

# UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Pathologie

Direktor: Prof. Dr. med. Guido Sauter

## **HCV-Diagnostik am Paraffingewebe. Vergleich und Etablierung der Reverse-Transkriptase-PCR und Immunhistochemie zum Virusnachweis nach Lebertransplantation.**

### **Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Florian Franz Pfefferkorn  
aus Hamburg

Hamburg 2009

**Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 17.06.2010**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

**Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. H. Schäfer**

**Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: PD Dr. R. Simon**

**Prüfungsausschuss, dritte Gutachterin: Prof. Dr. Sterneck**

<b>I. Einleitung und Problemstellung.....</b>	<b>3</b>
1) Klassifikation.....	3
2) Epidemiologie.....	4
3) Labormedizinische Testverfahren.....	5
4) Histopathologische Beurteilung.....	6
5) Probleme in der HCV-Diagnostik unter besonderer Berücksichtigung der Situation von Lebertransplantationspatienten.....	8
6) Zielsetzung der Arbeit.....	10
<b>II. Material und Patienten.....</b>	<b>10</b>
<b>III. Methoden.....</b>	<b>12</b>
1) Entparaffinierung.....	12
2) RNA-Extraktion.....	12
4) RT-PCR (Reverse-Transkriptase-Polymerase-Ketten-Reaktion).....	15
5) Gelelektrophorese.....	17
6) Sequenzierung.....	17
7) Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung.....	18
8) Immunhistochemie.....	18
<b>IV. Ergebnisse.....</b>	<b>26</b>
1) Ergebnisse der RT-PCR.....	26
2) Histologische Diagnosen.....	36
3) Immunhistochemische Ergebnisse.....	43
<b>V. Diskussion.....</b>	<b>51</b>
<b>VI. Zusammenfassung.....</b>	<b>57</b>
<b>VII. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>58</b>
<b>VIII. Danksagung.....</b>	<b>62</b>
<b>IX. Lebenslauf.....</b>	<b>63</b>
<b>X. Eidesstattliche Versicherung.....</b>	<b>64</b>

## Abkürzungsverzeichnis:

AK:	Antikörper
ALT:	Alanin-Aminotransferase
AST:	Aspartat-Aminotransferase
cDNA:	complementary DNA
EIA:	Enzymimmunoassay
FFPE:	Formalin-Fixed Paraffin Embedded
GAPDH:	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
$\gamma$ GT:	Gamma-Glutamyltransferase
HBV:	Hepatitis-B-Virus
HCV:	Hepatitis-C-Virus
HRP:	Horseradish-Peroxidase
HVR1 & 2:	Hypervariable Region 1 & 2
IHC:	Immunhistochemie
NCR:	Non-Coding-Region
OLT:	Orthotope Lebertransplantation
PCR:	Polymerase-Kettenreaktion
PBMC:	Peripheral Blood Mononuclear Cell
RT-PCR:	Reverse-Transkriptase PCR

## I. Einleitung und Problemstellung

### 1) Klassifikation

Das Hepatitis-C-Virus (HCV) gehört zur Gattung Hepacivirus, welches neben der Gattung Flavivirus der Familie der Flaviviren entstammt. Die einzelsträngige virale RNA (Positiv-Strang) ist von einer 40-60 nm großen Hülle umgeben. Transkription und Replikation werden vollständig durch die vom Virusgenom codierten Proteine gesteuert. Es existieren bislang sechs Genotypen und ca. 100 Subtypen (Quasispezies). Das Genom besteht aus ungefähr 10.000 Nukleotiden mit einem einzigen ORF (Open-Reading-Frame) und es fehlt ein 3' Poly-A-Schwanz. Auf Translationsebene entsteht ein 3000 Aminosäuren umfassendes Polyprotein, das durch virusintrinsiche Nicht-Strukturproteine und Signalpeptidasen des endoplasmatischen Retikulums posttranslational modifiziert wird. Eine Besonderheit dieses Virus liegt in der ausschließlich durch molekulargenetische Techniken erfolgten Charakterisierung. [1,2,3]

Amino- und carboxyterminal befinden sich „non-coding-regions“ (NCR), die den Leserahmen flankieren und nicht translatiert werden (s. Abb. 1, Genomorganisation des HCV). Für den molekularbiologischen Nachweis mittels RT-PCR ist die am 5' Ende gelegene NCR von zentraler Bedeutung, da in dieser Region bei allen Genotypen einschließlich der Subtypen nur geringe sequenzspezifische Unterschiede zu finden sind. Die Strukturproteine (Core- bzw. Kapsidprotein, Hüllproteine E1 und E2) des Virus sind aminoterminal gelegen und werden durch Signalpeptidasen des endoplasmatischen Retikulums ko- und posttranslational modifiziert. Beide Hüllproteine konnten noch nicht in vivo nachgewiesen werden. Jegliche Aussagen stützen sich dabei auf in vitro Expressionsstudien und Sequenzierdaten. Die Nicht-Strukturproteine (p7, NS2-NS5) befinden sich carboxyterminal und werden durch die NS2/3-Metalloprotease und die NS3-Serinprotease proteolytisch gespalten. Untereinheiten der Nicht-Strukturproteine dienen als Kofaktor (NS4A), Helicase (NS3) und RNA-abhängige RNA-Polymerase (NS5B). Die Metalloprotease und das NS3/4A Heterodimer beeinflussen den Interferonstoffwechsel im Rahmen der unspezifischen Abwehr negativ. [1,2]

Wie oben bereits erwähnt, ist es aufgrund der ausschließlichen Charakterisierung des Virus mit molekularen Methoden und der noch unzureichenden Etablierung eines in vitro Modells zur Anzüchtung von HCV zwecks näheren Studiums des Replikationszyklus bisher nicht möglich, präzise Aussagen über die zellulären Lokalisationen des Virus zu treffen. Bislang wurde davon ausgegangen, dass das Virus überwiegend zytoplasmatisch lokalisiert ist und die Replikation an intrazellulären Membranen erfolgt. Erst kürzlich zeigten sich vielversprechende Ansätze zur Etablierung einer in vitro Kultivierung und Replikation von HCV-Isolaten. Dabei ist es gelungen, Makrophagen mit HCV aus menschlichem Serum/Plasma zu infizieren und anschließend B-Zellen aus Nabelschnurblut mit dem aus den Makrophagen gewonnenen Virus zu infizieren. [4] Weiterführende Versuche haben die Möglichkeit der Koexistenz von HCV, HIV-1 und HHV-6 in einer Zelle der hämatopoetischen Reihe (d.h. Monozyten, B-Zellen oder T-Zellen) gezeigt. [5] Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten Bestandteile des HCV im Kern, perinukleären Raum, im Zytoplasma und in Vesikeln. Dies könnte die These der ausschließlich zytoplasmatischen Lokalisation und Replikation von HCV in Frage stellen. [6]

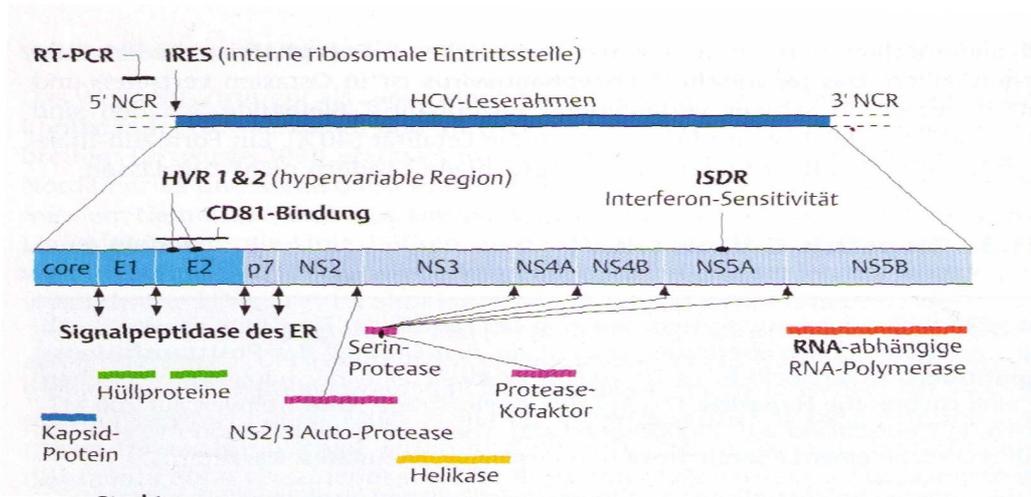


Abb. 1: Genom-Organisation des HCV. Aus „Taschenlehrbuch Medizinische Mikrobiologie“, 11. Aufl. Stuttgart: Thieme, 2005

## 2) Epidemiologie

Die Seroprävalenz der Hepatitis-C-Infektion beruht hauptsächlich auf von Blutspendern erhobenen Daten und ist aufgrund dieser kleinen Population somit nur begrenzt aussagekräftig. Die Transmissionsrate ist seit Einführung des Screenings von Blutprodukten und Geweben in den industrialisierten Ländern erheblich zurückgegangen. Schätzungen gehen von einer Prävalenz eines positiven Anti-HCV-Status von 0,02 % bis 1,25 % aus. Abweichend davon sind wesentlich höhere Fallzahlen in den Ländern Afrika, Osteuropa, Italien, Spanien, Mittlerer Osten, Japan und Ägypten zu erwarten. Trotz einer Reduktion der Übertragungsrate durch Screening von Blutprodukten bleibt neben Faktoren wie i.v. Drogenabusus, schlechten hygienischen Bedingungen und illegalen Praktiken im Gesundheitswesen ein großer Teil an nicht näher bestimmbar Infektionsquellen. Schätzungen gehen in bis zu 50 % der Fälle von einer nicht näher indentifizierbaren Infektionsquelle aus.

