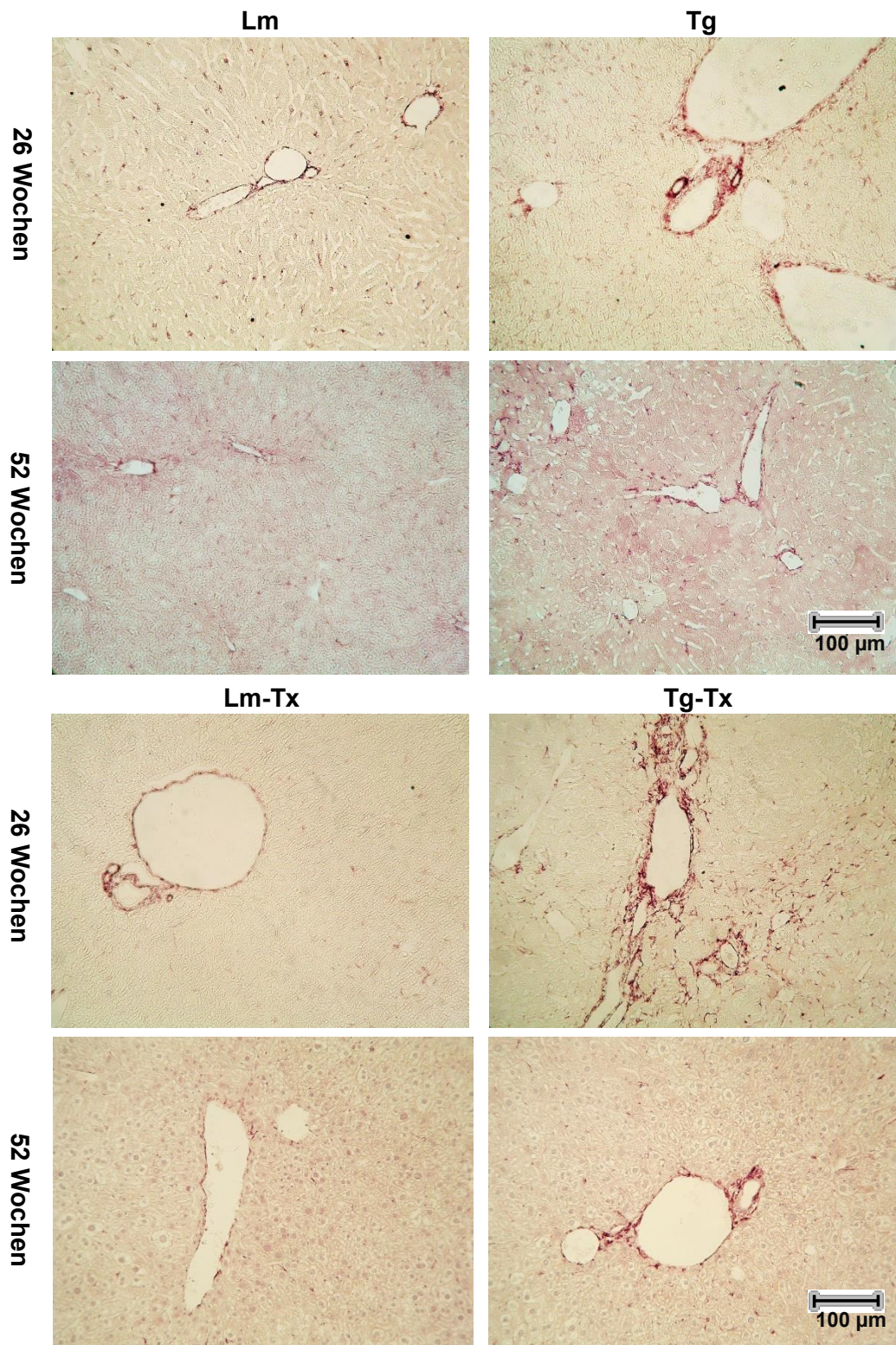


Abb. 23. Tg (rechts) und Tg-Tx (rechts unten) zeigten eine Aktivierung bzw. Proliferation von hepatischen Sternzellen (HSC). Lm (links) zeigten nur eine geringe Anzahl von HSCs. Die KMT hatte in der Kontrollgruppe keine Auswirkung auf die Anzahl von HSCs. IHC-Nachweis Desmin.

Desmin ist ein Intermediärfilament und kommt physiologisch z.B. in Skelett- und glatten Muskelzellen vor. Außerdem macht man sich die Eigenschaft zu nütze, dass es auch auf den Hepatischen Sternzellen (HSC) exprimiert wird [16, 17]. Diese werden bei Leberschädigung aktiviert und wandeln sich zu einem Myofibroblasten-ähnlichen Zelltyp um und produzieren Extrazelluläre Matrix (ECM), darunter Kollagen Typ I [202].

In allen Maus-Gruppen konnten wir das physiologische Vorhandensein von Desmin-positiven Zellen erkennen (siehe Abb. 23). Es kam jedoch zu einer gut sichtbaren Zunahme von HSCs in Tg gegenüber der Kontrollgruppe (Lm). Die HSCs fanden sich dabei nicht nur portal, sondern zogen von der portalen Zone ausgehend weiter ins Parenchym. Zusammengenommen sprach dies für eine vermehrte Aktivierung von HSCs und somit für eine vermehrte Produktion von ECM in HBV-transgenen Tieren. Am stärksten ließ sich dieser Effekt bei 26 Wochen alten Tg-Tx beobachten. Bei Ihnen fanden wir eine noch stärkere Expression von Desmin, als in nicht-transplantierten Tg. Diese Beobachtung reiht sich mit den oben gemachten Erkenntnissen des schädigenden Effekts der KMT in Tg ein. Im Alter von 52 Wochen, nahm die Aktivierung der HSCs in Tg-Tx leicht ab.

3.1.8 Expression von selektierten Genen

Um die in Serumparametern sowie histologischen Untersuchungen festgestellte aggravierte hepatische Schädigung bzw. Fibrose in Tg bzw. Tg-Tx genauer zu beurteilen, untersuchten wir die hepatische mRNA-Expression von einigen fibrose-assoziierten- und weiteren Genen.

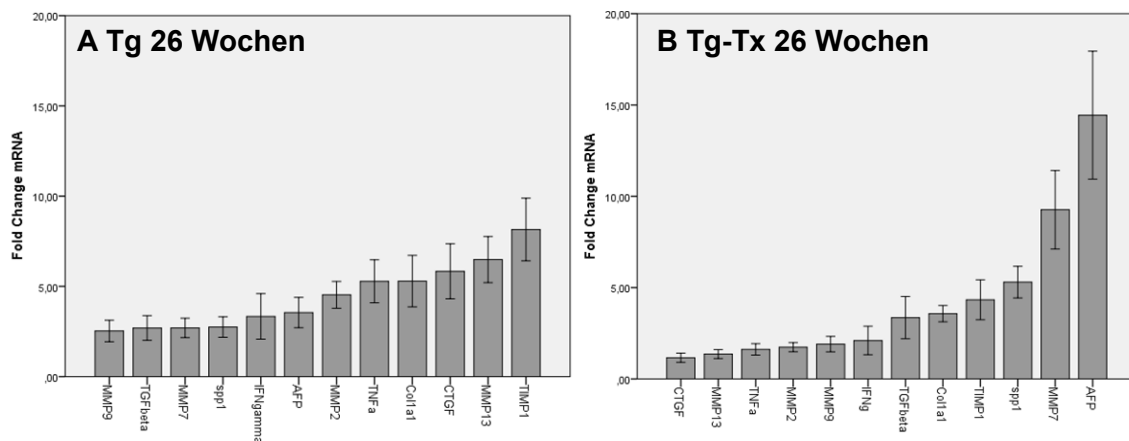


Abb. 24. Hochregulation von fibrose-assoziierten- sowie anderen selektierten Genen in 26 Wochen alten Tg (A) und Tg-Tx (B). Hepatische mRNA-Expression in 26 Wochen (A) Tg versus Lm und (B) Tg-Tx versus Lm-Tx.

Ein verstärkter hepatozellulärer Schaden in Tg-Tx- gegenüber Tg-Mäusen konnte mit Hilfe der q-PCR bestätigt werden. Die Prüfung ergab eine Hochregulation verschiedener Fibrose-assoziiierter Gene in Tg-Tx wie z.B. Col1a1, MMP-7, TIMP-1 und TGF- β . Einige Gene waren bei der Pathogenese durch die KMT in Tg allerdings in nur sehr geringem Maße exprimiert (siehe Abb. 24 B: z.B. CTGF, MMP-13, TNF- α). Auch das Auftreten der Fibrose in Tg (verglichen mit Lm) konnte verifiziert werden (siehe Abb. 24 A: z.B. TIMP-1, Col1a1, CTGF). Beim Vergleich der Tg- mit Lm-Mäusen, kam es insgesamt zu weniger dramatischen Veränderungen in der Expression dieser Gene als in Tg-Tx versus Tg. Die KMT verursachte in Tg einen auffallend starken Wechsel zu der gesteigerten Expression profibrotischer Gene.

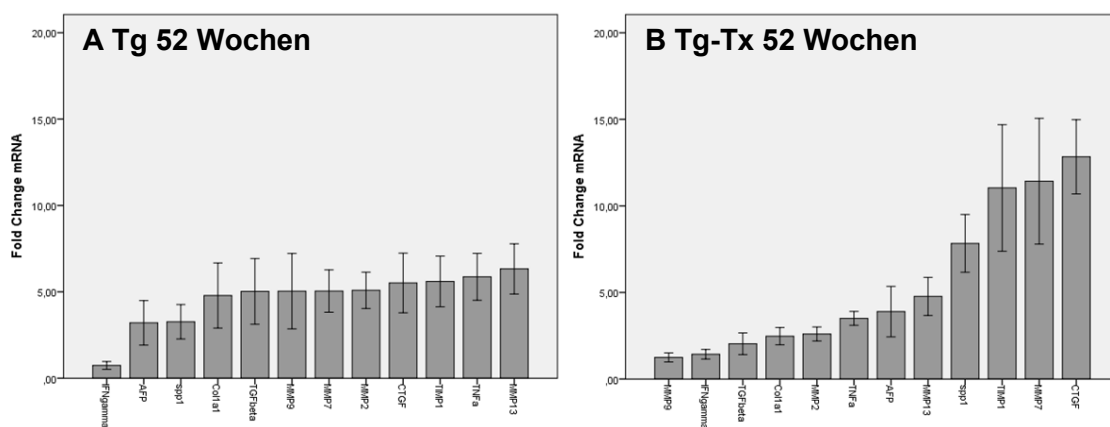


Abb. 25. Hochregulation von Fibrose-assoziierten- sowie anderen selektierten Genen in 52 Wochen alten Tg (A) und Tg-Tx (B). Hepatische mRNA-Expression in 52 Wochen (A) Tg versus Lm und 52 Wochen (B) Tg-Tx versus Lm-Tx.

In den Ergebnissen der q-PCR von 52 Wochen alten Tg und Tg-Tx war, wie bei den 26 Wochen alten Mäusen, eine aggravierte hepatische Schädigung erkennbar (siehe Abb. 25). Alle zuvor selektierten und untersuchten Gene (AFP, CTGF, Col1a1, spp1, IFN γ , MMP-2, MMP-7, MMP-9, MMP-13, TIMP-1, TNF- α) waren in 52 Wochen alten Tg und Tg-Tx ebenfalls hochreguliert. Daraus ergab sich eine, auch mit 52 Wochen vorhandene, Hochregulation der Expression von fibrose-assoziierten Genen in Tg gegenüber Lm bzw. in Tg-Tx gegenüber Lm-Tx. Durch das Einbringen des HBV-Transgens kam es zu einer Steigerung der Expression von z.T. Fibrose-assoziierten Genen in den Mäusen. Die KMT bewirkte eine weiter darüber hinaus gehende Hochregulation profibrotischer Gene.

3.1.9 Gen-Expressions-Muster in Bezug auf *Abcb4*^{-/-}-Knockoutmäuse

Um das Muster der hepatischen Schädigung näher zu untersuchen, wurde die aus der Leber der Mäuse isolierte mRNA einer Microarray-Analyse unterzogen. Wir verglichen dabei wie zuvor vier Gruppen: Lm- und Tg- sowie Lm-Tx- und Tg-Tx-Mäuse. Allerdings beschränkten wir uns auf das Alter von 26 Wochen (bzw. 8 Wochen bei *Abcb4*^{-/-}-Knockoutmäusen). Zudem verglichen wir Genexpressionsmuster mit einem anderen Tiermodell hepatischer Schädigung, den *Abcb4*^{-/-}-Knockoutmäusen (*Abcb4*^{-/-}). Diese haben, wie die HBV-transgenen Mäuse, einen BALB/c genetischen Hintergrund. *Abcb4*^{-/-}-Mäuse entwickeln eine chronisch hepatische Erkrankung ähnlich der progressiv familiären intrahepatischen Cholestase (PFIC Typ 3) oder der Progressiv sklerosierenden Cholangitis [203]. Als Kontrollgruppe dienten Wildtyp-Mäuse auf BALB/c Hintergrund (Wt). In der Analyse der Microarray-Daten konzentrierten wir uns auf die am höchsten regulierten Gene (positiver wie negativer Fold Change) der Tg-Tx-HBV-Mäuse gegenüber den Lm-Tx und verglichen diese mit den korrespondierenden Genen der *Abcb4*^{-/-}-Mäuse.

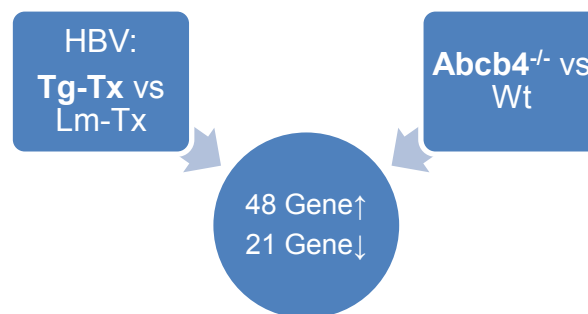


Abb. 26. Aufbau des Vergleichs der Microarray-Daten. Vergleich der Genexpressionsmuster von HBV-Tg-Tx- und *Abcb4*^{-/-}-Mäusen führte zu 48 gemeinsam hochregulierten Genen, sowie 21 gemeinsam herunterregulierten Genen.

Wir beschränkten uns auf Gene der Tg-Tx-Gruppe, deren Expression einen mindestens 3x negativen oder 3x positiven Fold Change zu Ihrer Kontrolle (Lm-Tx) zeigten. Dies diente dazu, den Fokus auf die auffallend stark regulierten Gene zu lenken. Zudem wurde auf eine hohe Signalintensität (Int) der Fluoreszenzfarbstoffe auf dem Microarray-Chip (> 100) und einen p-Wert < 0,05 geachtet. Die Beachtung einer Signalintensität $Int_2 > 100$ ist von großer Bedeutung, da kleinere Werte zu einem verzerrten Fold Change bzw. zu einem falschen Bemessen des Effektes der KMT führen können. Ein Anstieg der Signalintensität eines Gens von $Int_1 = 10$ in Lm-Tx (Kontrollgruppe) auf $Int_2 = 100$ in Tg-Tx (Versuchsgruppe), entspricht einer Verzehnfachung der Signalintensität durch das Einbringen des Transgens. Die Genexpression ist jedoch selbst durch die Verzehnfachung immer noch so niedrig (lediglich Signalintensität $Int_2 =$

ERGEBNISSE

100), dass diesem Effekt keine große Bedeutung beigemessen werden kann. Bei einer Verzehnfachung der Signalintensität bzw. Genexpression von beispielsweise $Int_1 = 1000$ auf $Int_2 = 10\ 000$ hingegen ergibt sich eine bedeutendere Relation bzw. eine tatsächlich starke Genexpression in der Versuchsgruppe (Int_2). Für $Abcb4^{-/-}$ wurde der Grenzwert des Fold Changes für die Aufnahme in den Vergleich auf mindestens 1,5x gelegt, d.h. alle Geneexpressionswechsel durch den Knockout des Gens $Abcb4$ kleiner gleich 1,5x wurden nicht in die Tabelle inkludiert.

3.1.10 Hochregulierte Gene - Vergleich mit $Abcb4^{-/-}$

Accession#	Primary Sequence Name	Gen Beschreibung	Fold Change	
			Tg-Tx	$Abcb4^{-/-}$
NM_009263	Spp1	Secreted phosphoprotein 1	13.30	10.00
NM_178373	Cidec	Cell death-inducing DFFA-like effector c	12.72	4.00
NM_016867	Gipc2	GIPC PDZ domain containing family, member 2	12.43	9.42
NM_173047	Cbr3	Carbonyl reductase 3	11.56	2.55
NM_012033	Tinag	Tubulointerstitial nephritis antigen	11.00	10.57
NM_019631	Tmem45a	Transmembrane protein 45a	10.45	6.94
NM_010742	Ly6d	Lymphocyte antigen 6 complex, locus D	10.24	6.07
NM_010810	Mmp7	Matrix metalloproteinase 7	9.39	6.16
NM_021491	Smpd3	Sphingomyelin phosphodiesterase 3, neutral	8.63	4.27
NM_023137	Ubd	Ubiquitin D	7.98	6.35
NM_138304	Calml4	Ceroid-lipofuscinosis, neuronal 6	7.94	2,93
NM_012055	Asns	Asparagine synthetase	7.91	3.42
NM_009160	Sftpd	Surfactant associated protein D	7.51	7.86
NM_010212	Fhl2	Four and a half LIM domains 2	7.15	7.57
NM_026713	Mogat1	Monoacylglycerol O-acyltransferase 1	6.90	3.44
XM_355365	Wfdc3	WAP four-disulfide core domain 3	6.65	5.62
NM_146010	Tspan8	Tetraspanin8	6.36	7.18
NM_031254	Trem2	Triggering receptor expressed on myeloid cells 2	6.24	3.98
NM_010217	Ctgf	Connective tissue growth factor	6.16	3.50
NM_013749	Tnfrsf12a	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 12a	5.33	3.00
NM_009841	Cd14	CD14 antigen	5.31	4.11
NM_009264	Sprp1a	Small proline-rich protein 1A	5.27	2.93
NM_010591	Jun	Jun oncogene	5.22	4.03
NM_007585	Anxa2	Annexin A2	5.21	3.47
NM_007702	Cidea	Cell death-inducing DNA frag-	5.19	4.60

ERGEBNISSE

		mentation factor, alpha subunit-like effector A		
NM_007742	Col1a1	Procollagen, type I, alpha 1	4.93	4.50
NM_008509	Lpl	Mus musculus lipoprotein lipase	4.92	3.84
NM_008594	Mfge8	Milk fat globule-EGF factor 8 protein	4.76	5.01
NM_008181	Gsta1	Glutathione S-transferase, alpha 1 (Ya)	4.74	3.18
NM_011414	Slpi	Secretory leukocyte peptidase inhibitor	4.72	1.72
NM_028089	Cyp2c55	Cytochrome P450, family 2, subfamily c, polypeptide 55	4.68	3.03
NM_133903	Spon2	Spondin 2, extracellular matrix protein	4.66	4.61
NM_031397	Bicc1	Bicaudal C homolog 1	4.55	5.14
NM_011448	Sox9	SRY-box containing gene 9	4.53	3.46
NM_027211	Anxa13	Annexin A13	4.50	3.33
NM_009014	Rad51l1	RAD51-like 1	4.48	2.27
NM_031170	Krt2-8	Keratin complex 2, basic. gene 8	4.47	3.60
NM_029688	Srxn1	Sulfiredoxin 1 homolog	4.45	2.32
NM_008491	Lcn2	Lipocalin 2	4.40	3.18
NM_007657	Npdc1	Neural proliferation, differentiation and control gene 1	4.22	5.08
NM_007653	Cd63	Cd63 antigen	4.10	3.57
NM_009864	Cdh1	Cadherin 1	4.07	5.05
NM_008182	Gsta2	Glutathione S-transferase, alpha 2 (Yc2)	3.68	4.95
NM_009466	Ugdh	UDP-glucose dehydrogenase	3.67	2.43
NM_009673	Anxa5	Annexin A5	3.49	3.25
NM_007769	Dmbt1	Deleted in malignant brain tumors 1	3.43	2.05
NM_010664	Krt1-18	Keratin complex 1, acidic, gene 18	3.34	2.96
NM_021274	Cxcl10	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	3.24	2.16

Tabelle 5. Gemeinsam hochregulierte Gene in Tg-Tx und Abcb4^{-/-}. Es zeigte sich eine große Übereinstimmung des Expressionsmuster der Gene (gleichsinniger Fold Change in beiden Gruppen). Die KMT bewirkte in Tg-Mäusen einen ähnlichen Effekt wie der Knockout des Abcb4-Gens. Nach Fold Change in Tg-Tx absteigend sortiert.

Auffällig war das sehr ähnliche Expressionsmuster der hochregulierten Gene in beiden Modellen. Es kam zur Überschneidung der meisten hochregulierten Gene in den zwei Gruppen. Beispielhaft kann das z.B. am Spp1-Gen, welches für Osteopontin kodiert, dargestellt werden:

	Fold Change	Intensität Kontrollgruppe	Intensität Versuchsgruppe
Spp1 in Tg-Tx	13,31	14742	197411
Spp1 in Abcb4^{-/-}	10,02	14812	149784

ERGEBNISSE

Gegenüber der Kontrollgruppe war Osteopontin in Tg-Tx sowie in Abcb4^{-/-} mindestens zehnfach in seiner Expression nach oben reguliert. Es wird diskutiert, dass Osteopontin unter anderem ein proinflammatorisches Zytokin ist, welches zelluläre Adhäsion und Chemotaxis für Leukozyten vermittelt. Außerdem wurde spekuliert, dass Osteopontin an der Initiation einer Th1-Immunantwort in der Leber unter pathologischen Bedingungen beteiligt sein könnte [204]. Osteopontin wurde auch schon von einer anderen Arbeitsgruppe [205] in Zusammenhang mit der Pathogenese der Sklerosierenden Cholangitis in Abcb4^{-/-}-Mäusen gebracht. Die KMT wirkte in HBV-transgenen Tieren auf die Osteopontin-Expression wie der Knockout des Abcb4-Gens auf die Wildtypmäuse.