Die oben erwähnte Zunahme der Sicherheit bei der Übertragung von Blutprodukten u.a. durch verbesserte hygienische Bedingungen im Gesundheitswesen führte in Europa neben weiteren Faktoren wie der Zunahme intravenösen Drogenabusus mit riskanten hygienischen Praktiken und nicht zuletzt der zunehmenden Immigration aus endemischen Gebieten zu signifikanten epidemiologischen Veränderungen, wie Umverteilungen des Genotyps und Entstehung von HCV-Rekombinanten. Es besteht eine Assoziation zwischen Übertragungsmodus und Subtyp: Zwischen Bluttransfusion und den Subtypen 1b und 2 und zwischen i.v. Drogenabusus und den Subtypen 1a, 3a und 4 wird ein Zusammenhang vermutet. [7,8]

### 3) Labormedizinische Testverfahren

Da im Gegensatz zur Hepatitis B die Hepatitis-C-Infektion im akuten Stadium nur selten symptomatisch verläuft, bereitet die Diagnose einige Schwierigkeiten. Im Prodromalstadium lässt sich häufig ein Anstieg der Aminotransferasen ALT und AST beobachten. Eine Woche vor dem darauf folgenden Bilirubinanstieg erreichen diese ihre Maximalwerte. Bei 30-70 % der Patienten findet sich ein anikterischer Verlauf; bei einem symptomatischen Verlauf ist die ALT ungefähr 15fach erhöht. Nach 5-12 Wochen normalisieren sich die Aminotransferasen in der Regel wieder. Rasch abfallende Werte weisen auf eine günstigere Prognose hin. [11]

Die serologische HCV-Diagnostik besteht im Wesentlichen aus Antikörpersuch- bzw. Antikörperbestätigungstests und qualitativen bzw. quantitativen Nukleinsäuretests.

Für das Screening zur Erhebung des anti-HCV-Status wird ein *EIA* (enzyme immunoassay) verwendet. Mittlerweile existiert bereits seit Einführung im Jahr 1990 die dritte Generation (*EIA-3*). Vorteile dieser Methode liegen in der einfachen Handhabung, geringen Kosten und einer geringen Variabilität in den Ergebnissen. Die Entwicklung vom *EIA-1* zum *EIA-3* hat sich in folgenden Schritten vollzogen:

*EIA-1* enthält ein einziges rekombinantes Antigen (c100-3) als Abkömmling des nichtstrukturellen NS4 Gens. Die Nachteile liegen in der suboptimalen Sensitivität und Spezifität. *EIA-2* enthält im Zuge der zweiten Generation zusätzlich das Core-Antigen und das NS-3-Antigen. In der dritten *EIA-3* Generation sind die Core- und NS-3-Antigene zur Erhöhung der Sensitivität modifiziert, hinzukommt das NS-5-Antigen. Die Sensitivität liegt bei 97 %. Ein negativer Screeningtest schließt eine Infektion insbesondere bei vorliegender Immundefizienz nicht sicher aus; in der Regel beträgt das diagnostische Zeitfenster vom Auftreten der Hepatitis (Transaminasenerhöhung, klinische Symptomatik) bis zum Nachweis von anti-HCV-Antikörper zwei bis drei Wochen. Ein negativer Test schließt mit o.g. Einschränkungen eine Infektion für die letzten drei Monate aus.

Ein positives Screening kann durch einen Immunoblot bestätigt werden, indem die in der Probe enthaltenen Proteine gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf Nitrozellulose fixiert und anschließend mit denselben *EIA*-Antigenen inkubiert werden. Eine positive Reaktion lässt sich im Anschluss fluoreszierend sichtbar machen. Allerdings ist der Einsatz von Bestätigungstests nur bei Populationen mit geringer Prävalenz wie z.B. Blutspendern sinnvoll, da in diesen Populationen häufig ein falsch positives *EIA*-Testergebnis durch erhöhte Gammaglobulinkonzentrationen hervorgerufen wird und durch korrekten Einsatz eines Immunoblots die Rate falsch-positiver *EIA*-Testergebnisse reduziert werden kann. Dies bedeutet im Umkehrschluss, dass bei Hochrisikopatienten das positive Ergebnis des *EIA* nur äußerst selten durch einen Immunoblot in Frage gestellt wird. [09]

Bei den *Nukleinsäuretests* wird zwischen qualitativen und quantitativen Verfahren unterschieden. Die qualitative RT-PCR (Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion) zum Nachweis von HCV-RNA (Detektionslimit < 50 IU HCV-RNA/ml) dient dem Nachweis einer geringgradigen Virämie, dem Screening von Blutspendern und ist das bedeutendste Verfahren für den Beweis einer Infektion bei Patienten mit positiver oder negativer Serologie, unklaren Transaminasenerhöhungen und bioptisch gesichertem Leberschaden. Die Sensitivität beträgt 96%, die Spezifität 99%. Ein negatives Ergebnis verkürzt das diagnostische Zeitfenster im Vergleich zum anti-HCV-Screening zwischen Infektion und Nachweisbarkeit auf zwei bis drei Wochen. Die Nachteile liegen in den vielen

Variationen der Methodik, bedingt durch unterschiedlichen Umgang mit dem Untersuchungsgut, variierend korrektes Primerdesign, DNA-Produktkontamination und unterschiedlich sensitive Detektion der Systeme nach erfolgter Amplifikation. Alle diese Faktoren führen zu einer großen Variabilität der Ergebnisse. Erstaunlicherweise trifft dies auch für Labore zu, die den für diesen Zweck standardisierten *Roche Molecular Diagnostics* Amplicor test kit verwenden.

Unter den quantitativen Nukleinsäuretests befinden sich die quantitative PCR (in diesem Fall meist als Realtime-RT-PCR angewendet) und der bDNA (branched-DNA) assay. Das Prinzip der PCR beruht auf der Amplifikation des Targets, d.h. die gesuchte Nukleinsäuresequenz (Target) wird selbst vervielfältigt und mit nur wenigen Markermolekülen beladen. Bei dem auf der Signalamplifikation basierenden bDNA assay bleibt die Konzentration der Zielsequenz gleich, es wird lediglich das Detektionssignal mit einer großen Zahl an Markermolekülen auf jedem Zielmolekül verstärkt. Der Vorteil insbesondere der PCR liegt bei der Nachweismöglichkeit einer sehr geringen Viruslast. Der Nachteil besteht in der bereits o.g. Variabilität, besonders auch bei verschiedenen Genotypen. Die auf der Signalamplifikation beruhende Methode weist im Gegenzug eine geringere Sensitivität auf und macht bei negativem Testergebnis eine PCR erforderlich. Dafür besitzt sie eine hohe Reproduzierbarkeit und im Rahmen klinischer Hepatitis-C-Studien zeigt sich eine vielfach publizierte große Erfahrung.

Quantitative Nukleinsäuretests geben Informationen über Prognose und Wahrscheinlichkeit des Therapieansprechens.

Neben der Erfassung des anti-HCV-Status und der Viruslast ist die Genotypisierung eine weitere wichtige Säule im Rahmen der labormedizinischen Diagnostik. Im Rahmen der Genotypisierung existieren zwei verschiedene Testkategorien: Es wird zwischen Screeningtests zur Detektion von Punktmutationen und Bestätigungstests zur Evaluation längerer Gensegmente unterschieden. Die Screeningmethoden untergliedern sich dabei in drei weitere Bereiche: Analyse von RFLP (Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen) am 5´Ende, „LIPA assay“ (reverse dot blot hybridization) ebenfalls am 5´Ende und nested PCR des HCV Core-Gen mit genotypspezifischen Primern. [10,11]

#### 4) *Histopathologische Beurteilung*

Die biopsische Diagnostik im Rahmen der Hepatitis-C-Infektion ist als Assessmentverfahren zur Einschätzung des Schweregrades der Lebererkrankung unentbehrlich. Sie ermöglicht die Aussage über das Fortschreiten der Erkrankung und gibt Hinweise auf die Therapiedringlichkeit. Dies ist u.a. darin begründet, dass die Serologie und die Transaminasen nur Surrogatmarker darstellen und keine Korrelation mit den histopathologischen Veränderungen aufweisen. Als häufigste Einzelindikation zur Leberpunktionsbiopsie für die Evaluierung einer chronischen Hepatitis C sollte diese unbedingt vor Beginn einer antiviralen Therapie durchgeführt werden. Für die ordnungsgemäße Durchführung der biopsischen Diagnostik muss ein ausreichend großes und damit repräsentatives Biopsat entnommen werden (mindestens zwei Zentimeter lang und Anschnitt von fünf Portalfeldern). Die zwei Hauptaspekte bestehen in Grading (entzündliche Aktivität) und Staging (Stadium der

Fibrose). Für die Routinediagnostik hat sich der Desmet/Scheuer-Score zur Ermittlung der histologischen Aktivitäts- und Fibroseindizes bewährt. [12,13]

Die Zeichen der akuten Virushepatitis lassen sich morphologisch in Hepatozyten- und Mesenchymveränderungen untergliedern.

Die hepatozytären Veränderungen bestehen vorrangig in Leberzelldegeneration und Nekrose. Es finden sich hydropische Ballonzellen (läppchenzentral) und Councilman-Körper (eosinophile Degeneration von über das gesamte Leberläppchen disseminierten Leberzellen). Der Pathologe spricht von einer lobulären Hepatitis.

Die mesenchymale Entzündungsreaktion äußert sich in der Lymphozyteninvasion in die Portalfelder und Leberläppchen. Die entzündlichen Infiltrate erstrecken sich vom Portalfeld zur parenchymatösen Grenzplatte. Sollte diese Nekrosen aufweisen, wird von einer Virushepatitis mit Chronizitätszeichen gesprochen. Kupffer-Zellen verteilen sich diffus und herdförmig als Kupffer-Zell-Knötchen, sie enthalten Ceroid- und Siderinpigmente als Metaboliten der Hepatozyten im Rahmen der Abräumreaktion, die der Parenchymläsion folgt. Diese Pigmente und insbesondere auch die in den Portalfeldern vorkommenden Phagozytenester können mittels Eisenfärbung sichtbar gemacht werden. Ausgeprägte Cholestasezeichen (tubuläre Anordnung von Hepatozyten um Gallethromben) und konfluierende Nekrosen zwischen Portalfeldern und Zentralvenen oder ausschließlich zwischen Zentralvenen weisen auf besonders schwere Verläufe der akuten Virushepatitis hin, sind jedoch bei der HCV Infektion sehr selten zu finden.

Bei der chronischen Virushepatitis wird die leichte von der schweren Form unterschieden.

Die leichte Form weist nur geringgradige Nekrosen auf, die parenchymatöse Grenzplatte ist intakt und Lymphozyteninfiltrationen sind vorrangig auf das Portalfeld beschränkt. Im Gegensatz zur HBV Infektion lassen sich bei der Hepatitis C keine Milchglaszellen (diese sind charakterisiert durch Zytoplasmaveränderungen mit vermehrtem endoplasmatischem Retikulum) vorfinden. Begleitend werden häufig eine Steatose, Veränderungen des Gallengangsepithels und Lymphfollikel in den Portalfeldern beobachtet.

Bei der schweren Form beschränken sich die Lymphozyteninfiltrate nicht mehr auf das Portalfeld, es kommt zum Übergreifen auf das gesamte Läppchen. Damit einhergehend lassen sich sogenannte Mottenfraßnekrosen in der parenchymatösen Grenzplatte (auch als „interface hepatitis“ bezeichnet) beobachten. Weitere Befunde stellen Einzelzelldegenerationen und -nekrosen und Kupffer-Zell-Knötchen dar. Die sich aus der Nekrose entwickelnde Fibrose führt über Septenbildung oftmals zur Leberzirrhose. [12]

## *5) Probleme in der HCV-Diagnostik unter besonderer Berücksichtigung der Situation von Lebertransplantationspatienten*

Die bislang aufgeführten Tests zur Diagnostik einer Hepatitis-C-Infektion beruhen auf der Tatsache, dass mit Hilfe der Histologie, der Serologie zur Erfassung des anti-HCV-Antikörperstatus und dem Nachweis von Virus-RNA im Blut eine eindeutige Diagnose möglich ist. Folgender Abschnitt soll die Fallstricke in der Etablierung einer eindeutigen Diagnose unter besonderer Berücksichtigung der Situation bei Lebertransplantationspatienten aufzeigen.

Castillo et al. [14] haben an einem Kollektiv von 100 Patienten mit unklaren Erhöhungen der Transaminasen (ALT, AST und GGT) gezeigt, dass sich bei 57 Patienten mit negativem anti-HCV-Status und Seronegativität für HCV-RNA mittels RT-PCR das Virus im Lebergewebe dennoch nachweisen ließ. Der Nachweis des Negativstrangs des Viruserbeguts in 84 % der Fälle beweist das Vorhandensein einer aktiven Infektion, da dieser Voraussetzung für die Replikation ist. Bei den HCV-positiven Patienten konnte wiederum in 70 % der Fälle das Virus in den PBMCs nachgewiesen werden. Das Vorhandensein immunkompetenter CD2, CD3 und CD8 Zellen spricht gegen die Vermutung einer Immundefizienz, wie sie bei den später zu besprechenden Transplantationspatienten der Fall ist. In dieser Studie konnte zudem gezeigt werden, dass eine okkulte Hepatitis-C-Infektion mit einer höheren Inzidenz für eine Nekroinflammation und Fibrose einhergeht.

Carreno et al. [15] haben Biopsiematerial von Patienten mit normalen Transaminasenwerten, seronegativer HCV-RNA und positivem anti-HCV-Antikörperstatus untersucht und in 83 % der Fälle intrahepatische Virus-RNA detektieren können. In analoger Weise spricht auch hier die Präsenz antigenomischer HCV-RNA für eine aktive Virusreplikation.

Kalinski et al. [16] haben ebenfalls die intrahepatische HCV-Detektion zur Diagnosefindung beschrieben. So hat erst die postmortem angeordnete Untersuchung des in Paraffin eingebetteten Lebergewebes mittels RT-PCR die Diagnose einer Hepatitis-C-Infektion bestätigen können, die ursächlich für die bis zu diesem Zeitpunkt als kryptogene Leberzirrhose mit begleitender membranoproliferativer Glomerulonephritis bezeichnete Erkrankung war. Serologisch ergab sich kein Hinweis auf eine Infektion mit hepatotropen Viren. Lediglich erhöhte Transaminasenwerte und ein erniedrigter Quick-Wert lagen vor.

In mehr als 20 % der Fälle lässt sich trotz positiven EIA-Ergebnisses keine HCV-RNA im Serum nachweisen, was eine unklare Diagnose zur Folge hat. Dies könnte einerseits die Ausheilung der Infektion bedeuten, auf der anderen Seite gibt es aber auch Hinweise für eine bis zu 10.000fach geringere Viruslast im Serum verglichen mit der intrahepatischen Viruslast, mit der Folge einer trügerischen Seronegativität [17]. Prinzipiell ist der intrahepatische Virusnachweis am gefrorenen Frischgewebe oder am formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten Lebergewebe möglich. Beide Methoden bieten Vor- und Nachteile. Beide Verfahren haben eine ähnlich hohe Sensitivität (bei der letzten Methode liegt sie zwischen 60-84%). Der Vorteil der Formalinfixierung liegt in der einfachen Durchführbarkeit, dabei hat sich eine Fixationsdauer von 24 Stunden als optimal erwiesen. Im Gegenzug ist die Gefriertechnik wesentlich aufwendiger und erfordert die Verwendung von flüssigem Stickstoff, welcher aufgrund biologischen Gefährdungspotentials nicht immer an entsprechender Stelle im Krankenhaus vorhanden ist. Eine nicht rechtzeitig erfolgte

Fixierung oder Kryokonservierung und eine zu lange oder kurze Einwirkdauer des Formalins kann zur Degradierung der RNA und damit zu einem falsch-negativen Virusnachweis führen. [18]

Besondere Bedeutung kommt dem intrahepatischen Virusnachweis bei einem Lebertransplantationspatienten bei. Die Hepatitis-C-Infektion ist einer der Hauptgründe für Lebererkrankungen im Endstadium und damit Hauptindikation für eine orthotope Lebertransplantation (OLT). Die Literatur beschreibt überwiegend einheitlich eine persistente HCV-RNA Seropositivität nach OLT. Gründe dafür könnten in extrahepatischen Virusreservoirs wie z.B. PBMCs liegen, in denen sich das Virus auch nachweislich repliziert. Weiterhin scheint die Detektion von HCV-RNA im Lebergewebe mittels RT-PCR in 90 % der Fälle die These einer rekurrenten Hepatitis C zu untermauern. Die Schwierigkeit besteht in diesem Fall in der Bestimmung des Zeitpunkts der Reinfektion. [19]

Differentialdiagnostisch kommt neben einer Reinfektion auch eine Abstoßungsreaktion in Betracht. Allerdings bestehen in der histologischen Diagnosefindung wegen des immunsupprimierten Status des OLT-Patienten erhebliche Schwierigkeiten. Eine falsche Diagnose kann in diesem Fall fatale Folgen nach sich ziehen: Wird eine rekurrente Infektion als Abstoßungsreaktion fehlgedeutet und als Therapiemaßnahme eine verstärkte Immunsuppression eingeleitet, so wird die Entzündungsreaktion exazerbiert. Umgekehrt wird bei Forcierung der antiviralen Therapie bei fehlgedeuteter rekurrenter Infektion die Abstoßungsreaktion beschleunigt. [20]

Gegenstand aktueller Forschung bleibt die Frage, ob der Virus-Nukleinsäurenachweis im Lebergewebe eines OLT-Patienten ein Beweis für eine Reinfektion ist. Guerrero et al. [21] haben in einer Studie an 14 Transplantaten vor und nach orthotoper Lebertransplantation (OLT) gezeigt, dass der Virusnachweis mittels Nukleinsäuretestverfahren die Infektion des Lebergewebes beweist und nicht die Virämie der die Hepatozyten umgebenden Sinusoide anzeigt.