3.1.11 Herunterregulierte Gene - Vergleich mit Abcb4^{-/-}

Accession#	Primary Sequence Name	Gen Beschreibung	Fold Change	
			Tg-Tx	Abcb4 ^{-/-}
NM_013797	Slco1a1	Solute carrier organic anion transporter family, member 1a1	-58.37	-381.8
NM_020565	Sult3a1	Sulfotransferase family 3A, member 1	-37.18	-388.9
NM_008294	Hsd3b4	Hydroxysteroid dehydrogenase-4	-17.64	-19.12
NM_008295	Hsd3b5	Hydroxysteroid dehydrogenase-5	-14.38	-10.03
NM_010845	Mup3	Mus musculus major urinary protein 3	-8.75	-2.21
NM_183257	Hamp2	Hepcidin antimicrobial peptide 2	-6.84	-6.17
NM_183257	Mup1	Major urinary protein 1	-6.83	-3.73
NM_008649	Mup5	Major urinary protein 5	-6.13	-1.89
NM_010024	Dct	Dopachrome tautomerase	-5.50	-23.12
NM_011267	Rgs16	Regulator of G-protein signaling 16	-5.44	-3.60
NM_013584	Lifr	Leukemia inhibitory factor receptor	-5.34	-5.00
NM_007825	Cyp7b1	Cytochrome P450, family 7, subfamily b, polypeptide	-5.26	-2.62
NM_007813	Cyp2b13	Cytochrome P450, family 2, subfamily b, polypeptide 13	-5.13	-3.69
NM_009286	Sult2a2	Sulfotransferase family 2A, member 2	-5.03	-3.69
NM_177380	Cyp3a44	Cytochrome P450, family 3, subfamily a, polypeptide 44	-4.75	-87.70
NM_013809	Cyp2g1	Cytochrome P450, family 2, sub-	-4.59	-2.66

ERGEBNISSE

		family g, polypeptide 1		
NM_008030	Fmo3	Flavin containing monooxygenase :	-4.34	-5.89
NM_134103	Il1rap	Interleukin 1 receptor accessory protein	-4.03	-1.65
BC031383	Rnf170	Ring finger protein 170	-4.95	-1.58
NM_153145	Abca8a	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 8a	-3.90	-1.76
NM_009349	Inmt	Indolethylamine N-methyltransferase	-3.85	-2.05

Tabelle 6. Gemeinsam herunterregulierte Gene in Tg-Tx und Abcb4^{-/-}. Die nach den Selektionskriterien ausgesuchten Gene in Tg-Tx (Fold Change < -3 etc.), waren in Abcb4^{-/-} ebenfalls alle negativ reguliert. Nach Fold Change in Tg-Tx aufsteigend sortiert.

Wie schon bei dem Vergleich der hochregulierten Gene demonstriert werden konnte, wurde auch bei den herunterregulierten Genen einer Überschneidung zwischen Tg-Tx und Abcb4^{-/-} deutlich. Nach Selektion mit oben genannten Kriterien (Fold Change < -3 etc.) blieben 21 in Tg-Tx herunterregulierte Gene übrig. Diese waren im Abcb4^{-/-}-Modell ohne Ausnahme gleichsinnig (negativer Fold Change) reguliert. Die hohe Anzahl der Berührungspunkte der Regulation unterstützte die Hypothese der Entstehung einer FCH durch KMT im HBV-transgenen Mausmodell.

3.1.12 Entgegengesetzt regulierte Gene

Accession#	Primary Sequence Name	Gen Beschreibung	Fold Change	
			Tg-Tx	Abcb4 ^{-/-}
NM_007423	Afp	Alpha-1-Fetoprotein	19.2	-1.63
NM_012055	Asns	Asparagine Synthetase	7.91	-3.42
NM_023223	Cdc20	cell division cycle 20	5.42	-1.45
NM_009689	Birc5	baculoviral IAP repeat containing 5	4.27	-2.57

Tabelle 7. Differenziell regulierte Gene in Tg-Tx und Abcb4^{-/-}. Unter 74 selektierten Genen, waren lediglich 4 Gene in Tg-Tx und Abcb4^{-/-} nicht gleichsinnig reguliert. Nach Fold Change in Tg-Tx absteigend sortiert.

Bei der Untersuchung aller, nach oben genannten Kriterien ausgesuchten Genen, glich sich das Muster der Hoch- bzw. Herunterregulation in beiden Modellen in 69 von 73 Fällen. Dies ergab eine Übereinstimmung von 94 % in der Regulation selektierter Gene

beider Versuchsgruppen. Dadurch wurde deutlich, dass eine Übereinstimmung von Genen kein Einzelfall war. Es war somit von einer gleichsinnigen Regulation auszugehen. Wir folgerten daraus, dass die KMT in den HBV-transgenen Tieren zu einem ähnlichen Pathomechanismus führte, welcher auch dem Knockout des Gens *Abcb4*^{-/-} zu Grunde lag. Das entscheidende Merkmal im *Abcb4*^{-/-}-Modell ist die Entwicklung einer chronisch cholestatischen Lebererkrankung. Zusammengenommen mit Befunden wie erhöhten Markern hepatozellulärer bzw. hepatobiliärer Schädigung (ALT, AP), aggravierter portaler Fibrose sowie portaler Leukozyteninfiltration schlossen wir auf ein fibrosierendes cholestatisches Krankheitsgeschehen, welches erst durch die KMT in HBV-transgenen Mäusen ausgelöst wurde.

3.1.13 q-PCR und Microarray-Befunde

Interessante und wichtige Befunde der Microarray-Analyse der 26 Wochen alten Tg-Tx-Mäuse unterzogen wir einer Kontrolle. Die festgestellten Unterschiede in der Regulation der Gene der Tg-Tx versus Lm-Tx, wurden mittels q-PCR validiert. Die Ergebnisse (siehe Abb. 27) sind in Fold Change der hepatischen mRNA Expression von Tg-Tx gegenüber Lm-Tx dargestellt.

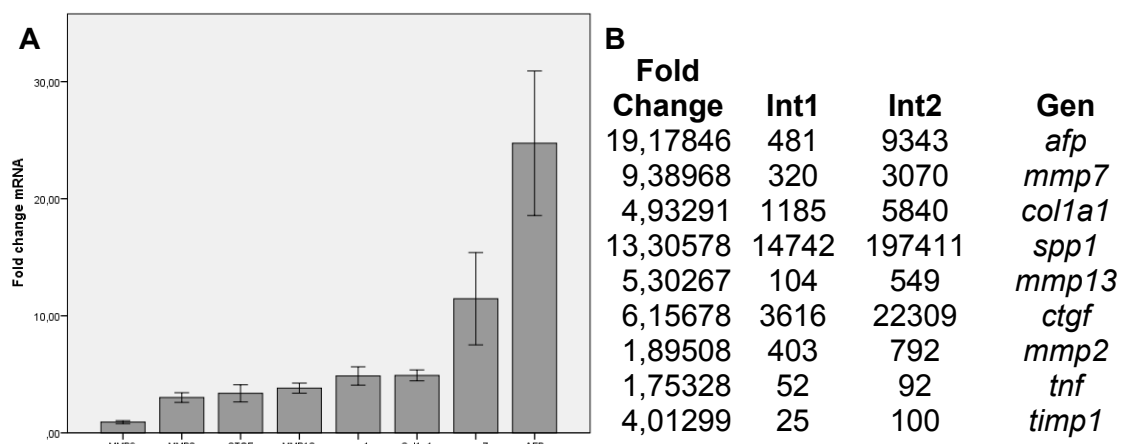


Abb. 27. Übereinstimmen der Ergebnisse von q-PCR (links, A) und Microarray (rechts, B). Gleichsinnige Regulation (positiver Fold Change) der Gene in q-PCR und Microarray. **A:** Hepatische mRNA Expression in 26 Wochen alten Tg-Tx versus Lm-Tx. **B:** Ausgewählte Microarray Vergleichsdaten, Int = (Signal-)Intensität, Int1 = Lm-Tx, Int2 = Tg-Tx.

Alle im Microarray als hochreguliert eingestuft, selektierten Gene zeigten diese Eigenschaft auch in der q-PCR. Fibrose-assoziierte Gene wie *Col1a*, *CTGF*, *MMP-7* usw. wurden in Tg-Tx um ein Vielfaches stärker exprimiert als in Lm-Tx. *MMP-9*-Hochregulation war im Microarray nicht nachzuweisen, in der q-PCR fand sich analog dazu ein Fold Change von nur 0,93. Ähnlich verhielt es sich mit *TGF-β*, welches nicht

ERGEBNISSE

im Microarray detektiert worden war (folglich nicht auffallend reguliert war) und in der q-PCR ebenfalls einen Fold Change von nur 1,7 aufwies. TIMP-1 wurde, aufgrund von zu geringer Intensität der Signale des Microarray-Chips, nicht in die Bewertung mit eingenommen, verhielt sich jedoch in Microarray (ca. 4x Fold Change) und q-PCR (6,2x Fold Change) ebenfalls gleichsinnig.

3.2 KMT UND PORTAL BETONTE SENESZENZ

Unter physiologischen Bedingungen besitzen Hepatozyten die Fähigkeit, sich bei Verletzung des Parenchyms zu teilen. In einer chronisch verlaufenden Hepatitis, unter regenerativem Stress, jedoch kann dieser Mechanismus beeinträchtigt sein [37]. Wir suchten deshalb mit verschiedenen Markern nach einem eventuell verlangsamten oder angehaltenen Zellzyklus, der sogenannten zellulären Seneszenz.

3.2.1 Seneszenz-assoziiierter beta-Galaktosidase-Assay

Der Seneszenz-assoziierte beta-Galaktosidase (SABG)-Assay ist der am häufigsten verwendete Biomarker für die zelluläre Seneszenz. Man nimmt an, dass es speziell in Seneszenz-Zellen, zur Anreicherung dieses lysosomalen Enzyms kommt [192].

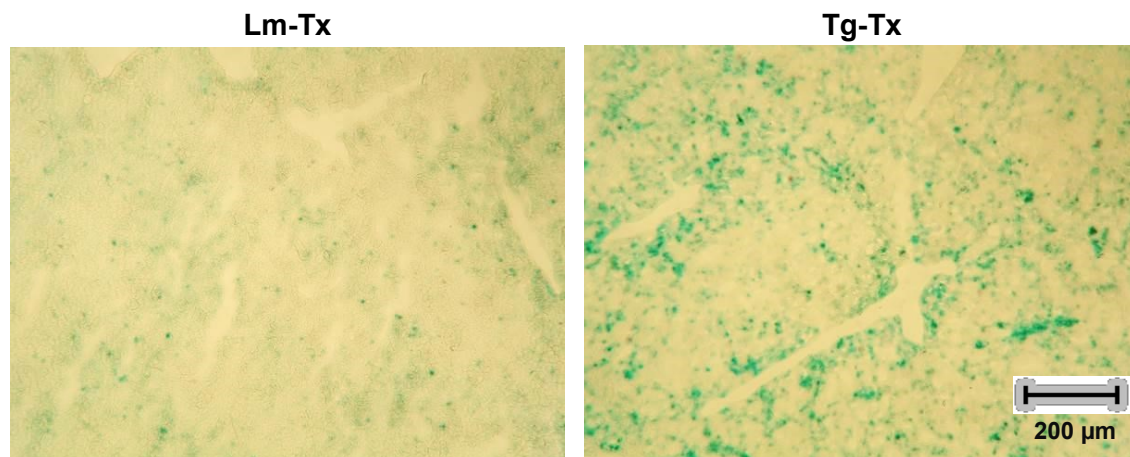


Abb. 28. Die Hepatozyten in Tg-Tx-Mäusen (rechts) demonstrierten eine starke Anreicherung von SABG (erkennbar an einem blauen zytosolischen Präzipitat), d.h. viele Zellen befinden sich Seneszenz. Lm-Tx (links) zeigten keine erhöhte Aktivität, die Hepatozyten unterliefen einen normalen Zellzyklus. SABG-Assay auf Gefrierschnitt der Leber 26 Wochen alter Mäuse.

In Lm-Tx zeigte sich keine erhöhte Aktivität der SABG (siehe Abb. 28). Wenige Hepatozyten ließen sich verstärkt markieren. Zudem waren diese deutlich in der Minderheit und ohne System über den Anschnitt der Leber verteilt. In Tg-Tx-Mäusen jedoch wurde ein Wechsel des Aktivitäts- und des Verteilungsmusters sichtbar. Große Teile der Leberschnitte enthielten SABG und wiesen somit auf einen Wandel der Hepatozyten in Richtung verstärkter Seneszenz hin.

ERGEBNISSE

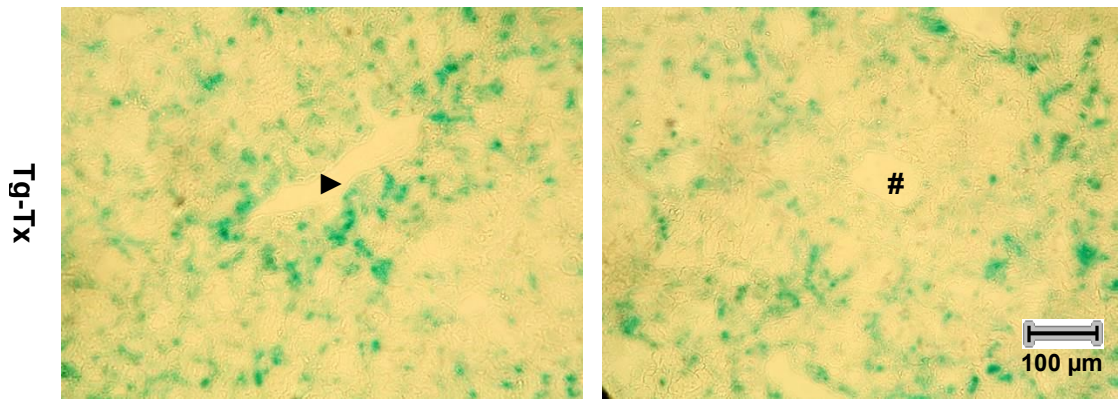


Abb. 29. Speziell die eine Portalvene (▶) umgebenden Hepatozyten zeigten eine ausgeprägte Anreicherung von SABG. Die Hepatozyten dieses Bereichs befanden sich in einem arretierten Zellzyklus. Um die Zentralvene (#) herum hingegen, waren die Hepatozyten nicht seneszent. SABG-Assay auf Gefrierschnitt der Leber 26 Wochen alter Mäuse. Ausschnitte aus Abb. 28, rechter Bildteil.

Es bildeten sich spezielle Zonen in denen dieser Effekt verstärkt auftrat (siehe Abb. 29). Rund um die periportale Zone etwa, ließen sich nun deutlich abgrenzbare Bereiche vermehrter Aktivität von SABG bzw. erhöhter Seneszenz beobachten. Im Kontrast dazu, waren die Hepatozyten um die Zentralvene herum nicht in der Teilung gehemmt. Wir folgerten hieraus, dass KMT in Tg eine portale betonte Seneszenz der Hepatozyten induzierte und diese hinderte sich bei Schädigung zu teilen.

3.2.2 Die Expression der Seneszenz-Marker p21 und p27

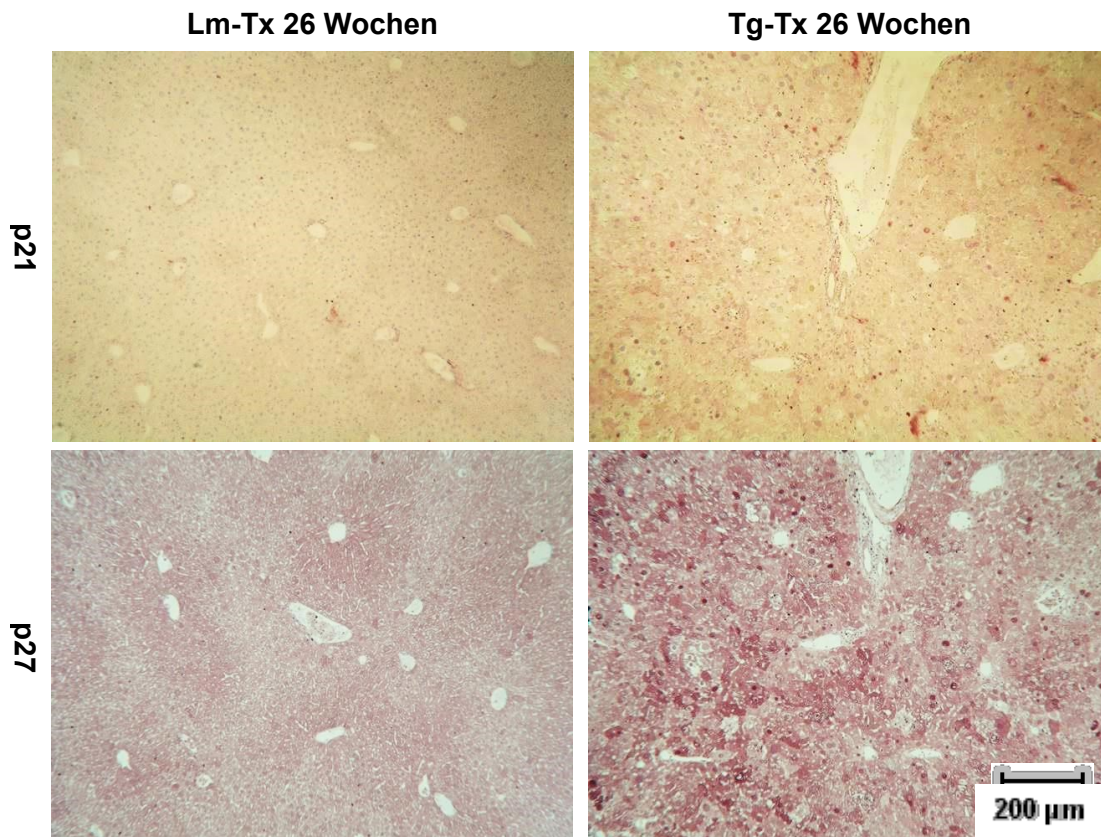


Abb. 30. Auffallend starke Expression der Seneszenz-Marker p21 (oben) und p27 (unten) in Hepatozyten von Tg-Tx (rechts.). Deutlich mehr p21- und p27-positive Hepatozyten in Tg-Tx (rechts) als in Lm-Tx (links). Die KMT bewirkte in Tg einen Eintritt der Hepatozyten in eine Seneszenz. IHC-Nachweis p21 und p27.

Zur weiteren Validierung der Seneszenz untersuchten wir die Leber der Mäuse auf die beiden Zellzyklus-Inhibitoren p21^{CIP1} und p27^{Kip1}. P21 inhibiert cyclin-abhängige Kinasen und führt so zu einem Zellzyklusarrest [206]. P27 sorgt ebenfalls dafür, dass Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus verbleiben [207]. In Lm-Tx ließ sich nur sehr selten p21 oder p27 nachweisen. In der Tg-Tx-Gruppe dagegen fand man vielfach p21- und p27-positive Hepatozytenkerne. Die KMT in Tg kann als Auslöser einer Seneszenz zahlreicher Hepatozyten verstanden werden. Bei Gewebeverlust können die Hepatozyten folglich nicht mehr mit Teilung reagieren. Wir vermuten daher, dass eine Seneszenz und vermutlich weitere Faktoren in unserem Modell eine duktiläre Reaktion auslösten.

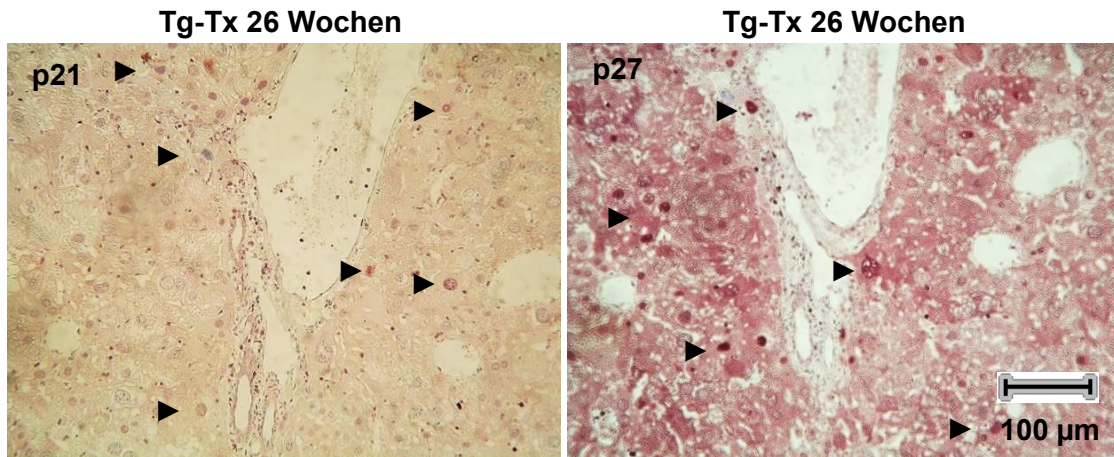


Abb. 31. Die Hepatozyten in Tg-Tx zeigten zahlreiche p21- und p27-positiv gefärbte Zellkerne ►. Die KTM führte in Tg-Mäusen zu einer teilweisen Inhibition des Zellzyklus. Ausschnitte des rechten Bildteils Abb. 30. IHC-Nachweis p21 und p27.

3.3 KMT UND DUKTULÄRE REAKTION

Aufgrund der zuvor demonstrierten ausgeprägten Seneszenz portaler Hepatozyten der Tg-Tx-Gruppe, vermuteten wir eine Proliferation von hepatischen Progenitorzellen. Zudem besteht ein Teil der histopathologischen Veränderungen einer FCH in der Ausbildung einer duktulären Reaktion. Bei dieser kommt es zu einer Expansion der Population von Progenitorzellen in der Leber. Die dort proliferierenden Zellen können verschiedenen Ursprungs sein: Cholangiozyten, Progenitorzellen (z.B. Ovalzellen oder zirkulierende KM-Stammzellen) und sehr selten metaplastische Hepatozyten [208]. Bis zum heutigen Tage ist kein definitiver Marker für diese lebereigenen Stammzellen bekannt [41]. Um die Hypothese der Ausbildung einer duktulären Reaktion zu untermauern, testeten wir deshalb eine Reihe von bekannten Markern für hepatische Progenitorzellen im Nagetier-Modell.