Trotzdem kann die RT-PCR keine genaue Auskunft insbesondere bei der Fragestellung nach einer rekurrenten Infektion über die Lokalisation des Virus geben. Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass durch den intrahepatischen Virus-Nukleinsäurenachweis nur eine Virämie der Sinusoide dargestellt wird. Zudem ist die Replikationsrate des Virus in den Hepatozyten sehr gering. Dieses Problem ließe sich durch die Etablierung zuverlässiger Verfahren zur Lokalisation des HCV-Virus wie In-situ-Hybridisierung, Immunhistochemie oder auch In-situ-PCR lösen, da diese einen direkten Nachweis von HCV-Antigenen bzw. HCV-RNA in der Leberzelle ermöglichen können. Die Zuverlässigkeit solcher Verfahren variiert allerdings noch stark und die Anwendung erfolgt derzeit nur in experimentellen Studien. [22]

Im Bereich der Immunhistochemie sind bislang mono- und polyklonale Antikörper gegen die HCV-Antigene NS3, NS4, NS5 (Nicht-Struktur-Proteine), Core und E2 (Struktur-Proteine) getestet worden. [39] Der am besten evaluierte monoklonale Antikörper ist Tordji-22, der sich gegen die Antigenregion NS3/4 richtet. Die Aussagen zu seiner Sensitivität und Spezifität reichen von 70 % bzw. 84% bis zur Unspezifität bei Posttransplantationspatienten. [23-34]

Monoklonale Antikörper gegen Epitope der hypervariablen Region E2 wurden in Studien ebenfalls als vielversprechend gewertet, Angaben über Sensitivität und Spezifität reichen bis zu 96% bzw. 91%. [35-38]

## 6) Zielsetzung der Arbeit

Um zwischen einer Abstoßungsreaktion und einer Reinfektion mit HCV post transplantationem und den damit verbundenen erheblichen therapeutischen Konsequenzen unterscheiden zu können, bedarf es neuer molekularer diagnostischer Möglichkeiten. In dieser Studie wurden die gegenwärtigen Möglichkeiten der RT-PCR am Paraffingewebe und der IHC auf ihre Eignung überprüft.

Zunächst sollte in Ermangelung einer etablierten Methode zur Detektion intrahepatischer HCV-RNA am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf anhand von Paraffingewebe von Lebertransplantationspatienten mit positivem anti-HCV-Antikörperstatus und HCV-RNA Seropositivität eine RT-PCR (Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion) erprobt und etabliert werden. Dabei wurde auf eine möglichst hohe Viruslast und einen hohen Antikörpertiter zum Zeitpunkt der Transplantation geachtet. Als Untersuchungsgut diente das Leberexplantat, um sicherzustellen, dass das Lebergewebe virusinfiziert ist. Bei der Erprobung und Etablierung der RT-PCR sollten zwei Fragen nachgegangen werden: Erstens sollte geprüft werden, ob ein intrahepatischer Virusnachweis überhaupt möglich ist und die Ergebnisse diverser Studien zu diesem Thema sich reproduzieren lassen. Zweitens sollten die mit der RT-PCR als HCV-positiv ermittelten Gewebe als Referenzkontrollen für die Etablierung eines immunhistochemischen Verfahrens zum intrazellulären HCV-Nachweis dienen, um der Frage nachzugehen, ob die RT-PCR-positiven Ergebnisse eventuell nur eine sinusoidale Virämie widerspiegeln. Im Rahmen der Immunhistochemie wurde die Brauchbarkeit monoklonaler Antikörper gegen die HCV-Antigene NS3, NS4 und NS5 geprüft. Zielsetzung dieser Methode einerseits ist der intrazelluläre Virusnachweis und damit der Erhalt von Information über genaue zelluläre Lokalisationen des Virus im Rahmen des viralen Replikationszyklus und andererseits Informationen über Anzahl und Distribution infizierter Hepatozyten.

## II. Material und Patienten

Ziel war die Auswahl eines geeigneten Patientenkollektivs zum Vergleich zwischen sicher positiven und sicher negativen Proben. Dazu wurden acht formalinfixierte, in Paraffin eingebettete (FFPE) Lebergewebeblöcke aus dem Archiv des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf histologisch und molekularbiologisch untersucht. Diese acht Gewebeblöcke stammen von sechs Patienten der Klinik und Poliklinik für Hepatobiliäre Chirurgie und Transplantationschirurgie, die sich in den Jahren 2004 – 2007 einer Lebertransplantation unterzogen haben. Die Blöcke A+D stammen von demselben Patienten. Blöcke B+G stammen ebenfalls von einem Patienten, allerdings handelt es sich bei Block B um Lebergewebe von der explantierten Leber. Block G ist ein 1,5 cm langer, bioptisch entnommener Stanzzyylinder von der Transplantatleber. Mit Ausnahme von Block G handelt es sich bei allen untersuchten Blöcken um Lebergewebe von Explantaten (s. Tab.1).

Die Auswahl der entsprechenden Patienten richtete sich nach der HCV-Serologie unmittelbar vor dem transplantationschirurgischen Eingriff. Diese beinhaltete den direkten Nachweis der Virus-RNA mittels PCR und die Bestimmung des Anti-HCV

Antikörperstatus einschließlich des Subtyps. In die serologischen Befundberichte wurde im Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene des Universitätskrankenhauses Hamburg-Eppendorf Einsicht genommen. In die weitergehende Untersuchung sollte ein seronegativer Patient aufgenommen werden, sodass von den sechs untersuchten Patienten einer seronegativ und fünf seropositiv waren. Anhand der Befundkonstellationen wurden insgesamt sieben Patienten in dem angegebenen Zeitraum für eine weiterführende histologische und molekularbiologische Untersuchung für geeignet erachtet, allerdings standen nur von fünf dieser sieben HCV-positiven Patienten die entsprechenden Gewebeblöcke für die Untersuchung zur Verfügung. Das Altersspektrum zum Zeitpunkt der Lebertransplantation erstreckt sich von 34 – 67 Jahre (Mittelwert: 50,8 Jahre; Median: 49,5 Jahre). Vier Patienten waren männlichen, zwei weiblichen Geschlechts.

Tab.1: Auswahl des Patientenkollektivs

Pat.	Gewebe nr.	HCV-PCR (IU/ml)	anti-HCV (S/CO)	Subtyp	LTX Dat	Alter LTX
A	E-10187/04	7e+04 (14.05.04)	52 (05.06.04)	1B	14.05.04	53
B	E-23750/06	3e+05 (14.11.06)	148 (14.11.06)	1A	14.11.06	46
C	E-10141/07	2e+04 (04.05.07)	24 (29.11.07)	1B	04.05.07	63
D	E-10187/04	7e+04 (14.05.04)	52 (05.06.04)	1B	14.05.04	53
E	E-13805/04	2e+05 (06.10.03)	66 (12.07.04)	1B	06.07.04	67
F	E-04550/07	3e+04 (13.12.06)	12 (10.07.07)	1A	26.02.07	42
G	E-23923/06	3e+05 (14.11.06)	148 (14.11.06)	1A	14.11.06	46
H	E-09001/06	Neg.	Neg.	Neg.	04.05.06	34

Pat.	Geburtsdatum	Geschlecht
A+D	20.04.51	m
B+G	07.03.06	w
C	05.03.44	m
E	14.07.36	w
F	24.09.64	m
H	24.01.72	m

### III. Methoden

#### 1) Entparaffinierung

Die am Mikrotom gewonnenen Schnitte von jeweils 2x20 µm Paraffingewebe werden in ein 1,5 ml Eppendorfröhrchen überführt. Anschließend wird unter dem Abzug überall 1 ml Xylol hinzugefügt, geschüttelt und kurz herunterzentrifugiert. Nach zehnminütiger Inkubation des Xylols bei Raumtemperatur werden die Proben 2 Minuten bei 17,9 g (13.000 rpm in der Tischzentrifuge) zentrifugiert. Im Anschluss werden die Überstände vorsichtig ohne Gewebe mitzunehmen abpipettiert. Nach erneutem Hinzufügen von 1 ml Xylol ist dieses Procedere zu wiederholen.

Im weiteren Verlauf werden den Proben 1 ml Ethanol (99%) zugefügt und nach kurzem Vortexen erfolgt die zehnminütige Zentrifugation bei 17,9 g (13.000 rpm in der Tischzentrifuge). Anschließend werden die Überstände abpipettiert bzw. abgekippt. Nach erneutem Hinzufügen von 1 ml Ethanol ist auch dieses Procedere zu wiederholen. Das Sediment im Eppendorfröhrchen trocknet über Nacht bei 37°C im Trockenschrank.

#### 2) RNA-Extraktion

Die RNA-Extraktion aus FFPE (formalinfixiertes, in Paraffin eingebettetes Lebergewebe) wird gemäß dem Protokoll des „High Pure RNA Paraffin Kit“ von Roche durchgeführt. Die Ingredientien entstammen ebenso diesem Kit.

Vorbereitende Maßnahmen:

10 % SDS in DEPC-ddH<sub>2</sub>O ansetzen

„Wash Buffer I“ mit 60 ml Ethanol (absolut) versetzen, gut mischen

„Wash Buffer II“ mit 200 ml Ethanol versetzen, gut mischen

„Proteinase K“ in 4,5 ml „Elution Buffer“ lösen

„DNase I“ in 400 µl „Elution Buffer“ lösen

Den entparaffinierten Proben werden 100 µl „Tissue Lysis Buffer“, 16 µl SDS und 40 µl „Proteinase K“ hinzugefügt. Nach vortexen und kurzer Zentrifugation folgt die Inkubation bei 55°C im Thermoschüttler bei 1000-1200 U/min über Nacht.

Anschließend erneutes Hinzufügen zu den Proben von 10 µl „Proteinase K“, Vortexen und kurzes Herunterzentrifugieren. Wiederholte Inkubation im Thermoschüttler für 3 Stunden bei 55°C und 1000-1200 U/min. Nach kurzer Zentrifugation erfolgt das Hinzugeben von 325 µl „Binding Buffer“ und 325 µl Ethanol, Vortexen und kurze Zentrifugation.

Die im Kit enthaltenen „High Pure filter tubes“ werden daraufhin in „collection tubes“ gesetzt. Das Zelllysat wird dann in die „High Pure filter tubes“ pipettiert. Es folgen Zentrifugationen für 30 Sekunden bei 8000 g und 30 Sekunden bei 16000 g. Nach jeder Zentrifugation ist der Durchfluss zu verwerfen. Folgende Schritte schließen sich an:

500 µl „Wash Buffer I“ in „High Pure filter tube“ pipettieren, 15 Sekunden bei 8.000 g zentrifugieren, Durchfluss verwerfen. Anschließend 500 µl „Wash Buffer II“ in „High Pure filter tube“ hinzupipettieren, 2 Minuten bei 16.000 g zentrifugieren, Durchfluss verwerfen.

Darauf folgend sind die „High Pure filter tubes“ in frische 1,5 ml Eppendorfröhrchen zu setzen, die alten 2 ml „collection tubes“ mit dem Durchfluss werden verworfen.

Weitere Schritte bestehen aus dem Hinzupipettieren von 90 µl „Elution Buffer“ in die „High Pure filter tubes“, anschließender Zentrifugation von 1 Minute bei 8.000 g und dem Hinzufügen von 10 µl „10x DNase Incubation Buffer“ und 1 µl „DNase I working solution“ zum erhaltenen Eluat. Anschließend vortexen, kurz herunterzentrifugieren und für 45 Minuten bei 37°C inkubieren.

Danach erneut kurz herunterzentrifugieren, 20 µl „Tissue Lysis Buffer“, 18 µl 10 % SDS und 40 µl „Proteinase K“ hinzufügen, vortexen und kurz herunterzentrifugieren. Im Thermoschüttler bei 1000-1200 U/min für 60 Minuten bei 55°C inkubieren.

Folgendes Procedere schließt sich an:

325 µl „Binding Buffer“ und 325 µl Ethanol werden hinzugegeben, anschließendes Vortexen und kurzes Herunterzentrifugieren. „High Pure filter tubes“ werden in „collection tubes“ gesetzt, das Lysat wird analog der eben genannten Vorgehensweise in die „High Pure filter tubes“ pipettiert. Es folgen Zentrifugationen für jeweils 30 Sekunden bei 8.000 g und bei 16.000 g mit intermittierendem Verwerfen des Durchflusses.

Anschließend wird 500 µl „Wash Buffer I“ hinzupipettiert, 15 Sekunden bei 8.000 g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Der gleiche Schritt wird mit 500 µl „Wash Buffer II“ und mit 300 µl „Wash Buffer II“ jeweils wiederholt. Es schließt sich daran die Zentrifugation aller Proben für 2 Minuten bei 16.000 g an. Die „High Pure filter tubes“ werden im Anschluss in frische 1,5 ml Eppendorfröhrchen gesetzt, die alten 2 ml „collection tubes“ mit dem Durchfluss sind zu verwerfen. Es folgen das Hinzupipettieren von 50 µl „Elution Buffer“ in die „High Pure filter tubes“, die einminütige Inkubation bei Raumtemperatur und die terminale Zentrifugation bei 8.000 g für eine Minute.

Die RNA-Lösung ist bei – 80°C zu lagern.

### 3) cDNA-Synthese (Reverse Transkription)

Die Synthese der Einzelstrang cDNA erfolgt mit SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (*Invitrogen*). Es wird 11 µl RNA Lösung, die durch die oben beschriebenen Schritte aus FFPE (formalinfixiertes, in Paraffin eingebettetes) Lebergewebe gewonnen wird, in cDNA umgeschrieben, Dies entspricht - wie aus den unten aufgeführten photometrischen Messungen hervorgeht - einer totalen RNA Menge von 353 pg bis 4 µg und liegt damit genau in dem vom Protokoll vorgegebenen Bereich von 1 pg bis 5 µg. Als Negativkontrolle dient 1,0 µl der im Kit enthaltenen Total HeLa RNA (10ng/µl) und 0,5 µl RNA aus humanem Prostatagewebe (20ng/µl). Für die Positivkontrolle wird RNA einer positiven Serumprobe verwendet (Aufreinigung mit „Magna Pure LCNucleic Acid Isolation Kit“; *Roche*).

Die cDNA-Synthese (Volume 30 µl) wird in vier aufeinander folgenden Schritten vollzogen:

*Schritt 1: Denaturierung*

11 µl RNA, 5 µl DEPC-Wasser und 1,6 µl Random hexamers (50 ng/µl) werden 10 Minuten bei 65°C inkubiert; anschließend für 1 Minute auf Eis lagern

*Schritt 2: Annealing*

Nach Hinzupipettieren des Master-Mix\* Inkubation für 10 Minuten bei 25°C

*Schritt 3: cDNA Synthese*

50 Minuten bei 55°C

*Schritt 4: Schlussreaktion*

5 Minuten bei 85°C

Anschließend Lagerung der cDNA bei -20°C oder direkte Weiterverwendung für PCR.

- *Master-Mix:*

10X RT buffer	3 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	4 µl
0,1 M DTT	2 µl
RNaseOUT (40 U / µl)	1 µl
SuperScript III RT (200 U / µl)	1 µl
Oligo(dT) <sub>20</sub> (50 µM)	1 µl
10 mM dNTP mix	1 µl

Da es sich hier um RNA aus FFPE Gewebe handelt und somit eine starke Fragmentierung angenommen werden muss, kommen random hexamers als Primer zum Einsatz. In unseren Versuchsreihen hat sich aber empirisch gezeigt, dass die gleichzeitige Verwendung von Oligonukleotiden die cDNA –Synthese verbessern kann. Zudem werden letztere für die cDNA-Synthese der Kontroll-RNA benötigt.

#### 4) RT-PCR (Reverse-Transkriptase-Polymerase-Ketten-Reaktion)

Für die RT-PCR werden zur HCV Detektion Primer verwendet, die mit der nicht kodierenden Region des 5'Endes korrespondieren:

<i>HCV1F:</i>	<i>5'CTGTGAGGAACTACTGTCTT3'</i>	<i>221 bp</i>
<i>HCV1R:</i>	<i>5'AACACTACTCGGCTAGCAGT3'</i>	
<i>HCV1FN:</i>	<i>5'TTCACGCAGAAAGCGTCTAG3'</i>	<i>145 bp</i>
<i>HCV1RN:</i>	<i>5'GTTTATCCAAGAAAGGACCC3'</i>	

F Forward

R Reverse

N Nested (zweiter Durchlauf: Primer innerhalb des Leserahmens des ersten Durchlaufs)

Die Primersequenzen für den HCV-Nachweis sind dem Am J Clin Pathol 2003;120;536-543 entnommen.

Der Nachweis des „housekeeping gene“ GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase), welches im Stoffwechselweg der Glykolyse in nahezu allen Zellen des Körpers vorkommt, dient der Qualitätskontrolle der eingesetzten cDNA Proben.

Folgende Primersequenzen werden für den Nachweis von GAPDH verwendet:

*GAP-F2C: 5'-GAAATCCCATCACCATCTTCC-3'*                      154 bp

*GAP-R2C: 5'-CAGAGATGATGACCCTTTTGG-3'*

Alle verwendeten Primer sind von *MWG-Biotech*.

Das Procedere zur HCV Detektion gliedert sich in zwei Teile: einem Durchlauf mit den Primern HCV1F und HCV1R und einem zweiten Durchlauf, der Nested PCR, mit den Primern HCV1FN und HCV1RN.

Für den ersten PCR Durchlauf werden 25 µl bestehend aus folgenden Komponenten angesetzt:

16,8µl	dd-H <sub>2</sub> O
2, 5 µl	GeneAmp 10X PCR Buffer von <i>Applied Biosystems</i> (enthält 500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 15 mM MgCl <sub>2</sub> und 0,01 % (w/v) Gelatine)
2,0 µl	2 mM dNTPs ( je 20 µl 100 mM dATP, dGTP, dCTP und dTTP in 920 µl dd-H <sub>2</sub> O gelöst; <i>Promega</i> )
1,0 µl	Primer-Mix (5 pmol / µl HCV1F + HCV1R; <i>MWG-Biotech</i> )
0,2 µl	AmpliTaq Gold DNA-Polymerase (5U / µl) von <i>Applied Biosystems</i>
2,5 µl	cDNA

Für die Nested PCR wurde 0,5 µl PCR-Produkt des ersten Durchlaufs eingesetzt und entsprechend die Menge an Wasser auf 19,3 µl dd-H<sub>2</sub>O erhöht. Als Primer wurden 1,0 µl Primer-Mix (bestehend aus 2,5 pmol / µl HCV1FN + HCV1RN; *MWG-Biotech*) eingesetzt.