3.3.1 CK7 und CK19

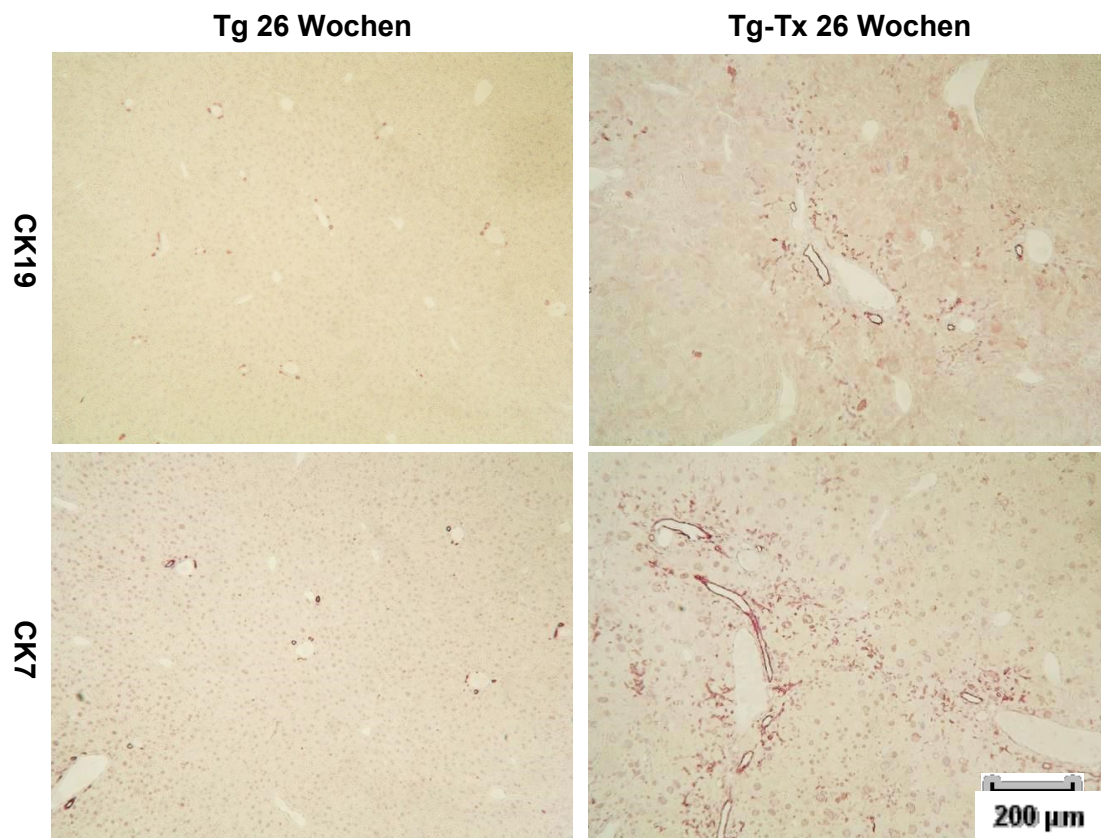


Abb. 32. Die KMT führte in Tg-Mäusen zu einer duktulären Reaktion. Starke Zunahme CK19-positiver Hepatozyten (oben rechts) und CK7- (unten rechts) nach KMT. In Tg-Mäusen (links oben und unten) kam es zu keiner duktulären Reaktion. IHC-Nachweis von CK19 und CK7.

Gallengänge sowie Gallengangsepithelien, die die Hering-Kanäle auskleiden, sowie eine duktiläre Reaktion bildende Zellen exprimieren unter anderem die Zytokeratine 7 (CK7) und 19 (CK19) [209]. Zudem wird CK7 auch in Hepatozyten gebildet wenn eine chronisch cholestatische hepatische Erkrankung voranschreitet. Es ist außerdem möglich, dass CK7- und CK19-positive Zellen im Hering-Kanal hepatische Vorgängerzellen repräsentieren [209].

In 26 Wochen alten Tg ließen sich mittels CK7 und CK19 die Gallengangsanschnitte in den portalen Zonen nachweisen (siehe Abb. 32). Es zeigte sich eine physiologische, homogene Verteilung der Gänge. In Tg lagen weder eine Duktopenie noch eine Proliferation von biliären Strukturen vor. In Tg-Tx kam es zur Änderung des Verteilungsmusters. Die Anzahl der CK7 sowie CK19-positiven Hepatozyten nahm stark zu. Die spezifisch gefärbten Zellen befanden sich nicht mehr nur auf die Portalzone beschränkt, sondern waren über weite Teile des Leberparenchyms verteilt. Die KMT bewirkte in Tg eine starke Gallengangsproliferation. Wie zuvor erwähnt, waren auch hepatische Progenitorzellen im Bereich der Hering-Kanäle CK7- und CK19-positiv. Deswegen fahndeten wir mit weiteren Antikörpern nach lebereigenen Vorläuferzellen.

3.3.2 Sox9

SRY (Sex Determining Region Y)-Box 9 (= Sox9) ist ein im Karyoplasma vorhandenes Protein, welchem viele verschiedene Funktionen nachgesagt werden. Seit längerem ist seine Rolle in der männlichen Sexualentwicklung bekannt. Außerdem gilt es als Marker für biliäre Stammzellen [210] sowie für die Entwicklung des pankreatikobiliären Systems [211]. Zudem wurde kürzlich entdeckt, dass Sox9 einen Regulator des proinflammatorischen Osteopontins darstellt [212]. In Hinblick auf die Eigenschaft als Stammzellmarker, wandten wir einen gegen Sox9 gerichteten Antikörper auf unsere Leberschnitte an (siehe Abb. 33).

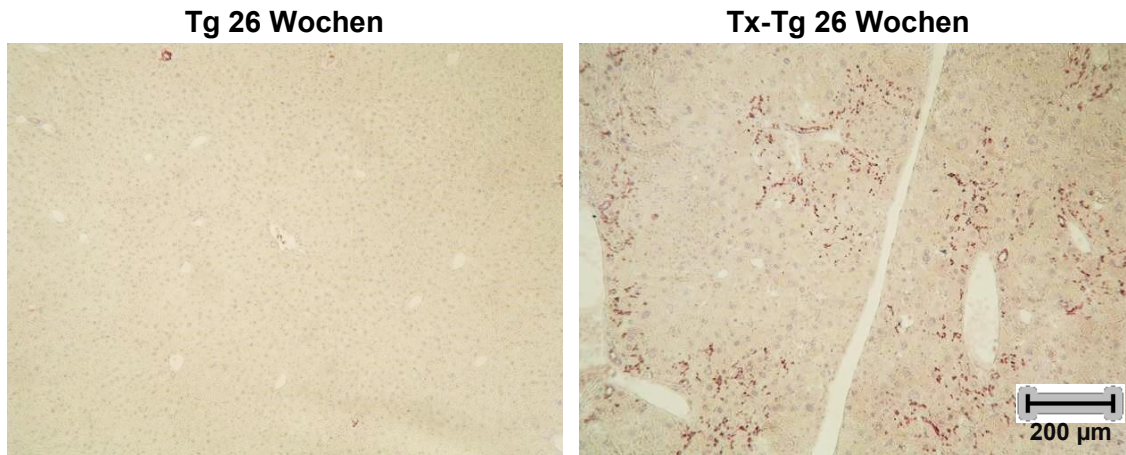


Abb. 33. Starke spezifische, periportale Akkumulation von hepatischen Progenitorzellen in Tg-Tx (rechts). Die KMT führte in Tg zur Entwicklung einer duktulären Reaktion. In der nicht-transplantierten Gruppe (links) zeigten sich keine Sox9-positiven Zellen. IHC-Nachweis Sox9.

In Tg zeigten sich höchstens vereinzelt positiv gefärbte Zellkerne. Im Rahmen der KMT in Tg allerdings, traten um die Portalfelder lokalisiert zahlreiche Sox9-positive Zellkerne in Erscheinung. Die Zellen waren partiell zu Gängen angeordnet, ferner fanden sie sich einzeln im Parenchym. Im Bereich um die Zentralvenen wurden nahezu keine Sox9-positive Zellen detektiert. Demzufolge konnte man auch in dieser immunhistologischen Untersuchung eine Proliferation von portal lokalisierten hepatischen Progenitorzellen in Tg-Tx nachweisen.

3.3.3 A6

Zum weiteren Nachweis hepatischer Progenitorzellen bzw. speziell der Ovalzellen verwendeten wir den Antikörper A6. Dieser wird auf Cholangiozyten sowie Ovalzellen exprimiert [41]. Nachgehend wurde deshalb zur besseren Unterscheidung dieser Zelltypen besonders auf die Morphologie sowie Lokalisation der gefärbten Zellen geachtet. In der Kontrollgruppe (Lm, Lm-Tx) kam es durch den Einsatz des Antikörpers A6 lediglich zur Anfärbung von Cholangiozyten (siehe Abb. 34). Diese fanden sich in Lm, Lm-Tx begrenzt in der portalen Zone. Im Alter von 52 Wochen zeigte sich bei Tg hingegen, schon eine deutliche höhere Anzahl an A6-positiven Zellen. Durch die KMT kam es in Tg zu einer massiven Zunahme A6-positiver Zellen. Diese beschränkten sich nun nicht mehr auf die portale Zone, sondern zogen von ihr ausgehend in Richtung Parenchym (siehe Ausschnitt Abb. 34). Bei diesen, weiter im Parenchym befindlichen Zellen handelt es sich um Ovalzellen. Diese Zellen bildeten keine geordneten Gallengänge mehr sondern befanden sich in Gruppen sowie solitär im Parenchym.

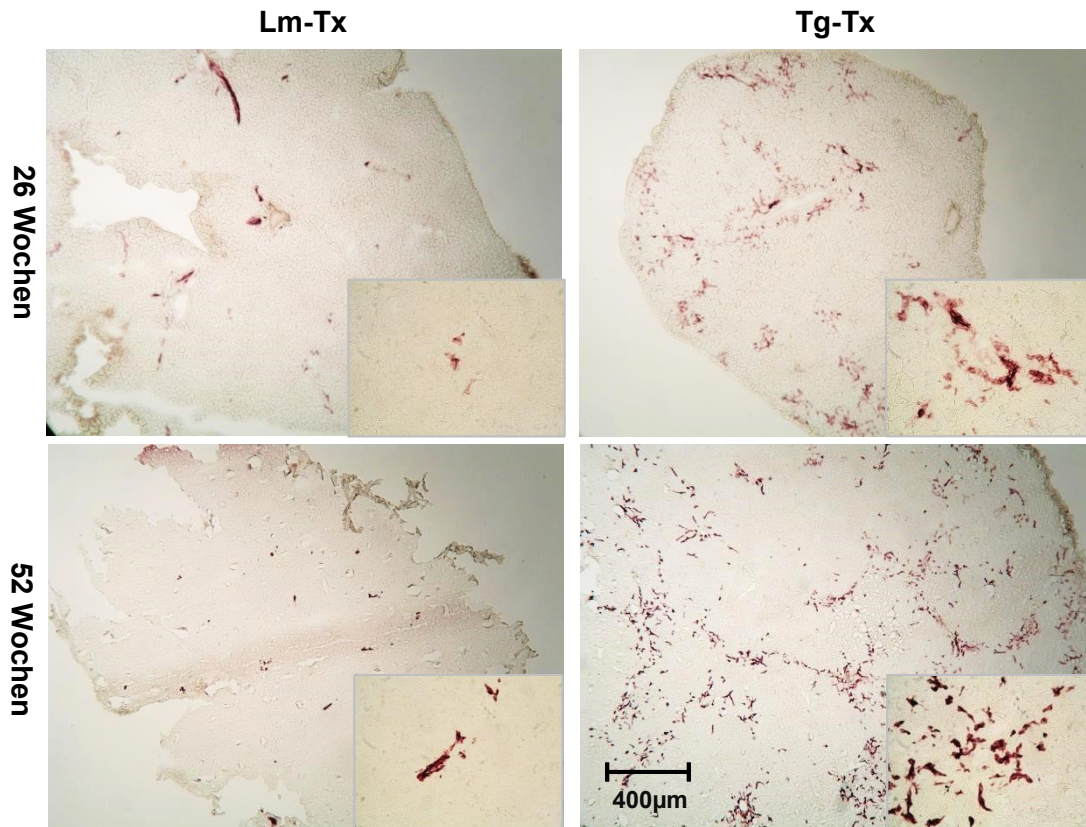


Abb. 34. Massive Zunahme von hepatischen Progenitorzellen in Tg durch KMT (rechts). Die Zunahme der Ovalzellen ging von den portalen Zonen der Tg-Tx-Gruppe aus. Die Ausschnitte zeigen jeweils eine repräsentative portale Zone. In Lm-Tx (links) kommt es zu keiner Zunahme von Ovalzellen durch die KMT (Vergleich zu Lm). IHC-Nachweis A6.

Die Befunde der immunhistochemischen Nachweise von CK7, CK19, Sox9 sowie A6 zusammengenommen, sprechen für eine durch die KMT ausgelöste starke Proliferation von Progenitorzellen in Tg-Tx. Aufgrund der im SABG-Assay festgestellten portal betonten Seneszenz durch die KMT in Tg, war es den Hepatozyten dort nicht möglich sich zu teilen und einen Gewebeverlust zu kompensieren. Die Leber reagierte darauf mit einer Proliferation von hepatischen Vorläuferzellen in der portalen Zone, der dukulären Reaktion.

4 DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals die Auswirkung einer syngenen Knochenmarktransplantation (KMT) auf eine HBV-bedingte Fibrose im Tiermodell demonstriert werden. Das Einbringen des HBV-Transgens führte in den Mäusen zu der Entwicklung einer Hepatitis sowie Fibrose, ähnlich einer chronischen Hepatitis B (CHB). An diesen Tieren wurde ein bereits in unserer Arbeitsgruppe etablierter therapeutischer Ansatz in Form einer KMT durchgeführt. Interessanterweise führte dieser Eingriff zu einer schädlichen Wirkung auf die hepatische Fibrose und andere allgemeine Funktionen der Leber transgener Tiere (Tg). Der in Tg durch die KMT hervorgerufene histopathologische Befund, gleicht dem einer fibrosierenden cholestatischen Hepatitis (FCH). So zeigten die Lebern der transgen-transplantierten Mäuse (Tg-Tx) eine periportal betonte Fibrose, eine Cholestase sowie eine ausgeprägte dukuläre Reaktion.

4.1 Charakterisierung der hepatischen Schädigung

In einer normal verlaufenden chronischen HBV-Infektion wirkt der Virus nicht direkt zytopathisch, d.h. sein Vorhandensein in einer Zelle schädigt diese nicht unmittelbar [78]. HBV bleibt dem angeborenen Immunsystem durch verschiedene ausweichende Mechanismen, wie z.B. die replikative Strategie der Integration des HBV-Genoms in das des Wirts, lange verborgen [213]. Das adaptive bzw. erworbene Immunsystem hingegen, kontrolliert die Virusaktivität unter anderem über eine HBV-spezifische, CD8⁺-T-Lymphozyten (CTL) vermittelte Clearance infizierter Hepatozyten. Der Untergang der Hepatozyten, setzt wiederum eine durch Chemokine gesteuerte Rekrutierung unspezifischer Entzündungszellen (z.B. Neutrophile Granulozyten) in Gang, welche den hepatozellulären Schaden vervielfacht [14, 79]. In einer älteren Untersuchung konnte gezeigt werden, dass die virale Clearance nicht immer zytopathisch abläuft. CTL besitzen die Fähigkeit, über eine Sekretion von IFN γ - und TNF- α in infizierten Hepatozyten für eine dauerhafte Viruselimination zu sorgen, ohne dabei Hepatozyten zu töten [75]. Im Gegensatz dazu steht die Pathogenese in den Tg-Mäusen. Sie sind, aufgrund des schon zur Embryogenese vorhandenen Transgens, tolerant gegenüber dem in ihrer Leber produzierten viralen Antigen (HBsAg) [173]. Es wird daher vermutet, dass der auftretende, mit dem Alter progrediente hepatische Zellschaden durch die exzessive Produktion von HBsAg sowie damit verbundene direkt zytopathische Effekte ausgelöst wird [127]. Diese Angaben decken sich mit den in unseren Versuchen gemachten Beobachtungen. Bei Mäusen im Alter von 26 Wochen wurde in jedem auf dem Objektträger sichtbaren Hepatozyten HBsAg im Überfluss produziert (siehe Kapi-

tel 3.1.4). Der in den Tg-Mäusen auftretende hepatozytäre Zelluntergang bzw. die konsekutiv entstehende Fibrose ließ sich in der Sirius-Rot-Färbung in allen Anschnitten der verschiedenen Leberlappen sehen (siehe Kapitel 3.1.2). Zusätzlich konnten wir bei der histologischen Analyse in der H&E-Färbung in Tg eine scheinbar dem Untergang der Hepatozyten folgende entzündliche Infiltration erkennen. Der Phänotyp der Hepatozyten der Tg-Mäuse war deutlich von dem der Kontrollgruppe (Lm) zu unterscheiden und demonstrierte Zeichen des *Large liver cell change* (LLCC). Diese nur mikroskopisch erkennbaren Läsionen finden sich in einer Vielzahl von chronischen Lebererkrankungen und beschreiben kleine Gruppen von vergleichsweise großen, hyperchromatischen Hepatozyten mit pleomorphen Nuklei [214]. Kim et al. [200] untersuchten LLCC verschiedener Ätiologie hinsichtlich des Potenzials zur Hepatokarzinogenese und kamen zum Schluss, dass spezifisch HBV-bedingter LLCC einen Risikofaktor für die hepatische Kanzerogenese darstellen könnte. Inwiefern dies für unser Modell zutrifft, bleibt jedoch fraglich, da das oft mit der Kanzerogenese in Zusammenhang gebrachte HBx [52] nicht in den hier verwendeten Tg-Mäusen exprimiert wird. Ebenso wie es die Erstbeschreiber des HBV-transgenen Mausmodells dokumentierten [127], ließ sich in Tg weder in der histologischen Analyse (Unversehrtheit der portalen Zone, kein Gallenpigment) noch in der Messung der Aktivität der alkalischen Phosphatase (AP) im Serum eine starke Cholestase erkennen.

4.2 Fibrogenese in cholestatischer Hepatitis

Die häufigste Komplikation einer CHB ist die Entwicklung einer Leberzirrhose [139]. Die therapeutischen Optionen einer hepatischen Zirrhose sind derzeit noch sehr limitiert. Im Endstadium bleibt oft nur die Lebertransplantation. In einigen klinischen [158, 215, 216] sowie tierexperimentellen Studien [18, 159, 160], konnte demonstriert werden, dass eine autologe KMT bei einer hepatischen Fibrose unterschiedlicher Genese zu einer Verbesserung der allgemeinen Leberfunktion bzw. des hepatischen Gradings führte. Jedoch ist die Studienlage nicht eindeutig. Einige Untersuchungen am Menschen konnten durch eine KMT keine Besserung der hepatischen Funktion erzielen [217, 218]. Die unterschiedlichen Ergebnisse der Untersuchungen liegen womöglich in der Heterogenität der Studiendesigns begründet. In den Studien wurden verschiedene Zellkompartimente des KM (z.B. aufgereinigte mesenchymale Zellen (MSC) oder nicht-selektierte KM-Zellen) bei Patienten mit unterschiedlicher Ätiologie einer Leberfibrose, in frühen oder späten Krankheitsstadien transplantiert. Überdies unterliegt der Verlauf einer hepatischen Fibrose, selbst innerhalb einer Krankheitsentität, einer hohen Variabilität (z.B. bei HCV-Infektion [219]). Bei Alkohol-induzierter hepatischer Zirrhose ist

zudem vorstellbar, dass manche Studienteilnehmer nicht abstinert blieben und nach KMT weiter tranken und so die Ergebnisse verfälschten [220]. Es wurden ebenfalls mehrere Studien durchgeführt in deren Patientenkollektiv unter anderem Teilnehmer mit HBV-bedingter Leberzirrhose inkludiert waren [180-183, 221-224]. Alle, in diesen Untersuchungen durchgeführten KMT waren autolog, d.h. Donor und Empfänger waren die gleiche Person. Der Einfluss der KMT auf allgemeine Leberfunktion - bestimmt anhand des Child-Pugh- oder MELD-Scores - sowie hepatische Histologie wurden in diesen Studien stets positiv bewertet.

In unseren Untersuchungen, konnten wir diese benefiziellen Beobachtungen nicht bestätigen. 12 Wochen alte HBV-transgene Mäuse wurden per Bestrahlung Knochenmark ablatiert und einer syngen KMT unterzogen (Tg-Tx), so dass man von einem kompletten Austausch des KM ausgehen konnte [187]. Später wurden die Mäuse im Alter von 26 bzw. 52 Wochen getötet und untersucht. Littermates (Lm) und transplantierte Littermates (Lm-Tx) zeigten zu keinem Zeitpunkt eine hepatische Inflammation, zelluläre Schädigung oder Fibrose. Tg-Mäuse wiesen eine entzündliche Infiltration sowie eine mit dem Alter progrediente Fibrose auf. Die Tg-Tx-Mäuse jedoch demonstrierten im Alter von 26 Wochen im Vergleich zu Tg-Mäusen ohne KMT einen nochmals aggravierten hepatischen Schaden. Die Verletzung des Parenchyms war an signifikant gesteigener Serum-ALT-Aktivität (siehe Kapitel 3.1.1 folgend), verschlechtertem Grading und Staging in der histopathologischen Untersuchung nach Desmet et al. [201], deutlich erhöhter Akkumulation von Kollagen sowie Aktivierung von hepatischen Sternzellen mit Nachweis von Desmin erkennbar. Weiterhin zeigte sich in der q-PCR-Analyse und auch auf Protein-Ebene, ein Wechsel zum ausgeprägten profibrotischen Phänotyp in Tg-Tx (siehe Kapitel 3.1.8). Fibrose-assoziierte Gene (z.B. Col1a1, MMP-7, TGF- β , TIMP-1) wurden in Tg-Tx stärker gegenüber Ihrer Kontrolle exprimiert als in Tg. In einem zusätzlich durchgeführten Hydroxyprolin-Assay, konnten allerdings keine signifikanten Unterschiede im Gesamt-Kollagengehalt der Lebern zwischen Tg-Tx und Tg festgestellt werden (siehe Kapitel 3.1.6). Die mit diesem Test quantifizierte Aminosäure Hydroxyprolin kommt fast ausschließlich in Kollagen vor [197]. Das diskrepante Ergebnis dieser Messungen, in Bezug auf die histologische Analyse, ließ sich am ehesten mit methodischen Mängeln des Hydroxyprolin-Assays wie mangelhafter Vergleichbarkeit von in unterschiedlichen Läufen gewonnen Ergebnissen erklären. Möglich ist aber auch eine unveränderte Gesamtkollagenmenge bei unterschiedlicher Verteilung des Kollagens und somit verschlechtertem Staging.

Neben der erhöhten Deposition von Kollagen, war in 26 Wochen alten Tg-Tx eine weitere pathologische Veränderung auffällig: die Versuchsgruppe zeigte erhöhte Cholestase-Marker [2]. Darunter fanden sich eine signifikant erhöhte Aktivität der Serum-

AP, eine portal sichtbare v.a. intrazelluläre Cholestase (H&E-Färbung, siehe Abb. 16), eine deutliche portal betonte Fibrose (Sirius-Rot-Färbung, siehe Abb. 20), eine ausgeprägte duktiläre Reaktion (sichtbar im immunhistologischen Nachweis von CK7, CK19, Sox9, A6 in Kapitel 3.3) sowie begleitend ein erhöhter hepatozellulärer Schaden (signifikant höhere ALT-Serum-Aktivität, siehe Kapitel 3.1.1). Mit Älterwerden der Tg-Tx-Mäuse jedoch, schwächte sich die Fibrose ab. Diese Befunde implizieren insgesamt eine durch die KMT ausgelöste, aggravierte hepatische Schädigung mit cholestatischer Komponente in Tg-Tx. Die ursprüngliche Hypothese, die der syngeneten KMT einen positiven Einfluss auf die hepatische Fibrose zuschrieb, musste verworfen werden.