Die PCR der GAPD Housekeeping-Gene orientiert sich an dem Protokoll des ersten HCV-PCR Durchlaufs mit Einsatz von 2,5 µl cDNA. Als GAPDH Primer wurden 1,0 µl Primermix (5 pmol / µl GAP-2FC + GAP-2RC; Firma *MWG-Biotech*) eingesetzt.

Alle Reaktionen laufen nach folgendem Schema ab:

10 Minuten 95°C (Initialer Denaturierungsschritt)

60 Zyklen à

20 Sekunden 95°C (Denaturierung)

15 Sekunden 54°C (Hybridisierung/Annealing)

20 Sekunden 72°C (Elongation)

4 Minuten 72°C (Finaler Elongationsschritt)

#### 5) Gelelektrophorese

Anschließend werden alle PCR Produkte auf 1,75 % Argarose Gel ("electrophoresis grade" der Firma *Invitrogen Life Technologies*) in 1X TAE- Puffer visualisiert. Als fluoreszierendes Agens wird für 100 ml Gel 5 ng Ethidiumbromid (10ng/µl; *Amersham Biosciences*) verwendet. 7 µl PCR Produkt und 1 µl Loading Dye Solution (*Fermentas*) werden in die Gel-Taschen pipettiert. Initial wird eine Spannungsquelle von 60 mV angelegt, die im Verlauf auf 100 mV erhöht wird.

#### 6) Sequenzierung

Das für die Sequenzierung benötigte Volumen des PCR-Produktes wird aufgrund eines Vergleiches der Bandenintensitäten in der Argarosegelelektrophorese ermittelt. Es werden standardmäßig 7 µl des PCR-Produktes und 1 µl 50 Bp DNA Ladder (0,5 µg/µl; *Fermentas GeneRuler*) aufgetragen. Bei vergleichbaren Bandenintensitäten zwischen Marker und Probe werden 2-3 µl PCR-Produkt für die Sequenzierung (entspricht 10 bis 20 ng für Fragmente bis 300 BP Länge) eingesetzt. Das benötigte Volumen wird mit 11 µl Wasser verdünnt. Danach werden 2 µl Big Dye Terminator v1.1, v3.1 (5X Sequencing Buffer; *Applied Biosystems*) und 0,5 µl ExoSAP-IT (*USB Corporation*) hinzugegeben. Die vorbereiteten Ansätze reagieren im PCR Gerät 30 Min lang bei 37°C. Es folgt für 15 Minuten die Deaktivierung der Exosapenzyme bei 80°C.

Anschließend werden 1µl des gewünschten Primers (10pmol/µl), 1 µl BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit und 2 µl 5XSequencing Buffer (s.o.) hinzupipettiert.

Die Cycle Sequencing Reaktion im PTC 100 Peltier Thermal Cycler (*MJ Research*) verläuft mit folgendem Programm:

5 Minuten 95°C (Initialer Denaturierungsschritt)

35 Zyklen à:

10 Sekunden 95°C

5 Sekunden 50°C

2 Minuten 60°C

Nach der Cycle Sequencing Reaktion werden die Proben durch Zugabe von 16 µl 3M Natriumacetat, 170 µl Wasser und 500 µl Ethanol gefällt (Zentrifugation 20 Minuten bei 4 Grad in Zentrifuge 5804R; *Eppendorf*). Der Überstand wird abgesaugt, die Pelets getrocknet und mit 35 µl HiDi Foramide (*Applied Biosystems*) aufgenommen und mit 3100 Genetic Analyzer (*Applied Biosystems*) sequenziert. Die Auswertung erfolgt mit dem Programm Sequencing Analysis 5.1.1

Die Richtigkeit der Sequenzen wird mit Blast Search in der Datenbank NCBI durchgeführt.

#### 7) *Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung*

Die am Mikrotom gewonnenen Paraffinschnitte wurden nach folgendem Schema gefärbt:

- 10 Minuten Eintauchen der Paraffinschnitte in ein Bad mit Hämatoxylin
- 10 Minuten Bläuen in fließend Wasser
- 10 Minuten Eintauchen in ein Bad mit Eosin, abspülen, aufsteigende Alkoholreihe bis Xylol
- zum Schluss Eindeckeln mit Eukit

#### 8) *Immunhistochemie*

Es wurden drei monoklonale Maus-Antikörper vom Subtyp IgG (genaue Bezeichnung s. Tab. 2) gegen die nichtstrukturellen HCV-Antigene NS3, NS4 und NS5 an drei HCV-positiven Geweben (Virusnachweis durch RT-PCR und anschließende

Sequenzierung) und einem HCV-negativen Gewebe getestet (Verfahrensprinzip nach *DakoCytomation EnVision+ System-HRP Labelled Polymer*). Das Prinzip basiert auf einer zweistufigen IHC-Färbungsmethode mit HRP-markiertem (Horseradish Peroxidase) Polymer, das mit sekundären Antikörpern konjugiert ist. Das markierte Polymer enthält kein Avidin oder Biotin. Die nicht-spezifische Färbung aufgrund endogenen Biotins in der Leber entfällt infolgedessen.

Tab. 2: verwendete Antikörper

<b>Antigenregion</b>	<b>NS3-NS4</b>	<b>NS4</b>	<b>NS5</b>
<b>Clone</b>	Tordji-22	5D4/10E7	BGN/1246/5G7
<b>Isotype</b>	IgG	IgG1	IgG1-k
<b>Cat.Nr.</b>	Z-434-01-Y	ab19048	BM980
<b>Firma</b>	Zytomed	Abcam	Acris

Die bei den verschiedenen untersuchten Gewebeproben angewandten unterschiedlichen Vorbehandlungen für das Antigenretrieval sind nachfolgend aufgelistet:

NS-3 (273)

Gewebe	Nr.	Vorbehandlung	Verdünnung	
<b>E-23750/06</b>	01	Autoklavieren in Citrat-Puffer pH 6.0, 5 min	1:50	
	02	Autoklavieren in Citrat-Puffer pH 6.0, 5 min	1:150	
	03	Autoklavieren in Citrat-Puffer pH 6.0, 5 min	1:450	
<b>E-10141/07</b>	04	Autoklavieren in Citrat-Puffer pH 6.0, 5 min	1:50	
	05	Autoklavieren in Citrat-Puffer pH 6.0, 5 min	1:150	
	06	Autoklavieren in Citrat-Puffer pH 6.0, 5 min	1:450	
<b>E-13805/04</b>	07	Autoklavieren in Citrat-Puffer pH 6.0, 5 min	1:50	
	08	Autoklavieren in Citrat-Puffer pH 6.0, 5 min	1:150	
	09	Autoklavieren in Citrat-Puffer pH 6.0, 5 min	1:450	
<b>E-23750/06</b>	10	Keine Vorbehandlung	1:20	
	11	Dampf	1:20	
	12	Pronase	1:20	
	13	microwave	1:20	
	14	Autoklavieren in Citrat-Puffer pH 2.0, 5 min	1:20	
	15	Autoklavieren in Citrat-Puffer pH 6.0, 5 min	1:20	
	16	Autoklavieren in Citrat-Puffer pH 10.0, 5 min	1:20	
	17	Autoklavieren in Citrat-Puffer pH 7.8, 5 min	1:20	
	18	Pepsin	1:20	

**NS-3 (273)**

<b>Gewebe</b>	<b>Nr.</b>	<b>Vorbehandlung</b>	<b>Verdünnung</b>	
<b>E-23750/06</b>	01	Keine Vorbehandlung	1:20	
	02	Keine Vorbehandlung	1:450	
	03	Pronase	1:20	
	04	Autoklavieren in Citrat Puffer pH 6.0, 5 min	1:20	
	05	Autoklavieren in Citrat Puffer pH 6.0, 5 min	1:450	
<b>E-13805/04</b>	06	Keine Vorbehandlung	1:20	
	07	Keine Vorbehandlung	1:450	
	08	Autoklavieren in Citrat Puffer pH 6.0, 5 min	1:20	
	09	Autoklavieren in Citrat Puffer pH 6.0, 5 min	1:450	
<b>E-09001/06</b>	10	Keine Vorbehandlung	1:20	
	11	Keine Vorbehandlung	1:450	
	12	Pronase	1:20	
	13	Autoklavieren in Citrat Puffer pH 6.0, 5 min	1:20	
	14	Autoklavieren in Citrat Puffer pH 6.0, 5 min	1:450	

**NS-3 (273)**

<b>Gewebe</b>	<b>Nr.</b>	<b>Vorbehandlung</b>	<b>Verdünnung</b>	
<b>E-09001/06</b>	01	Pronase	1:1000	
	02	Pronase	1:2000	
<b>E-23750/06</b>	03	Pronase	1:1000	
	04	Pronase	1:2000	