Zur Aufklärung der zugrundeliegenden Mechanismen wurde der KMT-induzierte Schaden weiter analysiert. Die differenzielle Genexpression der Mäuse auf mRNA-Ebene wurde mit einem Microarray-Chip untersucht. Hierbei filterten wir interessante hoch- sowie herunterregulierte Gene der 26 Wochen alten Versuchsgruppe (Tg-Tx) gegenüber ihrer Kontrollgruppe heraus (Lm-Tx). Im zweiten Schritt verglichen wir die Expression der selektierten Gene aus dem HBV-Modell, mit einem Mausmodell der progressiv sklerosierenden Cholangitis, den *Abcb4*^{-/-}(*Mdr2*)-Knockoutmäusen (*Abcb4*^{-/-}) (siehe Kapitel 3.1.9). Unter physiologischen Bedingungen werden Phospholipide mit Hilfe des Transporters *Mdr2* aus Hepatozyten in die Gallenflüssigkeit abgegeben. Dies dient dazu die Gallensäuren weniger aggressiv zu machen und somit Cholangiozyten zu schützen. Das Fehlen dieses Transporters in *Abcb4*^{-/-} könnte zu einem Gallengangschaden und letztendlich zu einem Bild ähnlich der sklerosierenden Cholangitis führen. Dabei entwickeln *Abcb4*^{-/-} eine portale Inflammation, eine gesteigerte Expression von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α sowie profibrogenetischen Zytokinen (unter anderem TGF- β). Im Anschluss kommt es zur Aktivierung periduktaler Myofibroblasten, mit der Folge einer periduktalen Fibrose [203]. Bei einem Vergleich der 73 nach den in Kapitel 3.1.9 genannten Kriterien selektierten Genen, konnten wir eine erstaunliche Überschneidung von 94 % der hoch- bzw. herunterregulierten Gene zwischen Tg-Tx und *Abcb4*^{-/-} herausarbeiten. *Spp1*, welches für Osteopontin codiert, war in Tg-Tx am stärksten hoch reguliert (Fold Change in Tg-Tx zu Kontrolle: 13x; Fold Change in *Abcb4*^{-/-}: 10x). Osteopontin ist ein multifunktionales Protein und wird von einer Vielzahl von Zellen wie Immunzellen, Endothelzellen oder Hepatozyten produziert [204]. Es wird zu den pro inflammatorischen Zytokinen gezählt. Nakken et al. [205] untersuchten ebenfalls die Genexpression von *Abcb4*^{-/-}-Mäusen und fanden übereinstimmend Osteopontin, CTGF (*connective tissue growth factor*) sowie *Col1a1* hochreguliert. Die Autoren werteten die genannten Gene als Wundheilungs-assoziierte Faktoren. *Ly6d* (Lymphocyte antigen 6 complex, locus D), welches in Tg-Tx sowie *Abcb4*^{-/-} signifikant hochreguliert war, scheint auch für das Steatohepatitis-Modell fettreich ernährter ApoE-

defizienter Mäusen von Belang zu sein [225]. In Tg-Tx und *Abcb4*^{-/-} war darüber hinaus MMP7 stark hochreguliert. Diese Metalloprotease wird als negativer Prädiktor für den Verlauf eines Kolonkarzinoms sowie für die Lebermetastasierung gesehen. Es findet sich in ca. 90 % aller kolorektalen Adenokarzinome [226]. C-Jun ist ein wichtiger Regulator des Zellzyklus. Ein Fehlen von c-Jun führt in den betreffenden Zellen zu einem Zellzyklusarrest in der G1-Phase. Es ist darüber hinaus auch als Proto-Onkogen in der Kanzerogenese des HCC von großer Bedeutung [227]. In Tg-Tx- sowie *Abcb4*^{-/-}-Mäusen war c-Jun stark hoch reguliert. Dies steht vordergründig zunächst im Widerspruch zu der Hochregulation des Seneszenz-Markers p21 in Tg-Tx, da die Gene gegensinnig reguliert sind. Die Hochregulation von c-Jun führt zu einer Progression des Zellzyklus und p21-Hochregulation zu einem Zellzyklusarrest. Dieses Phänomen ist am ehesten damit zu erklären, dass nicht einzelne Hepatozyten, sondern ganze Lebern der Mäuse untersucht worden waren. Damit war keine regionale Unterscheidung (z.B. portale Gruppe seneszenten Hepatozyten versus Gruppe zentrilobulärer replikativ aktiver Hepatozyten) innerhalb der Leber möglich.

Viele endo- und exogene Substanzen werden mithilfe der hepatobiliären Ausscheidung eliminiert. Die dafür zuständigen Transporter-Gruppen gehören zu zwei Genfamilien: ABC-Transporter (engl. *ATP binding cassette* = ABC) sowie SLC-Transporter (engl. *Solute Carrier*, SLC) [228]. *Slco1a1* (*Solute carrier organic anion transporter family, member 1a1*) fand sich in Tg-Tx stark herunterreguliert und ist in *Abcb4*^{-/-} ebenfalls bedeutend supprimiert. In einer Studie mit *Citrobacter rodentium* induzierter Kolitis in Mäusen, wurde eine vermutlich IL-6 bedingte Herunterregulation von *Slco1a1* beobachtet [229]. Siewert et al. brachten IL-6 als wichtiges entzündliches, hepatisches Akute-Phase Zytokin bei einer ablaufenden Cholestase mit *Slcoa1a* in Verbindung. Interessanterweise fanden die Autoren nach IL-6-Administration eine starke *Slcoa1a*-Herunterregulation im Verbund mit anderen hepatischen Transportern wie *Mrp2*, *Mrp3* und *Bsep* [230]. Überdies war hierzu passend in Tg-Tx und *Abcb4*^{-/-} das Gen *Abca8a* (ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 8a) gemeinsam herunterreguliert. *Abca8a* ist ein noch relativ unbekanntes Mitglied der Familie der ABC-Transporter-Familie und scheint in der Leber unter anderem für die Detoxifikation von lipophilen Substanzen zuständig zu sein [231]. Diese Ergebnisse implizierten eine vermutlich entzündlich bedingte negative Regulation vieler hepatischer Transportergene. Es ist vorstellbar, dass die IL-6 vermittelte Herunterregulation der hepatischen Transporter die auftretende Cholestase bzw. portale Fibrose noch weiter verschlimmert hat. Zusammengenommen spiegeln die Befunde der Microarray-Analyse, ein in beiden Modellen ablaufendes breit gefächertes Schädigungs-Muster wieder. KMT in Tg-

Mäusen oder der Knockout des Gens *Abcb4* führten unter anderem zu einer Induktion von proinflammatorischen-, fibrose-assoziierten- und prokanzerogenen Genen.

Der Abgleich unserer Daten mit einer Microarray-Analyse im Mausmodell der Gallengangsligatur [232], ergab lediglich eine unterschiedliche Regulation des Gens *Cyp2c55* (Cytochrome P450, family 2, subfamily c, polypeptide 55). *Cyp2c55* war in Tg-Tx und *Abcb4*^{-/-} hochreguliert, wohingegen es im Gallengangsligatur-Modell herunterreguliert (Fold Change < 0,3x) war. Bei Betrachtung der Genexpression war zwischen den Modellen keine Analogie herstellbar. Die fehlende Gemeinsamkeit könnte in den unterschiedlichen Zeitpunkten der Probenentnahme begründet liegen. Die Untersuchung im Gallengangsligatur-Modell wurde schon zwei Tage nach Ligatur durchgeführt und spiegelt so frühe Wechsel in der Genexpression wieder. Die Analyse in unseren Versuchen fanden währenddessen erst im Alter von 8 Wochen bei *Abcb4*^{-/-} bzw. 26 Wochen für Tg statt. In einer weiteren Untersuchung [233], die sich mit dem Gallengangsligatur-Modell und der Genexpression beschäftigte, fanden sich 92 Gene die nach Gallengangsligatur einen Fold Change > 2x zu der Kontrollgruppe aufwiesen. Jedoch ergab sich auch hier beim Vergleich mit unseren Daten nur eine Übereinstimmung: *Mfge8* (Milk fat globule EGF factor 8, coagulation factor 8). Die Autoren zweier Studien postulierten einen positiven Einfluss von *Mfge8* im Rahmen einer ischämisch- [234] bzw. alkoholtoxisch- geschädigten [235] Mäuseleber. Drei weitere Gene (*MUP1*, *Lifr*, *Fmo3*) waren in unserem Modell herunterreguliert, im Gallengangsligatur-Modell jedoch hochreguliert. Die fehlende Übereinstimmung der Genexpressionsmuster, verdeutlichte die Ähnlichkeit des Zustands nach KMT in Tg-Mäusen mit dem *Abcb4*^{-/-}-Modell.

4.3 Fibrosierende cholestatische Hepatitis (FCH)

Die Entwicklung einer biliär induzierten hepatischen Fibrose in *Abcb4*^{-/-}-Mäusen und die weitreichende Überschneidung der stark regulierten Gene mit Tg-Tx, suggerierte einen ähnlichen Pathomechanismus wie in den einer KMT unterzogenen HBV-transgenen Mäusen. In diesem Zusammenhang rückte die fibrosierende cholestatische Hepatitis (FCH) in unseren Fokus. Dieses Krankheitsbild einer wiederkehrenden infektiösen Hepatitis (meist B- oder C-Infektion) wurde 1991 erstmals beschrieben [108] und anfangs mit allogenen Lebertransplantationen in Verbindung gebracht. Der Verlauf ist meist fulminant und endet oft innerhalb von vier bis neun Wochen im Leberversagen [111]. Aufgrund der wesentlichen Übereinstimmung vieler Aspekte des Krankheitsbilds, war von einer durch die KMT in Tg induzierten FCH auszugehen. Die von Lucey et al. [112] beschriebenen histopathologischen Kennzeichen umfassen hepatozelluläre

Schädigung, leichte entzündliche Infiltration und milde bis stark ausgeprägte periportale Fibrose. Ferner treten eine deutliche Schwellung der Hepatozyten („Ballonierung“), eine Cholestase sowie eine duktiläre Reaktion auf. Bemerkenswerterweise fanden sich alle dieser histologischen Kriterien in Tg-Tx-Mäusen. Ohne KMT demonstrierten die Tg-Mäuse zwar z.B. Zeichen des LLCC (große Hepatozyten), die cholestatische Komponente sowie die duktiläre Reaktion jedoch fehlten gänzlich. Die Pathogenese der Cholestase der FCH wird unter anderem auf eine gestörte Exkretion der Gallensäuren zurückgeführt. Es wird vermutet, dass es aufgrund der gestörten Ausscheidung zu den in der FCH beobachtbaren geschwollenen Hepatozyten (engl. *feathery degeneration*) kommt [124]. Die genaue Ursache könnte in dem plötzlichen, massiven Auftreten der FCH liegen. Dieses könnte unter anderem über eine Störung der Energiebereitstellung zu einem Versagen der ATP-abhängigen Gallensäuretransporter (ABC-Transporter) führen [124]. Korrespondierend dazu leiden *Abcb4*^{-/-}-Mäuse an einem Mangel eines ABC-Transporter. Dies führt zu einem Fehlen von Phosphatidylcholin in der sekretierten Galle. Die Gallensäurezusammensetzung der Mäuse wird dadurch aggressiver und greift die Cholangiozyten an. Die Ähnlichkeit der beiden Modelle (*Abcb4*^{-/-}-Mäuse und Tg-Tx-Mäuse mit KMT) bzw. die große Überschneidung der Genregulation könnte so hergeleitet werden.

Der genaue Auslöser bzw. die exakte Ätiologie der FCH ist noch unbekannt. Zwei Voraussetzungen scheinen jedoch vorhanden zu sein: eine virale hepatische Infektion und eine Immunsuppression. Die häufigsten Fälle einer FCH gibt es sicherlich nach Organtransplantationen mit Verbindung einer Immunsuppression (z.B. [114-122]), jedoch wurden in der Literatur auch vier Fälle nach einer Chemotherapie bedingten Immunsuppression in Verbindung mit viralen Hepatitiden beschrieben [236-239]. Ein weiterer begünstigender Faktor der Entwicklung einer FCH scheint ein hohe virale Replikation [110] zu sein. Weiterhin wird eine Infektion mit einer *Precore*-Mutante von HBV und eine damit verbundene hohe virale Replikation bzw. hohe HBV-DNA-Level mit der Entstehung einer FCH in Verbindung gebracht [121]. Einige Autoren vermuten die Entstehung der FCH liege in einer direkt zytopathischen Wirkung durch hohe virale Replikation mit exzessiver Produktion von HBsAg begründet [126, 240]. Dies würde ein Novum darstellen, da unter normalen Umständen HBV nicht als direkt zytopathisch gilt [74]. Die Beobachtungen aus unserem HBV-transgenen Modell konnten diese These nicht komplett stützen. In Tg-Mäusen, in deren Hepatozyten HBsAg ubiquitär exprimiert wird, kam es zwar zu einer messbaren, vermutlich zytopathisch bedingten hepatischen Schädigung [127], allerdings war diese vergleichsweise milde. Tg-Mäuse zeigten zudem keine Cholestase und keine duktiläre Reaktion. Der alleinige zytopathische Effekt von HBV reichte, zumindest im hier verwendeten Modell, nicht aus um ein schweres

Krankheitsbild wie die FCH auszulösen. Für die Pathogenese der FCH scheinen weitere Faktoren benötigt zu sein. Zu einem gravierenden Bild hepatischer Schädigung und Cholestase kam es erst durch die Immunsuppression und KMT in Tg.

4.4 Limitationen des Mausmodells

Eine Einschränkung unseres Modells war die fehlende Expression von HBc und HBx. HBc ist nicht im Transgen enthalten und wurde daher nicht in der Leber der Mäuse exprimiert. HBx ist hingegen im Transgen enthalten wurde aber ebenfalls nicht oder nur in sehr geringem Maße exprimiert. Das Vorhandensein von HBc wird teilweise für einen fulminanten Verlauf einer wiederkehrenden Hepatitis B nach Lebertransplantation verantwortlich gemacht, da CTL v.a. HBcAg-exprimierende Hepatozyten erkennen [241]. In Verbindung mit den oftmals HBcAg-reichen Hepatozyten bei Patienten mit FCH [113], könnte dies zu einem massiven Untergang von infizierten Hepatozyten führen. Leider war es aufgrund der methodischen Einschränkung (kein HBcAg im Mausmodell) nicht möglich hierüber eine Aussage zu treffen.

4.5 Hypothesen zum Ablauf der hepatischen Schädigung

Eine Hypothese zur Pathogenese der hepatischen Schädigung in unserem Mausmodell sieht wie folgt aus:

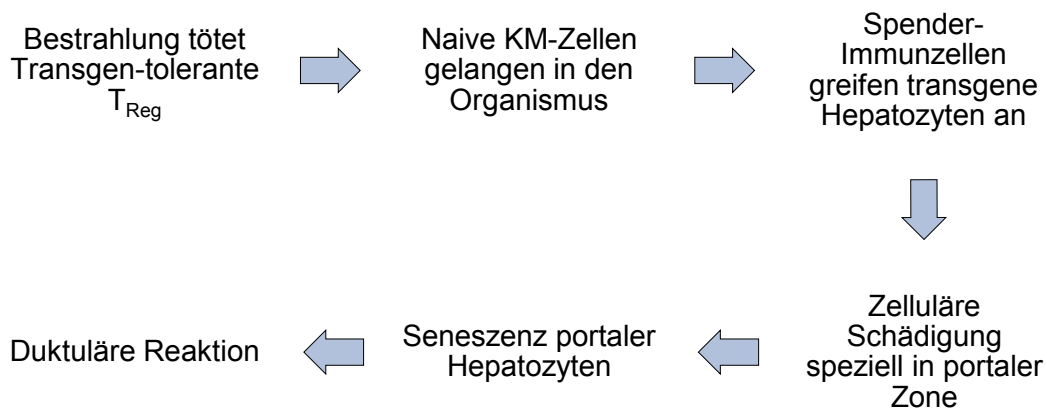


Abb. 35. Vermutete Pathogenese der FCH, ausgelöst durch eine KMT im HBV-transgenen Mausmodell. Die Entwicklung der FCH in Tg-Tx erfordert mehrere Schritte. Grundlage ist die Beseitigung der Toleranz gegenüber dem Transgen HBsAg mit anschließender Reaktion der naiven KM-Zellen mit den HBsAg-exprimierenden Hepatozyten.

1. Bestrahlung tötet Transgen-tolerante T_{Reg}

Eine tödliche Ganzkörperbestrahlung führte in transgenen Empfänger-Mäusen (Tg) zu einem Untergang des KM mit den dort ansässigen Progenitorzellen des lymphatischen Systems, inklusive der regulatorischen T-Zellen (T_{Reg}). T_{Reg} sind eine noch nicht lange bekannte Subpopulation der T-Zellen, die wichtig für die immunologische Selbst-Toleranz eines Organismus sind und somit möglicherweise Autoimmunerkrankungen zu unterdrücken vermögen [242]. Durch die tödliche Gamma-Bestrahlung mit 11 Gy wurde die Selbsttoleranz der transgenen Tiere gegenüber den leberspezifisch exprimierten HBV-Fragmenten aufgehoben. Interessanterweise postulierten Stoop et al. [243] einen immunsuppressiven Effekt der T_{Reg} auf HBV-spezifische T-Helferzellen (TH) in einer chronischen Infektion. In Ihrer Untersuchung konnten sie im Blut chronisch Infizierter eine erhöhte Anzahl von T_{Reg} gegenüber einer gesunden Kontrolle feststellen. Die Autoren schlossen darauf hin auf einen immunmodulatorischen Effekt der T_{Reg} zum Erhalt der Viruspersistenz durch Unterdrückung der Viruselimination. Dies untermauert unsere Annahme des negativen Einflusses der Strahlungs-induzierten Depletion der T_{Reg} . Durch den Untergang der HBV-toleranten T_{Reg} kam es einerseits zum Verlust der Toleranz gegenüber den in der Leber exprimierten HBV-Fragmenten und andererseits zum Wegfall des immunsuppressiven Einflusses der T_{Reg} auf die immunologische Antwort mit konsekutiv gesteigerter inflammatorischer Aktivität.

2. Naive KM-Zellen gelangen in den Organismus

Die Transplantation der KM-Zellen, isoliert aus gesunden GFP-exprimierenden Donor-Mäusen, erfolgte via Schwanzvene in die bestrahlten Empfänger-Mäuse. Die isolierten KM-Zellen waren HBV-naiv, hatten demnach noch keinen Kontakt zu dem in den Hepatozyten der Tg-Mäuse überexprimierten Transgen gehabt.

3. Spender-Immunzellen greifen transgene Hepatozyten an

Von der Schwanzvene gelangten die transplantierten KM-Zellen über die Portalvene erstmalig in die Leber. Im Wechselspiel mit anderen Zellen des Immunsystems griffen CTL die HBsAg-exprimierenden Hepatozyten an. Die nahezu ubiquitäre Expression von HBsAg in der Leber bot den CTL viele Angriffspunkte und zog einen großen Schaden nach sich. Eine Studie von Moriyama et al. [244] untermauert den Einfluss der CTL in einer Infektion mit HBV. In der Studie konnte mittels des adaptiven Transfers HBV-spezifischer CTL in das hier ebenfalls verwendete HBV-transgene Mausmodell gezeigt werden, dass CTL transgene Hepatozyten erkennen und zerstören. Ein diese These unterstützender Nebenaspekt ist das Auftreten von HBsAg-negativen Foci in Tg- und

Tg-Tx-Mäusen. In Tg traten die Foci erst im Alter von 52 Wochen vereinzelt auf. Der zugrundeliegende Mechanismus muss noch geklärt werden. Die Anzahl dieser HBsAg-freien Hepatozytenareale nahm jedoch durch die KMT in der Leber der Tg-Mäuse deutlich zu. Es ist zu vermuten, dass es durch die anhaltende CTL-vermittelte Zerstörung von HBsAg-positiven Hepatozyten, zu einer Proliferation HBV-Transgen-negativer hepatischer Progenitorzellen kam. Dieser Zelltyp hätte nun zu HBsAg-negativen Hepatozyten transdifferenzieren können und somit oben beschriebene HBsAg-negative Foci bilden können. Crawford et al. konnten diese Hypothese schon 2006 anhand von Laser-Mikrodissektion und anschließender DNA-Analyse ebenjener HBsAg-negativer Foci verifizieren [177]. Zusammengefasst spricht die gesteigerte Anzahl HBsAg-negativer Foci für eine CTL vermittelte, vermehrte Zerstörung von HBsAg-positiven Hepatozyten in Tg-Tx-Mäusen. Diese Vorgänge ähneln der tatsächlichen Situation in der menschlichen Leber von HBV Patienten. In dieser kommt es während der FCH, wahrscheinlich durch die hohe virale Replikation und einen möglicherweise direkt HBV-zytopathischen Effekt, zu hepatischer Schädigung. Zudem führt die große Anzahl an HBs- oder HBcAg exprimierenden Hepatozyten zu einem massivem CTL-induzierten Untergang von Hepatozyten [113].

4. Zelluläre Schädigung speziell in portaler Zone

Durch das Einwandern der nicht-HBV-toleranten Immunzellen aus dem Spenderorganismus via Schwanzvene über die Portalvene, entstand periportal der größte Leberschaden. Die periportal befindlichen HBsAg-positiven Hepatozyten nahmen als erste Kontakt mit den HBV-naiven KM-Zellen im Blutstrom auf. Diese HBsAg-positiven Hepatozyten wurden demnach zuerst erkannt und immunologisch attackiert. Dies führte in der Folge unter anderem zu einer deutlichen periportalen entzündlichen Aktivität und letztendlich zu einer portalen Fibrose (siehe 3.1.6). Eine weitere Konsequenz dieser hepatozytären Schädigung im Portalfeld war eine Beeinträchtigung der portal ablaufenden biliären Sekretion und Entgiftungsfunktion mit der Folge einer Cholestase.

5. Seneszenz portaler Hepatozyten

Die kontinuierliche Schädigung von portalen Hepatozyten zwang diese in einen arretierten Zellzyklus, die sogenannte Seneszenz einzutreten. Es wird geschätzt, dass während einer CHB täglich ca. 7 % aller infizierten Hepatozyten untergehen. Daraus ergibt sich eine hohe Teilungsrate mit replikativem Stress der Hepatozyten [245]. Im Rahmen der Hepatitis-C-Infektion wurde zusätzlich eine, mit einer hohen Teilungsrate verknüpften, Verkürzung der Telomere der Hepatozyten beschrieben [246]. Ab Eintre-

ten einer kritischen Telomerlänge schwenkt die betroffene Zelle in die Seneszenz ein und stoppt ihren Zellzyklus. Zusätzlich scheinen die Mitochondrien-reichen Hepatozyten oxidativem Stress vergleichsweise weniger gut standhalten zu können, so dass sie bei anhaltender Schädigung in einen unter anderem p21 vermittelten Zellzyklus-Arrest eintreten und somit die Fibrogenese beschleunigen [247]. In der vorliegenden Arbeit konnten wir in Tg-Tx-Mäusen eine Aktivierung der Zellzyklus-Inhibitoren p21 und p27 demonstrieren (siehe 3.2.2). Die Seneszenz, insbesondere der portalen Hepatozyten ist zudem bemerkenswert, da unter physiologischen Bedingungen bei parenchymalem Verlust die periportal lokalisierten Hepatozyten in die Teilung treten um den Gewebeerlust zu kompensieren. Eigentlich gelten deswegen zentrilobuläre Hepatozyten als differenzierter und der Seneszenz näher als portal gelegene Hepatozyten [248]. Seneszente Hepatozyten weisen ein geringeres Entartungsrisiko auf [200]. Die Seneszenz der Hepatozyten könnte somit als Schutz vor einer möglichen Karzinogenese verstanden werden.

6. Duktuläre Reaktion

Der hohe Zellumsatz periportal gelegener Hepatozyten und der damit verbundene Eintritt der Zellen in die Seneszenz, machte es für die Leber nötig alternative Quellen für den zellulären Ersatz des Parenchyms zu aktivieren. Diese Rolle fällt in Nagetieren den lebereigenen hepatischen Progenitorzellen, den sog. Ovalzellen zu. Diese bipotenten Zellen besitzen die Fähigkeit sich in Hepatozyten oder Cholangiozyten zu differenzieren [39]. Im Rahmen des Gewebeerersatzes unter andauernder hepatischer Schädigung, kommt es zu einer Expansion der Population von Progenitorzellen, der sogenannten duktulären Reaktion [249]. In einem Mausmodell der Steatohepatitis, konnte der vorgeschlagene Mechanismus der Ovalzell-Proliferation aufgrund einer Seneszenz der Hepatozyten schon demonstriert werden [250]. Die Regulation bzw. Proliferation von Progenitorzellen erfolgt in Wechselwirkung mit Ihrer Umgebung (z.B. Myofibroblasten, Laminin etc.) in einer speziellen Nische [251]. Interessanterweise wird die Proliferation von Progenitorzellen und deren Nische auch in Verbindung mit einer rapiden Fibrogenese bei der FCH gebracht [252].

4.6 Limitationen der Studie

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Mausmodell für eine Hepatitis B Infektion verwendet. Dies hat gegenüber Zellkulturen den wesentlichen Vorteil dass es z.B. Wechselwirkungen des Immunsystems mit dem Virus bzw. den Virusfragmenten im Organismus ermöglicht. Trotz guter investigativer Möglichkeiten, kann natürlich kein Anspruch

auf vollständige Übertragbarkeit der Vorgänge des Mausmodells auf die Situation beim menschlichen Patienten erhoben werden.

Eine weitere Limitation der Studie ist der Stichprobenumfang von $n = 5 - 15$ Mäusen pro Versuchs- oder Kontrollgruppe. Ein erhöhter Stichprobenumfang an Versuchstieren hätte die Ergebnisse noch konsistenter machen bzw. hätte die Standardabweichung senken können. Die aufwendige Haltung, Transplantation und Zucht vor allem der transgenen Mäuse, ließ jedoch leider keine höhere Anzahl an Versuchstieren zu.

Zudem wären mehr Untersuchungszeitpunkte der Mäuse als 26 und 52 Wochen von Vorteil gewesen. Gerade der Zustand der Leber der transgenen Tiere früh nach der KMT wäre von großem Interesse. Zu diesem Zeitpunkt läuft der schädigende Prozesse vermutlich ausgeprägter, als in dem von uns verwendetem Alter der Mäuse von 26 Wochen ab. Im Alter von 26 Wochen könnten viele der durch die KMT induzierten schädigenden Vorgänge schon nicht mehr aktiv sein.

Interessant wäre darüber hinaus eine zusätzliche Versuchsgruppe der KMT ohne Bestrahlung gewesen. Auch ohne vorherige Bestrahlung bzw. Immunsuppression könnte syngenes KM transplantiert werden. Es würde dann, nicht wie in der vorliegenden Arbeit ein kompletter Austausch des KM erfolgen, sondern lediglich „additives“ gesundes KM zum Organismus hinzugefügt werden. Die Situation würde eine autologe KMT der Mäuse simulieren. Mit dieser weiteren Versuchsgruppe hätte man die Möglichkeit z.B. die Auswirkungen einer autologen KMT ohne Bestrahlung auf die HBV-bedingte Fibrose im Mausmodell zu untersuchen.

4.7 Ausblick

Das Auftreten einer FCH bei Patienten unterliegt oft einem fulminanten Verlauf und ist mit einer hohen Mortalität verknüpft. Dennoch ist die Studienlage zu der seit 1991 bekannten Erkrankung sehr rar. Pathogenese, Verlauf und Therapie sind nicht gut verstanden. Die noch immer hohe Zahl von ca. 300 Millionen HBV-Infizierten weltweit sowie steigende Patientenzahlen, die aus unterschiedlichen Gründen wie einer Organtransplantation oder Chemotherapie unter Immunsuppression stehen, machen einen Handlungsbedarf deutlich. Der wirtschaftliche Aufschwung in Regionen mit hoher HBV-Prävalenz wie z.B. Asien und die damit verbundenen höheren Fallzahlen an Organtransplantationen könnten das Problem weiter verschärfen.

Die Entwicklung von Therapien leidet jedoch unter anderem an der mangelnden Verfügbarkeit eines geeigneten Modells zur Erforschung der FCH. In der vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal ein innovatives Mausmodell für die FCH vorgestellt werden, in welchem sich auf Grundlage einer HBV-transgenen Maus eine KMT-induzierte

DISKUSSION

FCH entwickelt. Dieses Modell könnte dazu beitragen, die Pathogenese der Erkrankung weiter zu erforschen. Daneben könnten Rückschlüsse über mögliche Auswirkungen der Synthese spezifischer Virusantigene (HBsAg etc.) auf Hepatozyten, wie eine direkte zytopathische Wirkung gezogen werden. Da es sich um ein in vivo Modell handelt, können zudem Interaktionen des Immunsystems mit dem Transgen und eingebrachten KM-Zellen analysiert werden. In weiteren Versuchen könnte z.B. die genaue Zusammensetzung des Entzündungsinfiltrates in Tg-Tx-Mäusen, speziell der Anteil der CTL, mittels Immunhistochemie eruiert werden. In einer weiteren Untersuchung könnte, das angewandte System z.B. auf eine HCV-transgene Maus übertragen werden. Damit könnten mögliche Analogien aufgedeckt oder Fragestellungen in Bezug auf die genaue Pathogenese, wie die direkt zytopathische Komponente beantwortet werden. Unserem Wissen nach konnte noch keine Arbeitsgruppe hepatische RNA aus FCH-Patienten einer Microarray-Analyse unterziehen. Mit unserer Untersuchung ist es gelungen eine Genexpressionsanalyse am Modell einer FCH durchzuführen. Die daraus resultierenden Erkenntnisse, wie die Herunterregulation der hepatischen Transporterproteine, deren Beteiligung an der Pathogenese der FCH sowie die mögliche Induktion des Prozesses durch IL-6 bedürfen allerdings einer weiterführenden Bestätigung. Erst danach wäre ein translationaler Ansatz denkbar. Mit der Identifizierung von spezifisch durch die FCH induzierten Genen lassen sich möglicherweise Angriffsziele für eine potentielle pharmakologische Therapie finden.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Weltweit leiden etwa 300 Millionen Menschen an einer chronischen Hepatitis B Infektion. Das Hepatitis B Virus (HBV) gehört damit zu den häufigsten Infektionskrankheiten. Das Endstadium der Erkrankung ist die Entwicklung einer hepatischen Zirrhose und eines hepatozellulären Karzinoms. Für beide Krankheitsbilder stellt HBV weltweit die häufigste Ursache dar. Die Behandlungsoptionen einer Leberzirrhose, wie z.B. die aufwendige und potentiell komplikationsreiche Lebertransplantation, sind nach wie vor (auch aufgrund fehlender Spenderorgane) sehr limitiert. Hoffnung machen neue Erkenntnisse auf dem Gebiet der Stammzellforschung bzw. Knochenmarktransplantation (KMT). Durch Transplantation gesunder multipotenter Stammzellen kann eine bereits fortgeschrittenen fibrotische Leber in ihrer Funktion und histologischen Architektur positiv beeinflusst werden.

In dieser Arbeit wurde der Einfluss einer syngenen KMT auf die hepatische Fibrose in einem HBV-transgenen Mausmodell (Tg) untersucht. Dazu wurden aus gesunden GFP-exprimierenden Mäusen KM-Zellen isoliert und in die Schwanzvenen der zuvor tödlich bestrahlten 12 Wochen alten HBV-transgenen Mäuse transplantiert (Tg-Tx). Als Kontrollgruppe dienten jeweils gesunde nicht-transplantierte (Lm) sowie transplantierte Wildtyp-Mäuse (Lm-Tx). Die Mäuse wurden im Alter von 26 sowie 52 Wochen getötet und untersucht.

Die allgemeine hepatische Funktion sowie das Ausmaß der Leberfibrose wurden anhand der Serumparameter Alanin-Aminotransferase (ALT) und alkalische Phosphatase (AP), der Quantifizierung des hepatischen Hydroxyprolin-Gehalts sowie dem Nachweis verschiedener Fibrose-assoziiierter Gene mittels q-PCR (col1a1, MMPs, TIMP etc.) erfasst. Die Histologie bzw. Immunhistochemie stellte bei der Charakterisierung der hepatischen Schädigung eine zentrale Methode dar. Die Untersuchungen beinhalteten histologische Analysen mittels H&E-Färbung, Fibrose-spezifische Anwendungen wie die Sirius-Rot-Färbung, Nachweis von Desmin-positiven hepatischen Sternzellen (HSC), HBsAg-positiven Hepatozyten, A6-exprimierenden Ovalzellen etc. Das Gelingen der KMT wurde durch den immunhistologischen Nachweis von GFP überprüft. Die histologische Erfassung von p21, p27 und des Seneszenz-assoziierten Beta-Galaktosidase (SABG)-Assays dienten dazu den Status des Zellzyklus zu untersuchen. Zusätzlich wurde eine Microarray-Genexpressionsanalyse des kompletten Mäusegenoms durchgeführt. Die Ergebnisse wurden anschließend mit einem gut etabliertem Modell der sklerosierenden Cholangitis, der *Abcb4*-Knockout-Maus (*Abcb4*^{-/-}), verglichen.

ZUSAMMENFASSUNG

Überraschenderweise zeigte sich, dass die KMT in HBV-transgenen Mäusen zu einer Aggravierung der hepatischen Fibrose führte. Tg-Tx demonstrierten gegenüber Lm, Lm-Tx sowie Tg signifikant gestiegene ALT-Werte, ein verschlechtertes Grading und Staging nach Desmet in H&E- und Sirius-Rot-Färbung sowie eine erhöhte Expression von Desmin im Sinne einer vermehrten Aktivierung von HSCs. In der Sirius-Rot-Färbung registrierten wir eine generell gestiegene Kollagendeposition, zusätzlich war diese besonders periportal lokalisiert. Darüber hinaus wurde eine signifikante Cholestase in Tg-Tx apparent. Die Hochregulation von profibrotischen bzw. proinflammatorischen Genen wie TIMP-1, MMPs, TGF- β , Cola1a unterstützte den Befund der aggravierten hepatischen Fibrose. Tg-Tx-Mäuse demonstrierten, aufgrund einer Einschränkung der Regenerationsfähigkeit, einen erhöhten Anteil seneszenten, sich im arretierten Zellzyklus befindlicher Hepatozyten. Da die seneszenten Hepatozyten insbesondere portal lokalisiert waren, schlossen wir auf eine mögliche duktiläre Reaktion (Proliferation von hepatischen Progenitorzellen in der portalen Zone). Mithilfe des immunhistochemischen Nachweises hepatischer Progenitorzellen anhand von CK7, CK19, Sox9 und A6 konnten wir in Tg-Tx eine ausgeprägte duktiläre Reaktion nachweisen.

Ein Micro-Array-Vergleich der Genregulation von Tg-Tx mit *Abcb4*^{-/-}-Mäusen, offenbarte eine erstaunliche Übereinstimmung der Expression bestimmter Gene (proinflammatorisch, profibrinogen, prokanzerogen). Die Microarray-Ergebnisse suggerierten einen ähnlichen Pathomechanismus beider Mausmodelle. Bei der anschließenden Analyse und Recherche rückte die fulminant verlaufende, unter Immunsuppression wiederkehrende infektiöse Hepatitis, die sog. fibrosierende cholestatische Hepatitis (FCH) in unseren Fokus. Tg-Tx-Mäuse wiesen wesentliche Merkmale einer FCH, wie hepatische Inflammation, milde bis stark ausgeprägte periportale Fibrose, Schwellung der Hepatozyten, Cholestase sowie eine duktiläre Reaktion auf.

Die Folge einer KMT in HBV-transgenen Mäusen ist demnach die Entwicklung einer FCH. Wir haben somit erstmals ein murines Modell entwickelt welches das Krankheitsbild der FCH weitgehend simuliert. An unserem Modell können nun molekularpathologische und zelluläre Mechanismen sowie Therapieansätze der FCH untersucht werden.

6 SUMMARY

Worldwide about 300 million people suffer from chronic hepatitis B infection. The Hepatitis B virus (HBV) is therefore one of the most common infectious diseases. The end stage of the disease is the development of hepatic cirrhosis and hepatocellular carcinoma. HBV is the most common cause for both diseases. Treatment options of liver cirrhosis, such as the complicated and possibly dangerous liver transplantation are still (also because of missing donor organs) very limited. New developments in the field of stem cell research or bone marrow transplantation (BMT) give new hope. A fibrotically advanced liver can be positively influenced in its function and histological architecture via the transplantation of healthy multipotent stem cells.

In this study we examined the influence of syngenic BMT on hepatic fibrosis in a HBV-transgenic mouse model (Tg). BM-cells from healthy GFP-expressing donor mice were isolated and injected in the tail veins of lethally irradiated 12 week old HBV-transgenic mice (Tg-Tx). Healthy non-transplanted littermates (Lm) and transplanted-littermates (Lm-Tx) served as controls. The mice were sacrificed and analyzed at the age of 26 and 52 weeks. Overall hepatic function and the extent of liver fibrosis was assessed using serum parameters alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (AP), quantification of hepatic hydroxyproline content and detection of various fibrosis related genes in q-PCR (col1a1, MMPs, TIMP etc.). Histology and immunohistochemistry played important roles in the characterization of hepatic injury. Investigations were conducted via histological analysis in H&E staining, fibrosis-specific applications such as the Sirius-red staining, detection of desmin positive hepatic stellate cells (HSC), HBsAg positive hepatocytes, A6 expressing oval cells etc. Success of BMT was verified by immunohistochemical staining of GFP. Cell cycle state was investigated by histological detection of p21, p27 and the senescence-associated beta-galactosidase (SABG)-assay. Additionally we conducted a micro-array gene expression analysis of the whole mouse genome. The results were then compared with a well-established mouse model of sclerosing cholangitis, the *Abcb4*-knockout-mouse (*Abcb4*^{-/-}).

Surprisingly BMT in HBV-transgenic mice led to an aggravation of hepatic fibrosis. Tg-Tx demonstrated significant ALT elevation compared to Lm, Lm-Tx and Tg, deteriorated grading and staging in histological analysis in H&E- and Sirius-red staining plus a heightened expression of desmin, demonstrating activation of HSCs. Sirius-red staining revealed a general increase in collagen deposition. Additionally collagen was localized preferably in the periportal region. Moreover we could observe a significant cholestasis in Tg-Tx. Upregulation of pro-fibrotic and pro-inflammatory genes such as TIMP-1, MMPs, TGF- β , and *Cola1a* in q-PCR supported the aggravated hepatic fibrosis. Im-

SUMMARY

pairment of regeneration led to increased numbers of senescent hepatocytes in Tg-Tx mice. The senescent hepatocytes were found specifically in the periportal region, this implied the existence of a ductular reaction (proliferation of hepatic progenitor cells in the portal region). Immunohistochemical findings of CK7, CK19, Sox9 and verified a marked ductular reaction in Tg-Tx.

Comparison of gene regulation in Tg-Tx and *Abcb4*^{-/-} via micro-array revealed an astonishing similarity in the expression of selected genes (pro-inflammatory, pro-fibrotic and pro-oncogenic). Micro-array results suggested a similar pathomechanism of both mouse models. In the following analysis and investigation fibrosing cholestatic hepatitis (FCH) moved in to our focus. FCH is a fulminant form of recurring infectious hepatitis under immunosuppression. Tg-Tx mice displayed essential characteristics of FCH, like hepatic inflammation, mild to marked periportal fibrosis, feathery degeneration of hepatocytes, cholestasis and ductular reaction.

Therefore BMT in HBV-transgenic mice leads to the development of FCH. We have for the first time developed a murine model, which simulates the disease pattern of FCH to a large extent. With our model it is now possible to investigate molecular pathological and cellular mechanism as well as new therapeutic approaches of FCH.

7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
ABC-Transporter	<i>ATP binding cassette-Transporter</i>
Abcb4 ^{-/-}	Abcb4-Knockoutmaus
AFP	Alpha-1-fetoprotein
AHB	akute Hepatitis B
ALT	Alanin-Aminotransferase
AP	Alkalische Phosphatase
AST	Aspartat-Aminotransferase
Aqua dest.	destilliertes Wasser
BL	B-Lymphozyten
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cccDNA	<i>covalently closed circular DNA</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CHB	chronische Hepatitis B
CK	Zytokeratin
CTL	CD8 ⁺ -zytotoxische T-Lymphozyten
CTGF	<i>connective tissue growth factor</i>
DNase	Desoxyribonuklease
dsDNA	doppelsträngige DNA
d.h.	das heißt
ECM	extrazelluläre Matrix
EMT	epitheliale mesenchymale Transition
ER	endoplasmatisches Retikulum
Fa.	Firma
FCH	Fibrosierende cholestatische Hepatitis
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
h	Stunde
HBcAg	Hepatitis B <i>core</i> antigen

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

HBeAg	Hepatitis B <i>envelope</i> antigen
HBsAg	Hepatitis B <i>surface</i> antigen
HBxAg	Hepatitis B x antigen
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
H&E	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HPC	hämatopoetische Stammzellen
HSC	Hepatische Sternzelle
Hyp	Hydroxyprolin
IFN	Interferon
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
Int	(Signal-) Intensität
kb	Kilobase
KM	Knochenmark
KMT	Knochenmarktransplantation
LHB	<i>large</i> Hepatitis B <i>surface</i> antigen
LLCC	<i>Large liver cell change</i>
L-Tx	Leber-Transplantation
Lm	Littermate (Kontrollgruppe)
Lm-Tx	Transplantierte-Littermate Mäuse
MF	Myofibroblasten
mg	Milligramm
MHB	<i>medium</i> Hepatitis B <i>surface</i> antigen
min	Minute
ml	Milliliter
mmol	Millimol
MMP	Matrix-Metalloproteasen
mRNA	<i>messenger</i> RNA
MSC	mesenchymale Stammzelle
NK	Natürliche Killerzellen
NKT	Natürliche Killer-T-Zellen
nm	Nanometer

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

NNRTI	Nichtnukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren
OZ	Ovalzellen
pgRNA	Prägenomische RNA
q-PCR	quantitative <i>polymerase chain reaction</i>
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
rcDNA	<i>relaxed circular partially double-stranded DNA</i>
RNase	Ribonuklease
RT	reverse Transkriptase
SABG	Seneszenz-assoziiierter beta-Galaktosidase Assay
SHPC	<i>small hepatocyte-like progenitor cells</i>
SHB	<i>small Hepatitis B surface antigen</i>
sog.	so genannt
SVP	<i>sub viral particle</i>
Tg	HBV-transgene Mäuse
Tg-Tx	Transplantiert-transgene Mäuse
TGF- β	<i>transforming growth factor beta</i>
TIMP	<i>tissue inhibitors of metalloproteinases</i>
TL	T-Lymphozyten
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
T _{Reg}	Regulatorische T-Zellen
Tx	Transplantation
Vergr.	Vergrößerung
v.a.	vor allem
u.a.	unter anderem
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ mol	Mikromol
z.B.	Zum Beispiel
z.T.	Zum Teil

8 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1. Gliederung der Leber in verschiedene Baueinheiten.	2
Abb. 2. Übersicht und Feinbau der gesunden Leber.....	3
Abb. 3. Übersicht und Feinbau der zirrhotischen Leber.	4
Abb. 4. Mögliche Zell-Populationen der Produktion von ECM	5
Abb. 5. Struktur und Genom von HBV.....	8
Abb. 6. Replikationszyklus von HBV in der Wirtszelle.	11
Abb. 7. Überblick über den Verlauf viraler Marker einer HBV-Infektion	14
Abb. 8. Phasen der CHB.....	15
Abb. 9. Histopathologische Kennzeichen der FCH	18
Abb. 10. Auftrennung der mRNA in 28S- und 18S-Fraktion.	36
Abb. 11. Prinzip der q-PCR mit SYBR Green	39
Abb. 12. Temperaturprofil der PCR.	41
Abb. 13. Erfassung des Leberschadens mittels Serum-Alt	49
Abb. 14. Histologische Untersuchung der Lm- und Tg-Mäuse.....	50
Abb. 15. Histologische Untersuchung der Lm-Tx und Tg-Tx Mäuse.....	51
Abb. 16. Ausschnitt portale Zone aus 52 Wochen alten Tg-Tx	52
Abb. 17. Hoch signifikante Elevation der AP in Tg	53
Abb. 18. Die unterschiedliche Expression von HBV-Oberflächenproteinen in der Leber	55
Abb. 19. Expression von GFP-positiven Zellen in der Leber von Lm-Tx und Tg-Tx-Mäusen	56
Abb. 20. Portal betonte Fibrose in 26 Wochen alten Tg-Tx-Mäusen.....	57
Abb. 21. Verstärkte Kollagenablagerung in Tg und Tg-Tx.	58
Abb. 22. Signifikant erhöhter hepatischer Hydroxyprolinegehalt in Tg und Tg-Tx- Mäusen.....	59
Abb. 23. Tg und Tg-Tx zeigten Aktivierung bzw. Proliferation von hepatischen Sternzellen.....	59
Abb. 24. Hochregulation von Fibrose-assoziierten Genen in 26 Wochen alten Tg und Tg-Tx....	61
Abb. 25. Hochregulation von Fibrose-assoziierten Genen in 52 Wochen alten Tg und Tg-Tx....	62
Abb. 26. Aufbau des Vergleichs der Microarray-Daten	63
Abb. 27. Übereinstimmen der Ergebnisse von q-PCR und Microarray.	68
Abb. 28. Hepatozyten in Tg-Tx-Mäusen demonstrierten starke Anreicherung von SABG.....	70
Abb. 29. Periportal gelegene Hepatozyten zeigten ausgeprägte Anreicherung von SABG	71
Abb. 30. Starke Expression der Seneszenz-Marker p21 und p27 in Tg-Tx.	72
Abb. 31. Starke Expression der Seneszenz-Marker p21 und p27 in Tg-Tx, Ausschnitte.	72
Abb. 32. KMT führte in Tg-Mäusen zu duktilärer Reaktion	74
Abb. 33. Periportale Akkumulation von hepatischen Progenitorzellen in Tg-Tx.	76
Abb. 34. Zunahme von hepatischen Progenitorzellen in Tg durch KMT.....	77
Abb. 35. Vermutete Pathogenese der FCH.	85