**NS-4 (274)**

<b>Gewebe</b>	<b>Nr.</b>	<b>Vorbehandlung</b>	<b>Verdünnung</b>	
<b>E-23750/06</b>	01	Autoklavieren in Citrat-Puffer PH 6.0, 5 min	1:50	
	02	Autoklavieren in Citrat-Puffer PH 6.0, 5 min	1:150	
	03	Autoklavieren in Citrat-Puffer PH 6.0, 5 min	1:450	
<b>E-10141/07</b>	04	Autoklavieren in Citrat-Puffer PH 6.0, 5 min	1:50	
	05	Autoklavieren in Citrat-Puffer PH 6.0, 5 min	1:150	
	06	Autoklavieren in Citrat-Puffer PH 6.0, 5 min	1:450	
<b>E-13805/04</b>	07	Autoklavieren in Citrat-Puffer PH 6.0, 5 min	1:50	
	08	Autoklavieren in Citrat-Puffer PH 6.0, 5 min	1:150	
	09	Autoklavieren in Citrat-Puffer PH 6.0, 5 min	1:450	
<b>E-23750/06</b>	10	Keine Vorbehandlung	1:450	
	11	Dampf	1:450	
	12	Pronase	1:450	
	13	Microwave	1:450	
	14	Autoklavieren in Citrat-Puffer PH 2.0, 5 min	1:450	
	15	Autoklavieren in Citrat-Puffer PH 6.0, 5 min	1:450	
	16	Autoklavieren in Citrat-Puffer PH 10.0, 5 min	1:450	
	17	Autoklavieren in Citrat-Puffer PH 7.8, 5 min	1:450	
	18	Pepsin	1:450	

**NS-4 (274)**

<b>Gewebe</b>	<b>Nr.</b>	<b>Vorbehandlung</b>	<b>Verdünnung</b>	
<b>E-23750/06</b>	01	Keine Vorbehandlung	1:450	
	02	Autoklavieren in Citrat-Puffer PH 6.0, 5 min	1:450	
<b>E-13805/06</b>	03	Keine Vorbehandlung	1:450	
	04	Autoklavieren in Citrat-Puffer PH 6.0, 5 min	1:450	
<b>E-09001/06</b>	05	Keine Vorbehandlung	1:450	
	06	Autoklavieren in Citrat-Puffer PH 6.0, 5 min	1:450	

NS-5 (277)

Gewebe	Nr.	Vorbehandlung	Verdünnung	
<b>E-23750/06</b>	01	Autoklavieren in Citrat-Puffer pH 6.0, 5 min	1:50	
	02	Autoklavieren in Citrat-Puffer pH 6.0, 5 min	1:150	
	03	Autoklavieren in Citrat-Puffer pH 6.0, 5 min	1:450	
<b>E-10141/07</b>	04	Autoklavieren in Citrat-Puffer pH 6.0, 5 min	1:50	
	05	Autoklavieren in Citrat-Puffer pH 6.0, 5 min	1:150	
	06	Autoklavieren in Citrat-Puffer pH 6.0, 5 min	1:450	
<b>E-13805/04</b>	07	Autoklavieren in Citrat-Puffer pH 6.0, 5 min	1:50	
	08	Autoklavieren in Citrat-Puffer pH 6.0, 5 min	1:150	
	09	Autoklavieren in Citrat-Puffer pH 6.0, 5 min	1:450	
<b>E-23750/06</b>	10	Keine Vorbehandlung	1:450	
	11	Dampf	1:450	
	12	Pronase	1:450	
	13	microwave	1:450	
	14	Autoklavieren in Citrat-Puffer pH 2.0, 5 min	1:450	
	15	Autoklavieren in Citrat-Puffer pH 6.0, 5 min	1:450	
	16	Autoklavieren in Citrat-Puffer pH 10.0, 5 min	1:450	
	17	Autoklavieren in Citrat-Puffer pH 7.8, 5 min	1:450	
	18	Pepsin	1:450	

**NS-5 (277)**

<b>Gewebe</b>	<b>Nr.</b>	<b>Vorbehandlung</b>	<b>Verdünnung</b>	
<b>E-23750/06</b>	01	Keine Vorbehandlung	1:150	
	02	Autoklavieren in Citrat-Puffer pH 6.0, 5 min	1:150	
<b>E-13805/04</b>	03	Keine Vorbehandlung	1:150	
	04	Autoklavieren in Citrat-Puffer pH 6.0, 5 min	1:150	
<b>E-09001/06</b>	05	Keine Vorbehandlung	1:150	
	06	Autoklavieren in Citrat-Puffer pH 6.0, 5 min	1:150	

**NS-5 (277)**

<b>Gewebe</b>	<b>Nr.</b>	<b>Vorbehandlung</b>	<b>Verdünnung</b>	
<b>E-09001/06</b>	01	Autoklavieren in Citrat-Puffer pH 6.0, 5 min	1:1000	
	02	Autoklavieren in Citrat-Puffer pH 6.0, 5 min	1:2000	
<b>E-13805/04</b>	03	Autoklavieren in Citrat-Puffer pH 6.0, 5 min	1:1000	
	04	Autoklavieren in Citrat-Puffer pH 6.0, 5 min	1:2000	

## IV. Ergebnisse

### 1) Ergebnisse der RT-PCR

Nach Etablierung der Methode der ReverseTranskriptase-PolymeraseKettenreaktion (RT-PCR) zur Detektion von HCV-RNA in FFPE-Lebergewebe wurden drei Versuchsreihen mit den zur Verfügung stehenden Gewebeproben durchgeführt.

Erste Versuchsreihe:

Das Ziel der ersten Versuchsreihe bestand in dem Nachweis mit Hilfe der RT-PCR des Housekeeping-Gens GAPDH und HCV in den viruspositiven Proben einschließlich Negativ- und Positivkontrolle.

Es wurden nach oben beschriebenem Protokoll von den Proben A-G die Entparaffinierung, cDNA-Synthese, PCR zur HCV Detektion (erster und zweiter Durchlauf) und zur Detektion des Housekeeping-Gens GAPDH durchgeführt. Als HCV-negative Kontroll-RNA wurde 1,0 µl der im Kit enthaltenen Total HeLa RNA (10ng/µl) für die cDNA-Synthese eingesetzt. Als Positivkontrolle wurde pro Ansatz jeweils 11 µl, 7µl und 4 µl aufgereinigte RNA (Viruslast: 2e+05 IU/ml) einer positiven Serumprobe eingesetzt.

Das Housekeeping-Gen GAPDH war mit Ausnahme der Probe D in allen Patientenproben nachweisbar, ebenso in der Positiv- und Negativkontrolle (Banden in Höhe von 154 bp, siehe Abb. 02). Der PCR-Ansatz mit Wasser zeigte erwartungsgemäß keine Bande.

Der erste Durchlauf der HCV-PCR zeigte in der Doppelbestimmung positive Banden in Höhe von 221 bp bei den Proben B, C, E und F und bei der Positivkontrolle. Anzumerken ist, dass Probe B in beiden Reaktionsansätzen positive Banden aufwies, Proben C, E und F jeweils nur in einem. Die drei Ansätze der Positivkontrolle zeigten jeweils eine positive Bande. Negativkontrolle und Wasser-Ansatz zeigten wie erwartet keine Bande (siehe Abb. 03/04).

Die Nested-PCR zur HCV-Detektion bestätigte das Ergebnis des ersten Durchlaufs (Banden in Höhe von 145 bp, siehe Abb.04. Die Ergebnisse entsprechen einander.

Somit gelang der HCV-Nachweis im Gegensatz zum Housekeeping-Gen-Nachweis nur partiell.

Ferner wurde eine extinktionsphotometrische Messung der isolierten RNA vorgenommen:

	ng/ $\mu$ l	A260	260/230	260/280
A	339,33	8,483	1,64	1,88
B	168,92	4,223	1,26	1,87
C	120,66	3,017	1,10	1,83
D	179,80	4,495	1,36	1,82
E	208,60	5,215	1,62	2,01
F	188,74	4,718	1,10	1,83
G	126,16	3,154	0,88	1,86

Die eingesetzte Menge von 11  $\mu$ l RNA-Lösung entspricht somit einem Bereich von 1,3  $\mu$ g – 3,7  $\mu$ g.