9 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1. Auflistung der verwendeten Mauslinien	25
Tabelle 2: In der Immunhistochemie verwendete sekundäre Antikörper	30
Tabelle 3: In der q-PCR verwendete Primer sowie deren Annealingtemperatur.	41
Tabelle 4. In der Genotypisierung verwendete Primer.....	43
Tabelle 5. Gemeinsam hochregulierte Gene in Tg-Tx und Abcb4 ^{-/-}	65
Tabelle 6. Gemeinsam herunterregulierte Gene in Tg-Tx und Abcb4 ^{-/-}	67
Tabelle 7. Differenziell regulierte Gene in Tg-Tx und Abcb4 ^{-/-}	67

10 LITERATURVERZEICHNIS

1. Dandri, M. and S. Locarnini, *New insight in the pathobiology of hepatitis B virus infection*. Gut, 2012. **61**(Suppl 1): p. i6-i17.
2. Kuntz, E. and H.-D. Kuntz, eds. *Hepatology Textbook and Atlas : History · Morphology Biochemistry · Diagnostics Clinic · Therapy*. SpringerLink : Bücher. 2008, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. Online-Ressource (digital).
3. Xu, C.S., X.G. Chen, C.F. Chang, G.P. Wang, W.B. Wang, L.X. Zhang, Q.S. Zhu, and L. Wang, *Differential gene expression and functional analysis of pit cells from regenerating rat liver*. Genet Mol Res, 2011. **10**(2): p. 678-92.
4. Welsch, U. and T. Deller, *Lehrbuch Histologie*. 3. Aufl. ed, ed. J. Sobotta. 2010, München: Elsevier, Urban & Fischer.
5. McCuskey, R.S., *The hepatic microvascular system in health and its response to toxicants*. Anat Rec (Hoboken), 2008. **291**(6): p. 661-71.
6. Bataller, R. and D.A. Brenner, *Liver fibrosis*. J Clin Invest, 2005. **115**(2): p. 209-18.
7. Tacke, F. and R. Weiskirchen, *Update on hepatic stellate cells: pathogenic role in liver fibrosis and novel isolation techniques*. Expert Rev Gastroenterol Hepatol, 2012. **6**(1): p. 67-80.
8. Iwaisako, K., D.A. Brenner, and T. Kisseleva, *What's new in liver fibrosis? The origin of myofibroblasts in liver fibrosis*. J Gastroenterol Hepatol, 2012. **27 Suppl 2**: p. 65-8.
9. Blachier, M., H. Leleu, M. Peck-Radosavljevic, D.C. Valla, and F. Roudot-Thoraval, *The burden of liver disease in Europe: a review of available epidemiological data*. J Hepatol, 2013. **58**(3): p. 593-608.
10. Xu, R., Z. Zhang, and F.S. Wang, *Liver fibrosis: mechanisms of immune-mediated liver injury*. Cell Mol Immunol, 2012. **9**(4): p. 296-301.
11. Rodriguez, D., C.J. Morrison, and C.M. Overall, *Matrix metalloproteinases: what do they not do? New substrates and biological roles identified by murine models and proteomics*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1803**(1): p. 39-54.
12. Brew, K. and H. Nagase, *The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1803**(1): p. 55-71.
13. Patel, T., L.R. Roberts, B.A. Jones, and G.J. Gores, *Dysregulation of apoptosis as a mechanism of liver disease: an overview*. Semin Liver Dis, 1998. **18**(2): p. 105-14.
14. Jaeschke, H., *Inflammation in response to hepatocellular apoptosis*. Hepatology, 2002. **35**(4): p. 964-966.
15. Hernandez-Gea, V. and S.L. Friedman, *Pathogenesis of liver fibrosis*. Annu Rev Pathol, 2011. **6**: p. 425-56.
16. Eyden, B., *The myofibroblast: phenotypic characterization as a prerequisite to understanding its functions in translational medicine*. J Cell Mol Med, 2008. **12**(1): p. 22-37.
17. Hautekeete, M.L. and A. Geerts, *The hepatic stellate (Ito) cell: its role in human liver disease*. Virchows Arch, 1997. **430**(3): p. 195-207.
18. Roderfeld, M., T. Rath, R. Voswinckel, C. Dierkes, H. Dietrich, D. Zahner, J. Graf, and E. Roeb, *Bone marrow transplantation demonstrates medullar origin of CD34+ fibrocytes and ameliorates hepatic fibrosis in Abcb4-/- mice*. Hepatology, 2010. **51**(1): p. 267-76.
19. Forbes, S.J., F.P. Russo, V. Rey, P. Burra, M. Rugge, N.A. Wright, and M.R. Alison, *A significant proportion of myofibroblasts are of bone marrow origin in human liver fibrosis*. Gastroenterology, 2004. **126**(4): p. 955-63.
20. Higashiyama, R., T. Moro, S. Nakao, K. Mikami, H. Fukumitsu, Y. Ueda, K. Ikeda, E. Adachi, G. Bou-Gharios, I. Okazaki, and Y. Inagaki, *Negligible contribution of bone*

LITERATURVERZEICHNIS

- marrow-derived cells to collagen production during hepatic fibrogenesis in mice.* Gastroenterology, 2009. **137**(4): p. 1459-66.e1.
21. Dranoff, J.A. and R.G. Wells, *Portal fibroblasts: Underappreciated mediators of biliary fibrosis.* Hepatology, 2010. **51**(4): p. 1438-44.
 22. Zeisberg, M. and J.S. Duffield, *Resolved: EMT produces fibroblasts in the kidney.* J Am Soc Nephrol, 2010. **21**(8): p. 1247-53.
 23. Pinzani, M., *Epithelial-mesenchymal transition in chronic liver disease: fibrogenesis or escape from death?* J Hepatol, 2011. **55**(2): p. 459-65.
 24. Zeisberg, M., C. Yang, M. Martino, M.B. Duncan, F. Rieder, H. Tanjore, and R. Kalluri, *Fibroblasts derive from hepatocytes in liver fibrosis via epithelial to mesenchymal transition.* J Biol Chem, 2007. **282**(32): p. 23337-47.
 25. Chu, A.S., R. Diaz, J.J. Hui, K. Yanger, Y. Zong, G. Alpini, B.Z. Stanger, and R.G. Wells, *Lineage tracing demonstrates no evidence of cholangiocyte epithelial-to-mesenchymal transition in murine models of hepatic fibrosis.* Hepatology, 2011. **53**(5): p. 1685-95.
 26. Taura, K., K. Miura, K. Iwaisako, C.H. Osterreicher, Y. Kodama, M. Penz-Osterreicher, and D.A. Brenner, *Hepatocytes do not undergo epithelial-mesenchymal transition in liver fibrosis in mice.* Hepatology, 2010. **51**(3): p. 1027-36.
 27. Marra, F., *Chemokines in liver inflammation and fibrosis.* Front Biosci, 2002. **7**: p. d1899-914.
 28. Gressner, A.M., R. Weiskirchen, K. Breitkopf, and S. Dooley, *Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis.* Front Biosci, 2002. **7**: p. d793-807.
 29. Nakatsukasa, H., P. Nagy, R.P. Everts, C.C. Hsia, E. Marsden, and S.S. Thorgeirsson, *Cellular distribution of transforming growth factor-beta 1 and procollagen types I, III, and IV transcripts in carbon tetrachloride-induced rat liver fibrosis.* J Clin Invest, 1990. **85**(6): p. 1833-43.
 30. Hellerbrand, C., B. Stefanovic, F. Giordano, E.R. Burchardt, and D.A. Brenner, *The role of TGFbeta1 in initiating hepatic stellate cell activation in vivo.* J Hepatol, 1999. **30**(1): p. 77-87.
 31. Flisiak, R., P. Maxwell, D. Prokopowicz, P.M. Timms, and A. Panasiuk, *Plasma tissue inhibitor of metalloproteinases-1 and transforming growth factor beta 1--possible non-invasive biomarkers of hepatic fibrosis in patients with chronic B and C hepatitis.* Hepatogastroenterology, 2002. **49**(47): p. 1369-72.
 32. Moore, K.W., R. de Waal Malefyt, R.L. Coffman, and A. O'Garra, *Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor.* Annu Rev Immunol, 2001. **19**: p. 683-765.
 33. Zhang, L.J., W.D. Zheng, Y.X. Chen, Y.H. Huang, Z.X. Chen, S.J. Zhang, M.N. Shi, and X.Z. Wang, *Antifibrotic effects of interleukin-10 on experimental hepatic fibrosis.* Hepatogastroenterology, 2007. **54**(79): p. 2092-8.
 34. Munshi, M.K., M.N. Uddin, and S.S. Glaser, *The role of the renin-angiotensin system in liver fibrosis.* Exp Biol Med (Maywood), 2011. **236**(5): p. 557-66.
 35. Lu, P., H. Liu, H. Yin, and L. Yang, *Expression of angiotensinogen during hepatic fibrogenesis and its effect on hepatic stellate cells.* Med Sci Monit, 2011. **17**(9): p. Br248-56.
 36. Higgins G, A.R., *Experimental Pathology of the Liver. I. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal.* Arch Path, 1931. **01**(12): p. 16.
 37. Vig, P., F.P. Russo, R.J. Edwards, P.J. Tadrous, N.A. Wright, H.C. Thomas, M.R. Alison, and S.J. Forbes, *The sources of parenchymal regeneration after chronic hepatocellular liver injury in mice.* Hepatology, 2006. **43**(2): p. 316-24.
 38. Wang, X., M. Foster, M. Al-Dhalimy, E. Lagasse, M. Finegold, and M. Grompe, *The origin and liver repopulating capacity of murine oval cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100** Suppl 1: p. 11881-8.

LITERATURVERZEICHNIS

39. Yovchev, M.I., P.N. Grozdanov, H. Zhou, H. Racherla, C. Guha, and M.D. Dabeva, *Identification of adult hepatic progenitor cells capable of repopulating injured rat liver*. Hepatology, 2008. **47**(2): p. 636-47.
40. Farber, E., *Similarities in the Sequence of Early Histological Changes Induced in the Liver of the Rat by Ethionine, 2-Acetylamino-fluorene, and 3'-Methyl-4dimethylaminoazobenzene*. Cancer Research, 1956. **16**(2): p. 142.
41. Yovchev, M.I., P.N. Grozdanov, B. Joseph, S. Gupta, and M.D. Dabeva, *Novel hepatic progenitor cell surface markers in the adult rat liver*. Hepatology, 2007. **45**(1): p. 139-49.
42. Zhao, Q., H. Ren, D. Zhu, and Z. Han, *Stem/progenitor cells in liver injury repair and regeneration*. Biol Cell, 2009. **101**(10): p. 557-71.
43. Forbes, S., P. Vig, R. Poulosom, H. Thomas, and M. Alison, *Hepatic stem cells*. The Journal of Pathology, 2002. **197**(4): p. 510-518.
44. Ray, M.B., C.L. Mendenhall, S.W. French, and P.S. Gartside, *Bile duct changes in alcoholic liver disease. The Veterans Administration Cooperative Study Group*. Liver, 1993. **13**(1): p. 36-45.
45. Hsia, C.C., R.P. Evarts, H. Nakatsukasa, E.R. Marsden, and S.S. Thorgeirsson, *Occurrence of oval-type cells in hepatitis B virus-associated human hepatocarcinogenesis*. Hepatology, 1992. **16**(6): p. 1327-33.
46. Lowes, K.N., B.A. Brennan, G.C. Yeoh, and J.K. Olynyk, *Oval cell numbers in human chronic liver diseases are directly related to disease severity*. Am J Pathol, 1999. **154**(2): p. 537-41.
47. Blumberg, B.S., L. Melartin, R.A. Guint, and B. Werner, *Family studies of a human serum isoantigen system (Australia antigen)*. Am J Hum Genet, 1966. **18**(6): p. 594-608.
48. Dane, D.S., C.H. Cameron, and M. Briggs, *Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis*. Lancet, 1970. **1**(7649): p. 695-8.
49. Aberle, J. and H.W. Doerr, eds. *Medizinische Virologie : Grundlagen, Diagnostik, Prävention und Therapie viraler Erkrankungen ; 115 Tabellen*. 2., komplett überarb. und erw. Aufl. ed. 2010, Thieme: Stuttgart [u.a.]. XXVIII, 736 S.
50. Gerlich, W.H., *Medical virology of hepatitis B: how it began and where we are now*. Virol J, 2013. **10**: p. 239.
51. Locarnini, S., *Molecular virology of hepatitis B virus*. Semin Liver Dis, 2004. **24 Suppl 1**: p. 3-10.
52. Neuveut, C., Y. Wei, and M.A. Buendia, *Mechanisms of HBV-related hepatocarcinogenesis*. J Hepatol, 2010. **52**(4): p. 594-604.
53. Chen, M., M. Sallberg, and J. Hughes, *Immune tolerance split between hepatitis B virus precore and core proteins*. J Virol, 2005. **79**: p. 3016-3027.
54. Prange, R., *Host factors involved in hepatitis B virus maturation, assembly, and egress*. Medical Microbiology and Immunology, 2012. **201**(4): p. 449-461.
55. Watanabe, T., E.M. Sorensen, A. Naito, M. Schott, S. Kim, and P. Ahlquist, *Involvement of host cellular multivesicular body functions in hepatitis B virus budding*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(24): p. 10205-10.
56. Patient, R., C. Hourieux, and P. Roingeard, *Morphogenesis of hepatitis B virus and its subviral envelope particles*. Cell Microbiol, 2009. **11**(11): p. 1561-70.
57. Schiller, J.T. and D.R. Lowy, *Vaccines to prevent infections by oncoviruses*. Annu Rev Microbiol, 2010. **64**: p. 23-41.
58. Modrow, S., D. Falke, U. Truyen, and H. Schätzl, *Molekulare Virologie*. 3. Auflage ed. SpringerLink : Bücher. 2010, Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
59. Klingmuller, U. and H. Schaller, *Hepadnavirus infection requires interaction between the viral pre-S domain and a specific hepatocellular receptor*. J Virol, 1993. **67**(12): p. 7414-22.

LITERATURVERZEICHNIS

60. Yan, H., G. Zhong, G. Xu, W. He, Z. Jing, Z. Gao, Y. Huang, Y. Qi, B. Peng, H. Wang, L. Fu, M. Song, P. Chen, W. Gao, B. Ren, Y. Sun, T. Cai, X. Feng, J. Sui, and W. Li, *Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus*. *Elife*, 2012. **1**: p. e00049.
61. Stieger, B., *The role of the sodium-taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) and of the bile salt export pump (BSEP) in physiology and pathophysiology of bile formation*. *Handb Exp Pharmacol*, 2011(201): p. 205-59.
62. Kock, J. and H.J. Schlicht, *Analysis of the earliest steps of hepadnavirus replication: genome repair after infectious entry into hepatocytes does not depend on viral polymerase activity*. *J Virol*, 1993. **67**(8): p. 4867-74.
63. Liang, T.J., *Hepatitis B: the virus and disease*. *Hepatology*, 2009. **49**(5 Suppl): p. S13-21.
64. Siegler, V.D. and V. Bruss, *Role of transmembrane domains of hepatitis B virus small surface proteins in subviral-particle biogenesis*. *J Virol*, 2013. **87**(3): p. 1491-6.
65. Dienstag, J.L., *Hepatitis B virus infection*. *N Engl J Med*, 2008. **359**(14): p. 1486-500.
66. Perz, J.F., G.L. Armstrong, L.A. Farrington, Y.J. Hutin, and B.P. Bell, *The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide*. *J Hepatol*, 2006. **45**(4): p. 529-38.
67. (WHO), W.H.O., *WHO Fact sheet N°204 2013*.
68. Wong, V.C., H.M. Ip, H.W. Reesink, P.N. Lelie, E.E. Reerink-Brongers, C.Y. Yeung, and H.K. Ma, *Prevention of the HBsAg carrier state in newborn infants of mothers who are chronic carriers of HBsAg and HBeAg by administration of hepatitis-B vaccine and hepatitis-B immunoglobulin. Double-blind randomised placebo-controlled study*. *Lancet*, 1984. **1**(8383): p. 921-6.
69. Nebbia, G., D. Peppia, and M.K. Maini, *Hepatitis B infection: current concepts and future challenges*. *QJM*, 2012. **105**(2): p. 109-13.
70. Asabe, S., S.F. Wieland, P.K. Chattopadhyay, M. Roederer, R.E. Engle, R.H. Purcell, and F.V. Chisari, *The size of the viral inoculum contributes to the outcome of hepatitis B virus infection*. *J Virol*, 2009. **83**(19): p. 9652-62.
71. Bertoletti, A. and C. Ferrari, *Innate and adaptive immune responses in chronic hepatitis B virus infections: towards restoration of immune control of viral infection*. *Gut*, 2012. **61**(12): p. 1754-64.
72. Webster, G.J., S. Reignat, M.K. Maini, S.A. Whalley, G.S. Ogg, A. King, D. Brown, P.L. Amlot, R. Williams, D. Vergani, G.M. Dusheiko, and A. Bertoletti, *Incubation phase of acute hepatitis B in man: dynamic of cellular immune mechanisms*. *Hepatology*, 2000. **32**(5): p. 1117-24.
73. Sugiyama, M., Y. Tanaka, F. Kurbanov, I. Maruyama, T. Shimada, S. Takahashi, T. Shirai, K. Hino, I. Sakaida, and M. Mizokami, *Direct cytopathic effects of particular hepatitis B virus genotypes in severe combined immunodeficiency transgenic with urokinase-type plasminogen activator mouse with human hepatocytes*. *Gastroenterology*, 2009. **136**(2): p. 652-62.e3.
74. Riviere, L., A. Ducroux, and M.A. Buendia, *The oncogenic role of hepatitis B virus*. *Recent Results Cancer Res*, 2014. **193**: p. 59-74.
75. Guidotti, L.G., T. Ishikawa, M.V. Hobbs, B. Matzke, R. Schreiber, and F.V. Chisari, *Intracellular Inactivation of the Hepatitis B Virus by Cytotoxic T Lymphocytes*. *Immunity*, 1996. **4**(1): p. 25-36.
76. Mason, W.S., S. Litwin, C. Xu, and A.R. Jilbert, *Hepatocyte turnover in transient and chronic hepadnavirus infections*. *Journal of Viral Hepatitis*, 2007. **14**: p. 22-28.
77. Nayersina, R., P. Fowler, S. Guilhot, G. Missale, A. Cerny, H.J. Schlicht, A. Vitiello, R. Chesnut, J.L. Person, A.G. Redeker, and F.V. Chisari, *HLA A2 restricted cytotoxic T lymphocyte responses to multiple hepatitis B surface antigen epitopes during hepatitis B virus infection*. *J Immunol*, 1993. **150**(10): p. 4659-71.

LITERATURVERZEICHNIS

78. Chisari, F.V., M. Isogawa, and S.F. Wieland, *Pathogenesis of hepatitis B virus infection*. *Pathol Biol (Paris)*, 2010. **58**(4): p. 258-66.
79. Bertoletti, A. and C. Ferrari, *Innate and adaptive immune responses in chronic hepatitis B virus infections: towards restoration of immune control of viral infection*. *Gut*, 2012. **61**(12): p. 1754-1764.
80. Guidotti, L.G. and F.V. Chisari, *Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response*. *Annu Rev Immunol*, 2001. **19**: p. 65-91.
81. Wu, J., M. Lu, Z. Meng, M. Trippler, R. Broering, A. Szczeponek, F. Krux, U. Dittmer, M. Roggendorf, G. Gerken, and J.F. Schlaak, *Toll-like receptor-mediated control of HBV replication by nonparenchymal liver cells in mice*. *Hepatology*, 2007. **46**(6): p. 1769-1778.
82. Kimura, K., K. Kakimi, S. Wieland, L.G. Guidotti, and F.V. Chisari, *Interleukin-18 Inhibits Hepatitis B Virus Replication in the Livers of Transgenic Mice*. *Journal of Virology*, 2002. **76**(21): p. 10702-10707.
83. Mondelli, M.U., S. Varchetta, and B. Oliviero, *Natural killer cells in viral hepatitis: facts and controversies*. *Eur J Clin Invest*, 2010. **40**(9): p. 851-63.
84. Wieland, S., R. Thimme, R.H. Purcell, and F.V. Chisari, *Genomic analysis of the host response to hepatitis B virus infection*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(17): p. 6669-74.
85. Böcher, W.O. and T. Heintges, eds. *Hepatitis B : Infektion - Therapie - Prophylaxe ; 20 Tabellen*. 2006, Thieme: Stuttgart ; New York, NY. XIII, 189 S.
86. Reherrmann, B., C. Ferrari, C. Pasquinelli, and F.V. Chisari, *The hepatitis B virus persists for decades after patients' recovery from acute viral hepatitis despite active maintenance of a cytotoxic T-lymphocyte response*. *Nat Med*, 1996. **2**(10): p. 1104-8.
87. Reherrmann, B., *Pathogenesis of chronic viral hepatitis: differential roles of T cells and NK cells*. *Nat Med*, 2013. **19**(7): p. 859-68.
88. Krugman, S., L.R. Overby, I.K. Mushahwar, C.M. Ling, G.G. Frosner, and F. Deinhardt, *Viral hepatitis, type B. Studies on natural history and prevention re-examined*. *N Engl J Med*, 1979. **300**(3): p. 101-6.
89. Jindal, A., M. Kumar, and S.K. Sarin, *Management of acute hepatitis B and reactivation of hepatitis B*. *Liver Int*, 2013. **33 Suppl 1**: p. 164-75.
90. Hyams, K.C., *Risks of chronicity following acute hepatitis B virus infection: a review*. *Clin Infect Dis*, 1995. **20**(4): p. 992-1000.
91. Kerkar, N., *Hepatitis B in children: Complexities in management*. *Pediatric Transplantation*, 2005. **9**(5): p. 685-691.
92. Villa, E., G. Fattovich, A. Mauro, and M. Pasino, *Natural history of chronic HBV infection: special emphasis on the prognostic implications of the inactive carrier state versus chronic hepatitis*. *Dig Liver Dis*, 2011. **43 Suppl 1**: p. S8-14.
93. McMahon, B.J., *Natural history of chronic hepatitis B*. *Clin Liver Dis*, 2010. **14**(3): p. 381-96.
94. Aspinall, E.J., G. Hawkins, A. Fraser, S.J. Hutchinson, and D. Goldberg, *Hepatitis B prevention, diagnosis, treatment and care: a review*. *Occupational Medicine*, 2011. **61**(8): p. 531-540.
95. Chen, C.J., H.I. Yang, and U.H. Iloeje, *Hepatitis B virus DNA levels and outcomes in chronic hepatitis B*. *Hepatology*, 2009. **49**(5 Suppl): p. S72-84.
96. Sharma, S.K., N. Saini, and Y. Chwla, *Hepatitis B Virus: Inactive carriers*. *Virology Journal*, 2005. **2**(1): p. 82.
97. Saikia, N., R. Talukdar, S. Mazumder, S. Khanna, and R. Tandon, *Management of patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B*. *Postgrad Med J*, 2007. **83**(975): p. 32-9.
98. Pol, S., *Management of HBV in immunocompromised patients*. *Liver Int*, 2013. **33 Suppl 1**: p. 182-7.

99. Hoofnagle, J.H., *Reactivation of hepatitis B*. Hepatology, 2009. **49**(5 Suppl): p. S156-65.
100. Knoll, A., S. Boehm, J. Hahn, E. Holler, and W. Jilg, *Reactivation of resolved hepatitis B virus infection after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation*. Bone Marrow Transplant, 2004. **33**(9): p. 925-929.
101. Lucifora, J., Y. Xia, F. Reisinger, K. Zhang, D. Stadler, X. Cheng, M.F. Sprinzl, H. Koppensteiner, Z. Makowska, T. Volz, C. Remouchamps, W.M. Chou, W.E. Thasler, N. Huser, D. Durantel, T.J. Liang, C. Munk, M.H. Heim, J.L. Browning, E. DeJardin, M. Dandri, M. Schindler, M. Heikenwalder, and U. Protzer, *Specific and nonhepatotoxic degradation of nuclear hepatitis B virus cccDNA*. Science, 2014. **343**(6176): p. 1221-8.
102. Weissberg, J.I., L.L. Andres, C.I. Smith, S. Weick, J.E. Nichols, G. Garcia, W.S. Robinson, T.C. Merigan, and P.B. Gregory, *Survival in chronic hepatitis B. An analysis of 379 patients*. Ann Intern Med, 1984. **101**(5): p. 613-6.
103. Rahimi, R.S. and D.C. Rockey, *End-stage liver disease complications*. Curr Opin Gastroenterol, 2013. **29**(3): p. 257-63.
104. Beasley, R.P., L.Y. Hwang, C.C. Lin, and C.S. Chien, *Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22 707 men in Taiwan*. Lancet, 1981. **2**(8256): p. 1129-33.
105. El-Serag, H.B., *Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma*. Gastroenterology, 2012. **142**(6): p. 1264-1273.e1.
106. Ringelhan, M., M. Heikenwalder, and U. Protzer, *Direct effects of hepatitis B virus-encoded proteins and chronic infection in liver cancer development*. Dig Dis, 2013. **31**(1): p. 138-51.
107. Sherman, M., *Risk of hepatocellular carcinoma in hepatitis B and prevention through treatment*. Cleve Clin J Med, 2009. **76** Suppl 3: p. S6-9.
108. Davies, S.E., B.C. Portmann, J.G. O'Grady, P.M. Aldis, K. Chaggar, G.J. Alexander, and R. Williams, *Hepatic histological findings after transplantation for chronic hepatitis B virus infection, including a unique pattern of fibrosing cholestatic hepatitis*. Hepatology, 1991. **13**(1): p. 150-7.
109. Demetris, A.J., S. Todo, D.H. Van Thiel, J.J. Fung, Y. Iwaki, G. Sysyn, W. Ming, J. Trager, and T.E. Starzl, *Evolution of hepatitis B virus liver disease after hepatic replacement. Practical and theoretical considerations*. Am J Pathol, 1990. **137**(3): p. 667-76.
110. O'Grady, J.G., H.M. Smith, S.E. Davies, H.M. Daniels, P.T. Donaldson, K.C. Tan, B. Portmann, G.J. Alexander, and R. Williams, *Hepatitis B virus reinfection after orthotopic liver transplantation. Serological and clinical implications*. J Hepatol, 1992. **14**(1): p. 104-11.
111. Todo, S., A.J. Demetris, D. Van Thiel, L. Teperman, J.J. Fung, and T.E. Starzl, *Orthotopic liver transplantation for patients with hepatitis B virus-related liver disease*. Hepatology, 1991. **13**(4): p. 619-26.
112. Lucey, M.R., D.M. Graham, P. Martin, A. Di Bisceglie, S. Rosenthal, J.G. Waggoner, R.M. Merion, D.A. Campbell, T.T. Nostrant, and H.D. Appelman, *Recurrence of hepatitis B and delta hepatitis after orthotopic liver transplantation*. Gut, 1992. **33**(10): p. 1390-6.
113. Thung, S.N., *Histologic findings in recurrent HBV*. Liver Transpl, 2006. **12**(11 Suppl 2): p. S50-3.
114. Dixon, L.R. and J.M. Crawford, *Early histologic changes in fibrosing cholestatic hepatitis C*. Liver Transpl, 2007. **13**(2): p. 219-26.
115. Coilly, A., B. Roche, J. Dumortier, V. Leroy, D. Botta-Fridlund, S. Radenne, G.P. Pageaux, S.N. Si-Ahmed, O. Guillaud, T.M. Antonini, S. Haim-Boukobza, A.M. Roque-Afonso, D. Samuel, and J.C. Duclos-Vallee, *Safety and Efficacy of Protease Inhibitors to Treat Hepatitis C After Liver Transplantation, a Multicenter Experience*. J Hepatol, 2013.
116. Siddiqui, A.R., Z. Abbas, N.H. Luck, S.M. Hassan, T. Aziz, M. Mubarak, S.A. Naqvi, and S.A. Rizvi, *Experience of fibrosing cholestatic hepatitis with hepatitis C virus in kidney transplant recipients*. Transplant Proc, 2012. **44**(3): p. 721-4.

LITERATURVERZEICHNIS

117. Boletis, J.N., J.K. Delladetsima, F. Makris, H. Theodoropoulou, S. Vgenopoulou, A. Kostakis, and A. Hatzakis, *Cholestatic syndromes in renal transplant recipients with HCV infection*. *Transpl Int*, 2000. **13 Suppl 1**: p. S375-9.
118. Delgado, J., E. Munoz de Bustillo, C. Ibarrola, F. Colina, J.M. Morales, E. Rodriguez, J.M. Aguado, A. Fuertes, and M.A. Gomez, *Hepatitis C virus-related fibrosing cholestatic hepatitis after cardiac transplantation: is azathioprine a contributory factor?* *J Heart Lung Transplant*, 1999. **18**(6): p. 607-10.
119. Agarwal, S.K., V. Kalra, A. Dinda, S. Gupta, S.C. Dash, D. Bhowmik, and S.C. Tiwari, *Fibrosing cholestatic hepatitis in renal transplant recipient with CMV infection: a case report*. *Int Urol Nephrol*, 2004. **36**(3): p. 433-5.
120. Rosenberg, P.M., J.J. Farrell, D.R. Abraczinskas, F.M. Graeme-Cook, J.L. Dienstag, and R.T. Chung, *Rapidly progressive fibrosing cholestatic hepatitis--hepatitis C virus in HIV coinfection*. *Am J Gastroenterol*, 2002. **97**(2): p. 478-83.
121. Cooksley, W.G. and C.A. Mclvor, *Fibrosing cholestatic hepatitis and HBV after bone marrow transplantation*. *Biomed Pharmacother*, 1995. **49**(3): p. 117-24.
122. Kikuchi, A., S. Kagimoto, H. Kishimoto, K. Yamamoto, and R. Hanada, *Allogeneic bone marrow transplantation (BMT) in a patient with myelodysplastic syndrome (MDS) infected by hepatitis B virus (HBV) precore mutant: favorable outcome with slow tapering of immunosuppressive agents*. *Leukemia*, 2002. **16**(11): p. 2333-5.
123. Tong, M.J., N.A. Terrault, and G. Klintmalm, *Hepatitis B transplantation: special conditions*. *Semin Liver Dis*, 2000. **20 Suppl 1**: p. 25-8.
124. Xiao, S.Y., L. Lu, and H.L. Wang, *Fibrosing cholestatic hepatitis: clinicopathologic spectrum, diagnosis and pathogenesis*. *Int J Clin Exp Pathol*, 2008. **1**(5): p. 396-402.
125. McMillan, J.S., T. Shaw, P.W. Angus, and S.A. Locarnini, *Effect of immunosuppressive and antiviral agents on hepatitis B virus replication in vitro*. *Hepatology*, 1995. **22**(1): p. 36-43.
126. Lau, J.Y., V.G. Bain, S.E. Davies, J.G. O'Grady, A. Alberti, G.J. Alexander, and R. Williams, *High-level expression of hepatitis B viral antigens in fibrosing cholestatic hepatitis*. *Gastroenterology*, 1992. **102**(3): p. 956-62.
127. Chisari, F.V., P. Filippi, J. Buras, A. McLachlan, H. Popper, C.A. Pinkert, R.D. Palmiter, and R.L. Brinster, *Structural and pathological effects of synthesis of hepatitis B virus large envelope polypeptide in transgenic mice*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987. **84**(19): p. 6909-13.
128. Angus, P.W., S.A. Locarnini, G.W. McCaughan, R.M. Jones, J.S. McMillan, and D.S. Bowden, *Hepatitis B virus precore mutant infection is associated with severe recurrent disease after liver transplantation*. *Hepatology*, 1995. **21**(1): p. 14-8.
129. Waguri, N., T. Ichida, R. Fujimaki, T. Ishikawa, M. Nomoto, H. Asakura, T. Nakamaru, A. Saitoh, M. Arakawa, K. Saitoh, and K. Takahashi, *Fibrosing cholestatic hepatitis after living related-donor renal transplantation*. *J Gastroenterol Hepatol*, 1998. **13**(11): p. 1133-7.
130. Fylaktou, A., M. Daoudaki, V. Dimou, E. Sianou, D. Papaventsis, I. Mavrovouniotis, I. Fouzas, and V. Papanikolaou, *Hepatitis B reactivation in a renal transplant patient due to a surface antigen mutant strain: a case report*. *Transplant Proc*, 2012. **44**(9): p. 2773-5.
131. Lavanchy, D., *Viral hepatitis: global goals for vaccination*. *J Clin Virol*, 2012. **55**(4): p. 296-302.
132. Tassopoulos, N.C., G.J. Papaevangelou, M.H. Sjogren, A. Roumeliotou-Karayannis, J.L. Gerin, and R.H. Purcell, *Natural history of acute hepatitis B surface antigen-positive hepatitis in Greek adults*. *Gastroenterology*, 1987. **92**(6): p. 1844-50.
133. Kumar, M., S. Satapathy, R. Monga, K. Das, S. Hissar, C. Pande, B.C. Sharma, and S.K. Sarin, *A randomized controlled trial of lamivudine to treat acute hepatitis B*. *Hepatology*, 2007. **45**(1): p. 97-101.

LITERATURVERZEICHNIS

134. Tillmann, H.L., J. Hadem, L. Leifeld, K. Zachou, A. Canbay, C. Eisenbach, I. Graziadei, J. Encke, H. Schmidt, W. Vogel, A. Schneider, U. Spengler, G. Gerken, G.N. Dalekos, H. Wedemeyer, and M.P. Manns, *Safety and efficacy of lamivudine in patients with severe acute or fulminant hepatitis B, a multicenter experience*. Journal of Viral Hepatitis, 2006. **13**(4): p. 256-263.
135. Cornberg, M., U. Protzer, J. Petersen, H. Wedemeyer, T. Berg, W. Jilg, A. Erhardt, S. Wirth, C. Sarrazin, M.M. Dollinger, P. Schirmacher, K. Dathe, I.B. Kopp, S. Zeuzem, W.H. Gerlich, and M.P. Manns, [*Prophylaxis, diagnosis and therapy of hepatitis B virus infection - the German guideline*]. Z Gastroenterol, 2011. **49**(7): p. 871-930.
136. *EASL clinical practice guidelines: Management of chronic hepatitis B virus infection*. J Hepatol, 2012. **57**(1): p. 167-85.
137. Tujios, S.R. and W.M. Lee, *Update in the management of chronic hepatitis B*. Curr Opin Gastroenterol, 2013. **29**(3): p. 250-6.
138. Yasunaka, T., A. Takaki, T. Yagi, Y. Iwasaki, H. Sadamori, K. Koike, S. Hirohata, M. Tatsukawa, D. Kawai, H. Shiraha, Y. Miyake, F. Ikeda, H. Kobashi, H. Matsuda, S. Shinoura, R. Yoshida, D. Satoh, M. Utsumi, T. Onishi, and K. Yamamoto, *Serum hepatitis B virus DNA before liver transplantation correlates with HBV reinfection rate even under successful low-dose hepatitis B immunoglobulin prophylaxis*. Hepatol Int, 2011.
139. Tang, B., W.D. Kruger, G. Chen, F. Shen, W.Y. Lin, S. Mboup, W.T. London, and A.A. Evans, *Hepatitis B viremia is associated with increased risk of hepatocellular carcinoma in chronic carriers*. Journal of Medical Virology, 2004. **72**(1): p. 35-40.
140. Selcuk, H., H. Karakayali, and M. Haberal, *Liver transplant and chronic hepatitis B virus infection*. Exp Clin Transplant, 2011. **9**(2): p. 94-7.
141. Markowitz, J.S., P. Martin, A.J. Conrad, J.F. Markmann, P. Seu, H. Yersiz, J.A. Goss, P. Schmidt, A. Pakrasi, L. Artinian, N.G. Murray, D.K. Imagawa, C. Holt, L.I. Goldstein, R. Stribling, and R.W. Busuttil, *Prophylaxis against hepatitis B recurrence following liver transplantation using combination lamivudine and hepatitis B immune globulin*. Hepatology, 1998. **28**(2): p. 585-9.
142. Kim, W.R., J.J. Poterucha, W.K. Kremers, M.B. Ishitani, and E.R. Dickson, *Outcome of liver transplantation for hepatitis B in the United States*. Liver Transpl, 2004. **10**(8): p. 968-74.
143. Mailey, B., B. Buchberg, C. Prendergast, A. Artinyan, J. Khalili, N. Sanchez-Luege, S.D. Colquhoun, and J. Kim, *A Disease-Based Comparison of Liver Transplantation Outcomes*. The American Surgeon, 2009. **75**(10): p. 901-908.
144. Krukemeyer, M.G., ed. *Transplantationsmedizin : ein Leitfaden für den Praktiker*. 2006, de Gruyter: Berlin [u.a.]. XXII, 335 S.
145. Du, H. and H.S. Taylor, *Stem cells and female reproduction*. Reprod Sci, 2009. **16**(2): p. 126-39.
146. Tepper, O.M., J.M. Capla, R.D. Galiano, D.J. Ceradini, M.J. Callaghan, M.E. Kleinman, and G.C. Gurtner, *Adult vasculogenesis occurs through in situ recruitment, proliferation, and tubulization of circulating bone marrow-derived cells*. Blood, 2005. **105**(3): p. 1068-77.
147. Xynos, A., P. Corbella, N. Belmonte, R. Zini, R. Manfredini, and G. Ferrari, *Bone marrow-derived hematopoietic cells undergo myogenic differentiation following a Pax-7 independent pathway*. Stem Cells, 2010. **28**(5): p. 965-73.
148. Hamada, H., M.K. Kim, A. Iwakura, M. Ii, T. Thorne, G. Qin, J. Asai, Y. Tsutsumi, H. Sekiguchi, M. Silver, A. Wecker, E. Bord, Y. Zhu, R. Kishore, and D.W. Losordo, *Estrogen receptors alpha and beta mediate contribution of bone marrow-derived endothelial progenitor cells to functional recovery after myocardial infarction*. Circulation, 2006. **114**(21): p. 2261-70.

LITERATURVERZEICHNIS

149. Qian, H., H. Yang, W. Xu, Y. Yan, Q. Chen, W. Zhu, H. Cao, Q. Yin, H. Zhou, F. Mao, and Y. Chen, *Bone marrow mesenchymal stem cells ameliorate rat acute renal failure by differentiation into renal tubular epithelial-like cells*. *Int J Mol Med*, 2008. **22**(3): p. 325-32.
150. Deng, J., Z.M. Zou, T.L. Zhou, Y.P. Su, G.P. Ai, J.P. Wang, H. Xu, and S.W. Dong, *Bone marrow mesenchymal stem cells can be mobilized into peripheral blood by G-CSF in vivo and integrate into traumatically injured cerebral tissue*. *Neurol Sci*, 2011. **32**(4): p. 641-51.
151. Chen, Y., L.X. Xiang, J.Z. Shao, R.L. Pan, Y.X. Wang, X.J. Dong, and G.R. Zhang, *Recruitment of endogenous bone marrow mesenchymal stem cells towards injured liver*. *J Cell Mol Med*, 2010. **14**(6b): p. 1494-508.
152. Rennert, R.C., M. Sorkin, R.K. Garg, and G.C. Gurtner, *Stem cell recruitment after injury: lessons for regenerative medicine*. *Regen Med*, 2012. **7**(6): p. 833-50.
153. Wang, X., H. Willenbring, Y. Akkari, Y. Torimaru, M. Foster, M. Al-Dhalimy, E. Lagasse, M. Finegold, S. Olson, and M. Grompe, *Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes*. *Nature*, 2003. **422**(6934): p. 897-901.
154. Wagers, A.J. and I.L. Weissman, *Plasticity of Adult Stem Cells*. *Cell*, 2004. **116**(5): p. 639-648.
155. Gehling, U.M., M. Willems, K. Schlagner, R.A. Benndorf, M. Dandri, J. Petersen, M. Sterneck, J.M. Pollok, D.K. Hossfeld, and X. Rogiers, *Mobilization of hematopoietic progenitor cells in patients with liver cirrhosis*. *World J Gastroenterol*, 2010. **16**(2): p. 217-24.
156. Pilat, N., L. Unger, and G.A. Berlakovich, *Implication for Bone Marrow Derived Stem Cells in Hepatocyte Regeneration after Orthotopic Liver Transplantation*. *International Journal of Hepatology*, 2013. **2013**: p. 7.
157. Burra, P., D. Bizzaro, R. Ciccocioppo, F. Marra, A.C. Piscaglia, L. Porretti, A. Gasbarrini, and F.P. Russo, *Therapeutic application of stem cells in gastroenterology: an up-date*. *World J Gastroenterol*, 2011. **17**(34): p. 3870-80.
158. am Esch, J.S., W.T. Knoefel, M. Klein, A. Ghodsizad, G. Fuerst, L.W. Poll, C. Piechaczek, E.R. Burchardt, N. Feifel, V. Stoldt, M. Stockschläder, N. Stoecklein, R.Y. Tustas, C.F. Eisenberger, M. Peiper, D. Häussinger, and S.B. Hosch, *Portal Application of Autologous CD133+ Bone Marrow Cells to the Liver: A Novel Concept to Support Hepatic Regeneration*. *STEM CELLS*, 2005. **23**(4): p. 463-470.
159. Sakaida, I., S. Terai, N. Yamamoto, K. Aoyama, T. Ishikawa, H. Nishina, and K. Okita, *Transplantation of bone marrow cells reduces CCl4-induced liver fibrosis in mice*. *Hepatology*, 2004. **40**(6): p. 1304-11.
160. Zhao, W., J.J. Li, D.Y. Cao, X. Li, L.Y. Zhang, Y. He, S.Q. Yue, D.S. Wang, and K.F. Dou, *Intravenous injection of mesenchymal stem cells is effective in treating liver fibrosis*. *World J Gastroenterol*, 2012. **18**(10): p. 1048-58.
161. Chayama, K., C.N. Hayes, N. Hiraga, H. Abe, M. Tsuge, and M. Imamura, *Animal model for study of human hepatitis viruses*. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2011. **26**(1): p. 13-18.
162. Summers, J. and W.S. Mason, *Replication of the genome of a hepatitis B--like virus by reverse transcription of an RNA intermediate*. *Cell*, 1982. **29**(2): p. 403-15.
163. Tennant, B.C., I.A. Toshkov, S.F. Peek, J.R. Jacob, S. Menne, W.E. Hornbuckle, R.D. Schinazi, B.E. Korba, P.J. Cote, and J.L. Gerin, *Hepatocellular carcinoma in the woodchuck model of hepatitis B virus infection*. *Gastroenterology*, 2004. **127**(5 Suppl 1): p. S283-93.
164. Sells, M.A., M.L. Chen, and G. Acs, *Production of hepatitis B virus particles in Hep G2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987. **84**: p. 1005-1009.

LITERATURVERZEICHNIS

165. Galle, P.R., J. Hagelstein, B. Kommerell, M. Volkmann, P. Schranz, and H. Zentgraf, *In vitro experimental infection of primary human hepatocytes with hepatitis B virus*. *Gastroenterology*, 1994. **106**: p. 664-673.
166. Schulze-Bergkamen, H., A. Untergasser, and A. Dax, *Primary human hepatocytes-a valuable tool for investigation of apoptosis and hepatitis B virus infection*. *J Hepatol*, 2003. **38**: p. 736-744.
167. Dandri, M., M. Lutgehetmann, T. Volz, and J. Petersen, *Small animal model systems for studying hepatitis B virus replication and pathogenesis*. *Semin Liver Dis*, 2006. **26**(2): p. 181-91.
168. Dandri, M., M.R. Burda, E. Török, J.M. Pollok, A. Iwanska, G. Sommer, X. Rogiers, C.E. Rogler, S. Gupta, H. Will, H. Greten, and J. Petersen, *Repopulation of mouse liver with human hepatocytes and in vivo infection with hepatitis B virus*. *Hepatology*, 2001. **33**(4): p. 981-988.
169. Shinkai, Y., G. Rathbun, K.P. Lam, E.M. Oltz, V. Stewart, M. Mendelsohn, J. Charron, M. Datta, F. Young, A.M. Stall, *RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement*. *Cell*, 1992. **68**(5): p. 855-67.
170. Sugiyama, M., Y. Tanaka, T. Kato, E. Orito, K. Ito, S.K. Acharya, R.G. Gish, A. Kramvis, T. Shimada, N. Izumi, M. Kaito, Y. Miyakawa, and M. Mizokami, *Influence of hepatitis B virus genotypes on the intra- and extracellular expression of viral DNA and antigens*. *Hepatology*, 2006. **44**(4): p. 915-924.
171. Chisari, F.V., C.A. Pinkert, D.R. Milich, P. Filippi, A. McLachlan, R.D. Palmiter, and R.L. Brinster, *A transgenic mouse model of the chronic hepatitis B surface antigen carrier state*. *Science*, 1985. **230**(4730): p. 1157-60.
172. Chisari, F.V., P. Filippi, A. McLachlan, D.R. Milich, M. Riggs, S. Lee, R.D. Palmiter, C.A. Pinkert, and R.L. Brinster, *Expression of hepatitis B virus large envelope polypeptide inhibits hepatitis B surface antigen secretion in transgenic mice*. *J Virol*, 1986. **60**(3): p. 880-7.
173. Dandri, M., M. Lütgehetmann, and J. Petersen, *Experimental models and therapeutic approaches for HBV*. *Seminars in Immunopathology*, 2013. **35**(1): p. 7-21.
174. Gerber, M.A., S. Hadziyannis, C. Vissoulis, F. Schaffner, F. Paronetto, and H. Popper, *Electron microscopy and immunoelectronmicroscopy of cytoplasmic hepatitis B antigen in hepatocytes*. *Am J Pathol*, 1974. **75**(3): p. 489-502.
175. Chisari, F.V., K. Klopchin, T. Moriyama, C. Pasquinelli, H.A. Dunsford, S. Sell, C.A. Pinkert, R.L. Brinster, and R.D. Palmiter, *Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus transgenic mice*. *Cell*, 1989. **59**(6): p. 1145-56.
176. Dunsford, H.A., S. Sell, and F.V. Chisari, *Hepatocarcinogenesis due to chronic liver cell injury in hepatitis B virus transgenic mice*. *Cancer Res*, 1990. **50**(11): p. 3400-7.
177. Crawford, D.R., S. Ostrowski, D. Vakharia, Z. Ilic, and S. Sell, *Separate origins of hepatitis B virus surface antigen-negative foci and hepatocellular carcinomas in transgenic HBsAg (alb/psx) mice*. *Am J Pathol*, 2006. **169**(1): p. 223-32.
178. Li, Y., Z.Y. Tang, and J.X. Hou, *Hepatocellular carcinoma: insight from animal models*. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2012. **9**(1): p. 32-43.
179. Milich, D.R., *Transgenic technology and the study of hepatitis viruses: a review of what we have learned*. *Can J Gastroenterol*, 2000. **14**(9): p. 781-7.
180. Terai, S., T. Ishikawa, K. Omori, K. Aoyama, Y. Marumoto, Y. Urata, Y. Yokoyama, K. Uchida, T. Yamasaki, Y. Fujii, K. Okita, and I. Sakaida, *Improved liver function in patients with liver cirrhosis after autologous bone marrow cell infusion therapy*. *Stem Cells*, 2006. **24**(10): p. 2292-8.
181. Lyra, A.C., M.B. Soares, L.F. da Silva, E.L. Braga, S.A. Oliveira, M.F. Fortes, A.G. Silva, D. Brustolim, B. Genser, R.R. Dos Santos, and L.G. Lyra, *Infusion of autologous bone marrow mononuclear cells through hepatic artery results in a short-term improvement*

- of liver function in patients with chronic liver disease: a pilot randomized controlled study.* Eur J Gastroenterol Hepatol, 2010. **22**(1): p. 33-42.
182. Kharaziha, P., P.M. Hellstrom, B. Noorinayer, F. Farzaneh, K. Aghajani, F. Jafari, M. Telkabadi, A. Atashi, M. Honardoost, M.R. Zali, and M. Soleimani, *Improvement of liver function in liver cirrhosis patients after autologous mesenchymal stem cell injection: a phase I-II clinical trial.* Eur J Gastroenterol Hepatol, 2009. **21**(10): p. 1199-205.
183. Kim, J.K., Y.N. Park, J.S. Kim, M.S. Park, Y.H. Paik, J.Y. Seok, Y.E. Chung, H.O. Kim, K.S. Kim, S.H. Ahn, Y. Kim do, M.J. Kim, K.S. Lee, C.Y. Chon, S.J. Kim, S. Terai, I. Sakaida, and K.H. Han, *Autologous bone marrow infusion activates the progenitor cell compartment in patients with advanced liver cirrhosis.* Cell Transplant, 2010. **19**(10): p. 1237-46.
184. Shi, Z., A.E. Wakil, and D.C. Rockey, *Strain-specific differences in mouse hepatic wound healing are mediated by divergent T helper cytokine responses.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(20): p. 10663-8.
185. Reifenberg, K., J. Lohler, H.P. Pudollek, E. Schmitteckert, G. Spindler, J. Kock, and H.J. Schlicht, *Long-term expression of the hepatitis B virus core-e- and X-proteins does not cause pathologic changes in transgenic mice.* J Hepatol, 1997. **26**(1): p. 119-30.
186. Okabe, M., M. Ikawa, K. Kominami, T. Nakanishi, and Y. Nishimune, *'Green mice' as a source of ubiquitous green cells.* FEBS Lett, 1997. **407**(3): p. 313-9.
187. Voswinkel, R., T. Ziegelhoeffer, M. Heil, S. Kostin, G. Breier, T. Mehling, R. Haberberger, M. Clauss, A. Gaumann, W. Schaper, and W. Seeger, *Circulating Vascular Progenitor Cells Do Not Contribute to Compensatory Lung Growth.* Circulation Research, 2003. **93**(4): p. 372-379.
188. Avwioro, G., *Histochemical Uses Of Haematoxylin - A Review.* Journal of Pharmacy and clinical Sciences, 2011. **1**: p. 24-34.
189. Schmitz, N., S. Laverty, V.B. Kraus, and T. Aigner, *Basic methods in histopathology of joint tissues.* Osteoarthritis Cartilage, 2010. **18 Suppl 3**: p. S113-6.
190. Puchtler, H., F.S. Waldrop, and L.S. Valentine, *Polarization microscopic studies of connective tissue stained with picro-sirius red FBA.* Beitr Pathol, 1973. **150**(2): p. 174-87.
191. Junqueira, L.C., G. Bignolas, and R.R. Brentani, *Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections.* Histochem J, 1979. **11**(4): p. 447-55.
192. Itahana, K., J. Campisi, and G.P. Dimri, *Methods to detect biomarkers of cellular senescence: the senescence-associated beta-galactosidase assay.* Methods Mol Biol, 2007. **371**: p. 21-31.
193. Gallagher, S.R. and P.R. Desjardins, *Quantitation of DNA and RNA with absorption and fluorescence spectroscopy.* Curr Protoc Mol Biol, 2006. **Appendix 3**: p. Appendix 3D.
194. Fakruddin, M., K.S. Mannan, A. Chowdhury, R.M. Mazumdar, M.N. Hossain, S. Islam, and M.A. Chowdhury, *Nucleic acid amplification: Alternative methods of polymerase chain reaction.* J Pharm Bioallied Sci, 2013. **5**(4): p. 245-252.
195. Diagnostics, R.
196. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.* Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.
197. Woessner, J.F., Jr., *The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid.* Arch Biochem Biophys, 1961. **93**: p. 440-7.
198. Stegemann, H. and K. Stalder, *Determination of hydroxyproline.* Clin Chim Acta, 1967. **18**(2): p. 267-73.
199. Giannini, E.G., R. Testa, and V. Savarino, *Liver enzyme alteration: a guide for clinicians.* Cmaj, 2005. **172**(3): p. 367-79.

LITERATURVERZEICHNIS

200. Kim, H., B.-K. Oh, M. Roncalli, C. Park, S.-M. Yoon, J.E. Yoo, and Y.N. Park, *Large liver cell change in hepatitis B virus–related liver cirrhosis*. *Hepatology*, 2009. **50**(3): p. 752-762.
201. Desmet, V.J., M. Gerber, J.H. Hoofnagle, M. Manns, and P.J. Scheuer, *Classification of chronic hepatitis: diagnosis, grading and staging*. *Hepatology*, 1994. **19**(6): p. 1513-20.
202. Yin, C., K.J. Evason, K. Asahina, and D.Y. Stainier, *Hepatic stellate cells in liver development, regeneration, and cancer*. *J Clin Invest*, 2013. **123**(5): p. 1902-10.
203. Fickert, P., A. Fuchsichler, M. Wagner, G. Zollner, A. Kaser, H. Tilg, R. Krause, F. Lammert, C. Langner, K. Zatloukal, H.U. Marschall, H. Denk, and M. Trauner, *Regurgitation of bile acids from leaky bile ducts causes sclerosing cholangitis in Mdr2 (Abcb4) knockout mice*. *Gastroenterology*, 2004. **127**(1): p. 261-74.
204. Kwon, H.J., Y.S. Won, W.K. Yoon, K.H. Nam, D.Y. Kim, and H.C. Kim, *The role of osteopontin in d-galactosamine-induced liver injury in genetically obese mice*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2010. **242**(3): p. 344-51.
205. Nakken, K.E., S. Nygard, T.K. Haaland, K.E. Berge, A. Odegaard, K.J. Labori, and M.G. Raeder, *Gene expression profiles reflect sclerosing cholangitis activity in abcb4 (-/-) mice*. *Scand J Gastroenterol*, 2009. **44**(2): p. 211-8.
206. Wade Harper, J., G.R. Adami, N. Wei, K. Keyomarsi, and S.J. Elledge, *The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases*. *Cell*, 1993. **75**(4): p. 805-816.
207. Bringold, F. and M. Serrano, *Tumor suppressors and oncogenes in cellular senescence*. *Exp Gerontol*, 2000. **35**(3): p. 317-29.
208. Roskams, T.A., N.D. Theise, C. Balabaud, G. Bhagat, P.S. Bhathal, P. Bioulac-Sage, E.M. Brunt, J.M. Crawford, H.A. Crosby, V. Desmet, M.J. Finegold, S.A. Geller, A.S. Gouw, P. Hytiroglou, A.S. Knisely, M. Kojiro, J.H. Lefkowitz, Y. Nakanuma, J.K. Olynyk, Y.N. Park, B. Portmann, R. Saxena, P.J. Scheuer, A.J. Strain, S.N. Thung, I.R. Wanless, and A.B. West, *Nomenclature of the finer branches of the biliary tree: canals, ductules, and ductular reactions in human livers*. *Hepatology*, 2004. **39**(6): p. 1739-45.
209. Bateman, A.C. and S.G. Hübscher, *Cytokeratin expression as an aid to diagnosis in medical liver biopsies*. *Histopathology*, 2010. **56**(4): p. 415-425.
210. Antoniou, A., P. Raynaud, S. Cordi, Y. Zong, F. Tronche, B.Z. Stanger, P. Jacquemin, C.E. Pierreux, F. Clotman, and F.P. Lemaigre, *Intrahepatic bile ducts develop according to a new mode of tubulogenesis regulated by the transcription factor SOX9*. *Gastroenterology*, 2009. **136**(7): p. 2325-33.
211. Delous, M., C. Yin, D. Shin, N. Ninov, J. Debrito Carten, L. Pan, T.P. Ma, S.A. Farber, C.B. Moens, and D.Y. Stainier, *Sox9b is a key regulator of pancreaticobiliary ductal system development*. *PLoS Genet*, 2012. **8**(6): p. e1002754.
212. Pritchett, J., E. Harvey, V. Athwal, A. Berry, C. Rowe, F. Oakley, A. Moles, D.A. Mann, N. Bobola, A.D. Sharrocks, B.J. Thomson, A.M. Zaitoun, W.L. Irving, I.N. Guha, N.A. Hanley, and K.P. Hanley, *Osteopontin is a novel downstream target of SOX9 with diagnostic implications for progression of liver fibrosis in humans*. *Hepatology*, 2012. **56**(3): p. 1108-16.
213. Wieland, S.F. and F.V. Chisari, *Stealth and Cunning: Hepatitis B and Hepatitis C Viruses*. *Journal of Virology*, 2005. **79**(15): p. 9369-9380.
214. Park, Y.N. and M. Roncalli, *Large liver cell dysplasia: a controversial entity*. *J Hepatol*, 2006. **45**(5): p. 734-43.
215. Amin, M.A., D. Sabry, L.A. Rashed, W.M. Aref, M.A. el-Ghobary, M.S. Farhan, H.A. Fouad, and Y.A. Youssef, *Short-term evaluation of autologous transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in patients with cirrhosis: Egyptian study*. *Clin Transplant*, 2013. **27**(4): p. 607-12.
216. Park, C.H., S.H. Bae, H.Y. Kim, J.K. Kim, E.S. Jung, H.J. Chun, M.J. Song, S.E. Lee, S.G. Cho, J.W. Lee, J.Y. Choi, S.K. Yoon, N.I. Han, and Y.S. Lee, *A pilot study of autologous*

- CD34-depleted bone marrow mononuclear cell transplantation via the hepatic artery in five patients with liver failure.* *Cytotherapy*, 2013. **15**(12): p. 1571-9.
217. Mohamadnejad, M., K. Alimoghaddam, M. Bagheri, M. Ashrafi, L. Abdollahzadeh, S. Akhlaghpour, M. Bashtar, A. Ghavamzadeh, and R. Malekzadeh, *Randomized placebo-controlled trial of mesenchymal stem cell transplantation in decompensated cirrhosis.* *Liver Int*, 2013. **33**(10): p. 1490-6.
218. Spahr, L., Y. Chalandon, S. Terraz, V. Kindler, L. Rubbia-Brandt, J.L. Frossard, R. Breguet, N. Lanthier, A. Farina, J. Passweg, C.D. Becker, and A. Hadengue, *Autologous bone marrow mononuclear cell transplantation in patients with decompensated alcoholic liver disease: a randomized controlled trial.* *PLoS One*, 2013. **8**(1): p. e53719.
219. Rossi, E., L.A. Adams, M. Bulsara, and G.P. Jeffrey, *Assessing liver fibrosis with serum marker models.* *Clin Biochem Rev*, 2007. **28**(1): p. 3-10.
220. Pai, M., D. Spalding, F. Xi, and N. Habib, *Autologous bone marrow stem cells in the treatment of chronic liver disease.* *Int J Hepatol*, 2012. **2012**: p. 307165.
221. Liao, X., J.Y. AnCheng, Q.J. Zhou, and C. Liao, *Therapeutic effect of autologous bone marrow-derived liver stem cells transplantation in hepatitis B virus-induced liver cirrhosis.* *Hepatogastroenterology*, 2013. **60**(123): p. 406-9.
222. Gordon, M.Y., N. Levicar, M. Pai, P. Bachellier, I. Dimarakis, F. Al-Allaf, H. M'Hamdi, T. Thalji, J.P. Welsh, S.B. Marley, J. Davies, F. Dazzi, F. Marelli-Berg, P. Tait, R. Playford, L. Jiao, S. Jensen, J.P. Nicholls, A. Ayav, M. Nohandani, F. Farzaneh, J. Gaken, R. Dodge, M. Alison, J.F. Apperley, R. Lechler, and N.A. Habib, *Characterization and clinical application of human CD34+ stem/progenitor cell populations mobilized into the blood by granulocyte colony-stimulating factor.* *Stem Cells*, 2006. **24**(7): p. 1822-30.
223. Yan, L., Y. Han, J. Wang, J. Liu, L. Hong, and D. Fan, *Peripheral blood monocytes from patients with HBV related decompensated liver cirrhosis can differentiate into functional hepatocytes.* *Am J Hematol*, 2007. **82**(11): p. 949-54.
224. Khan, A.A., N. Parveen, V.S. Mahaboob, A. Rajendraprasad, H.R. Ravindrakrishna, J. Venkateswarlu, S.G. Rao, M.L. Narusu, M.N. Khaja, R. Pramila, A. Habeeb, and C.M. Habibullah, *Safety and efficacy of autologous bone marrow stem cell transplantation through hepatic artery for the treatment of chronic liver failure: a preliminary study.* *Transplant Proc*, 2008. **40**(4): p. 1140-4.
225. Guillen, N., M.A. Navarro, C. Arnal, E. Noone, J.M. Arbones-Mainar, S. Acin, J.C. Surra, P. Muniesa, H.M. Roche, and J. Osada, *Microarray analysis of hepatic gene expression identifies new genes involved in steatotic liver.* *Physiol Genomics*, 2009. **37**(3): p. 187-98.
226. Fang, Y.J., Z.H. Lu, G.Q. Wang, Z.Z. Pan, Z.W. Zhou, J.P. Yun, M.F. Zhang, and D.S. Wan, *Elevated expressions of MMP7, TROP2, and survivin are associated with survival, disease recurrence, and liver metastasis of colon cancer.* *Int J Colorectal Dis*, 2009. **24**(8): p. 875-84.
227. Chen, F., K. Beezhold, and V. Castranova, *JNK1, a potential therapeutic target for hepatocellular carcinoma.* *Biochim Biophys Acta*, 2009. **1796**(2): p. 242-51.
228. Klaassen, C.D. and L.M. Aleksunes, *Xenobiotic, bile acid, and cholesterol transporters: function and regulation.* *Pharmacol Rev*, 2010. **62**(1): p. 1-96.
229. Merrell, M.D., B.A. Nyagode, J.D. Clarke, N.J. Cherrington, and E.T. Morgan, *Selective and Cytokine-dependent Regulation of Hepatic Transporters and Bile Acid Homeostasis During Infectious Colitis in Mice.* *Drug Metab Dispos*, 2013.
230. Siewert, E., C.G. Dietrich, F. Lammert, P.C. Heinrich, S. Matern, C. Gartung, and A. Geier, *Interleukin-6 regulates hepatic transporters during acute-phase response.* *Biochem Biophys Res Commun*, 2004. **322**(1): p. 232-8.
231. Tsuruoka, S., K. Ishibashi, H. Yamamoto, M. Wakaumi, M. Suzuki, G.J. Schwartz, M. Imai, and A. Fujimura, *Functional analysis of ABCA8, a new drug transporter.* *Biochem Biophys Res Commun*, 2002. **298**(1): p. 41-5.

232. Tanaka, A., K. Tsuneyama, M. Mikami, S. Uegaki, M. Aiso, and H. Takikawa, *Gene expression profiling in whole liver of bile duct ligated rats: VEGF-A expression is up-regulated in hepatocytes adjacent to the portal tracts*. *J Gastroenterol Hepatol*, 2007. **22**(11): p. 1993-2000.
233. Campbell, K.M., G.E. Sabla, and J.A. Bezerra, *Transcriptional reprogramming in murine liver defines the physiologic consequences of biliary obstruction*. *J Hepatol*, 2004. **40**(1): p. 14-23.
234. Matsuda, A., A. Jacob, R. Wu, M. Zhou, M. Aziz, and P. Wang, *Milk fat globule--EGF factor VIII ameliorates liver injury after hepatic ischemia-reperfusion*. *J Surg Res*, 2013. **180**(1): p. e37-46.
235. Wu, R., W.W. Chaung, M. Zhou, Y. Ji, W. Dong, Z. Wang, X. Qiang, and P. Wang, *Milk fat globule EGF factor 8 attenuates sepsis-induced apoptosis and organ injury in alcohol-intoxicated rats*. *Alcohol Clin Exp Res*, 2010. **34**(9): p. 1625-33.
236. Ceballos-Viro, J., J.M. Lopez-Picazo, J.L. Perez-Gracia, J.J. Sola, G. Aisa, and I. Gil-Bazo, *Fibrosing cholestatic hepatitis following cytotoxic chemotherapy for small-cell lung cancer*. *World J Gastroenterol*, 2009. **15**(18): p. 2290-2.
237. Kojima, H., M. Abei, N. Takei, Y. Mukai, Y. Hasegawa, T. Iijima, and T. Nagasawa, *Fatal reactivation of hepatitis B virus following cytotoxic chemotherapy for acute myelogenous leukemia: fibrosing cholestatic hepatitis*. *Eur J Haematol*, 2002. **69**(2): p. 101-4.
238. Lee, H.K., G.S. Yoon, K.S. Min, Y.W. Jung, Y.S. Lee, D.J. Suh, and E. Yu, *Fibrosing cholestatic hepatitis: a report of three cases*. *J Korean Med Sci*, 2000. **15**(1): p. 111-4.
239. Wasmuth, J.C., H.P. Fischer, T. Sauerbruch, and F.L. Dumoulin, *Fatal acute liver failure due to reactivation of hepatitis B following treatment with fludarabine/cyclophosphamide/rituximab for low grade non-Hodgkin's lymphoma*. *Eur J Med Res*, 2008. **13**(10): p. 483-6.
240. Foo, N.C., B.Y. Ahn, X. Ma, W. Hyun, and T.S. Yen, *Cellular vacuolization and apoptosis induced by hepatitis B virus large surface protein*. *Hepatology*, 2002. **36**(6): p. 1400-7.
241. Marinos, G., S. Rossol, P. Carucci, P.Y. Wong, P. Donaldson, M.J. Hussain, D. Vergani, B.C. Portmann, R. Williams, and N.V. Naoumov, *Immunopathogenesis of hepatitis B virus recurrence after liver transplantation*. *Transplantation*, 2000. **69**(4): p. 559-68.
242. Sakaguchi, S., *Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self*. *Nat Immunol*, 2005. **6**(4): p. 345-52.
243. Stoop, J.N., R.G. van der Molen, C.C. Baan, L.J.W. van der Laan, E.J. Kuipers, J.G. Kusters, and H.L.A. Janssen, *Regulatory T cells contribute to the impaired immune response in patients with chronic hepatitis B virus infection*. *Hepatology*, 2005. **41**(4): p. 771-778.
244. Moriyama, T., S. Guilhot, K. Klopchin, B. Moss, C.A. Pinkert, R.D. Palmiter, R.L. Brinster, O. Kanagawa, and F.V. Chisari, *Immunobiology and pathogenesis of hepatocellular injury in hepatitis B virus transgenic mice*. *Science*, 1990. **248**(4953): p. 361-4.
245. Nowak, M.A., S. Bonhoeffer, A.M. Hill, R. Boehme, H.C. Thomas, and H. McDade, *Viral dynamics in hepatitis B virus infection*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1996. **93**(9): p. 4398-4402.
246. Ohashi, K., M. Tsutsumi, Y. Nakajima, K. Kobitsu, H. Nakano, and Y. Konishi, *Telomere changes in human hepatocellular carcinomas and hepatitis virus infected noncancerous livers*. *Cancer*, 1996. **77**(8 Suppl): p. 1747-51.
247. Lunz, J.G., 3rd, H. Tsuji, I. Nozaki, N. Murase, and A.J. Demetris, *An inhibitor of cyclin-dependent kinase, stress-induced p21Waf-1/Cip-1, mediates hepatocyte mito-inhibition during the evolution of cirrhosis*. *Hepatology*, 2005. **41**(6): p. 1262-71.
248. Alison, M.R., *Liver stem cells: implications for hepatocarcinogenesis*. *Stem Cell Rev*, 2005. **1**(3): p. 253-60.

LITERATURVERZEICHNIS

249. Gouw, A.S., A.D. Clouston, and N.D. Theise, *Ductular reactions in human liver: diversity at the interface*. Hepatology, 2011. **54**(5): p. 1853-63.
250. Yang, S., A. Koteish, H. Lin, J. Huang, T. Roskams, V. Dawson, and A.M. Diehl, *Oval cells compensate for damage and replicative senescence of mature hepatocytes in mice with fatty liver disease*. Hepatology, 2004. **39**(2): p. 403-11.
251. Fuchs, E., T. Tumbar, and G. Guasch, *Socializing with the neighbors: stem cells and their niche*. Cell, 2004. **116**(6): p. 769-78.
252. Lorenzini, S., T.G. Bird, L. Boulter, C. Bellamy, K. Samuel, R. Aucott, E. Clayton, P. Andreone, M. Bernardi, M. Golding, M.R. Alison, J.P. Iredale, and S.J. Forbes, *Characterisation of a stereotypical cellular and extracellular adult liver progenitor cell niche in rodents and diseased human liver*. Gut, 2010. **59**(5): p. 645-654.

11 ERKLÄRUNG

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Gießen, im April 2014

Johannes Stiefel