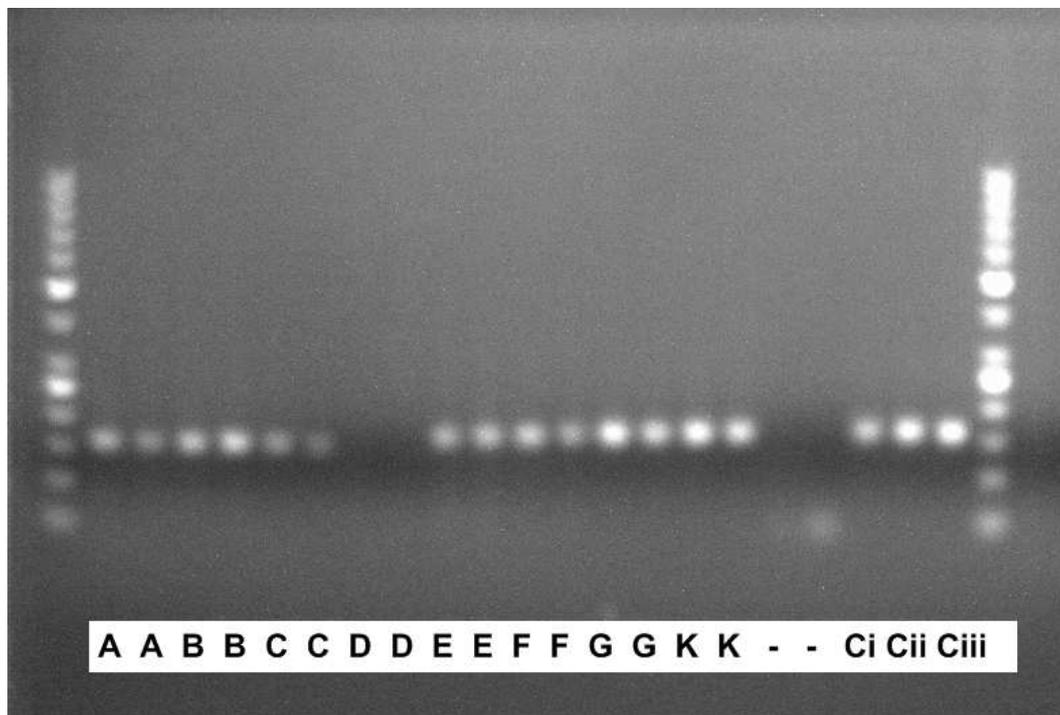


Abb. 02

GAPDH-Nachweis (Erläuterung s.u.)

In dem von beiden DNA-Leitern eingegrenzten Bereich ist der GAPDH Nachweis der Proben A-G, der negativen Kontroll-RNA (K), der HCV-positiven Kontroll-RNA (drei unterschiedliche Verdünnungen Ci, Cii, Ciii) und Wasser dargestellt. Die Banden befinden sich in der erwarteten Höhe von 154 bp.

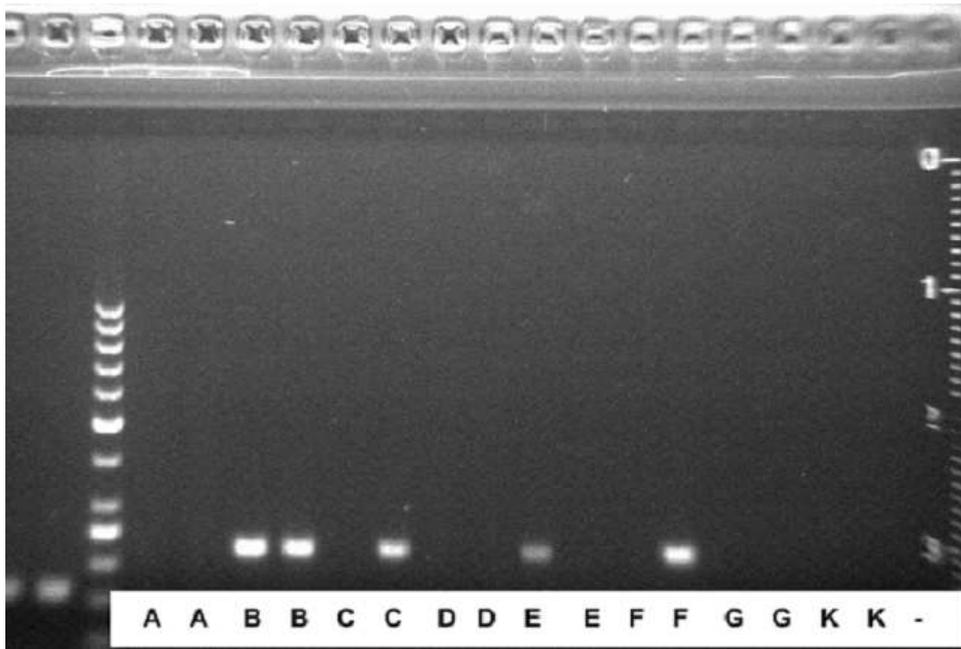


Abb. 03 HCV-Nachweis (Erläuterung s.u.)

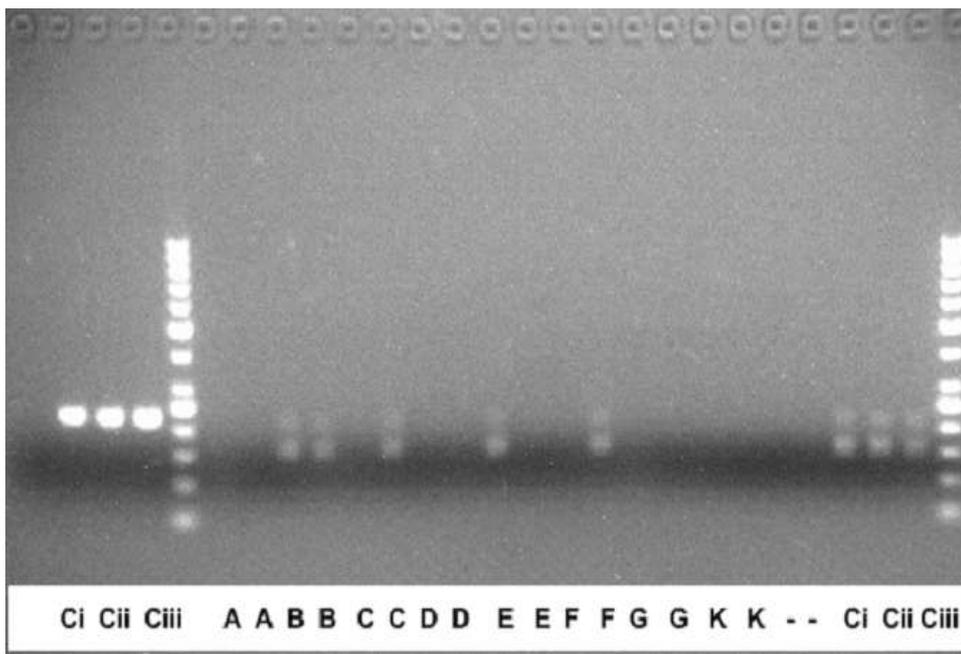


Abb. 04 Nested-PCR

Abbildung 03/04:

Dargestellt ist der HCV-Nachweis im ersten und zweiten PCR-Durchlauf der Proben A-G, der negativen Kontroll-RNA (K), der HCV-positiven Kontroll-RNA (drei unterschiedliche Verdünnungen Ci, Cii, Ciii) und Wasser.

## Zweite Versuchsreihe:

Das methodische Procedere orientierte sich an der ersten Versuchsreihe. Ziel war die Reproduktion der Beobachtungen aus der ersten Versuchsreihe und die Erweiterung um folgende Komponente:

Zusätzlich zu den Proben A-G wurde das HCV-negative Probenmaterial H (Lebergewebe von einem an einer Oxalose erkrankten Patienten) verwendet. Als negative Kontroll-RNA kam 0,5 µl RNA aus humanem Prostatagewebe (20ng/µl) zum Einsatz. Positive Kontroll-RNA entstammte wie bei der ersten Versuchsreihe einer aufgereinigten Serumprobe eines HCV-Patienten (Viruslast: 6e+04 und 2e+04). Diese wurde in einer Verdünnungsreihe im ersten Schritt jeweils bis zum achtfachen herunterverdünnt. Im zweiten Schritt wurde zur gleichen Verdünnungsreihe jeweils zu jedem Verdünnungsschritt 11µl HCV-negative RNA aus der Probe H (Oxalose) hinzugegeben, um mögliche Interferenzen zwischen negativer und positiver HCV-RNA und damit Auswirkungen auf die Detektionsmöglichkeit des HCV-Virus aufzudecken.

GAPDH ließ sich in allen Proben mit Ausnahme des Wasser-Ansatzes nachweisen (Abb. 05 und 08).

Der erste Durchlauf der HCV-PCR zeigte positive Banden in den Ansätzen der Proben B,C und E, wobei nur bei Probe B alle zwei Ansätze positiv waren. Im Gegensatz zur ersten Versuchsreihe waren die Ansätze der Probe F negativ. Die Ansätze vom Oxalose-Patienten, der negativen Kontroll-RNA und die Wasser-Ansätze wiesen erwartungsgemäß keine Banden auf (Abb. 06).

Auch die Verdünnungsreihe der positiven Kontroll-RNA zeigte mit und ohne Hinzufügen negativer RNA Banden in der gewünschten Höhe (Abb.09).

Auch hier bestätigte die Nested-PCR bereits die Ergebnisse des ersten Durchlaufs (Abb. 07 und 10). Somit konnte die Insensitivität bezüglich des HCV-Nachweises in viruspositivem Paraffinmaterial analog der ersten Versuchsreihe untermauert werden.

Im Anschluss wurde wieder eine extinktionsphotometrische Bestimmung der isolierten RNA vorgenommen:

Sample	ng/µl	A260	260/230	260/280
A	339,29	8,482	2,08	1,92
B	181,88	4,547	2	2,01
C	79,37	1,984	1,92	2,01
D	241,55	6,039	2,21	1,86
E	242,5	6,063	1,93	1,87
F	135,84	3,396	1,71	1,95
G	32,06	0,802	1,58	1,91
H	129,25	3,175	1,52	1,87

Die eingesetzte Menge von 11 µl RNA-Lösung entspricht somit einem Bereich von 0,4 µg – 3,7 µg.

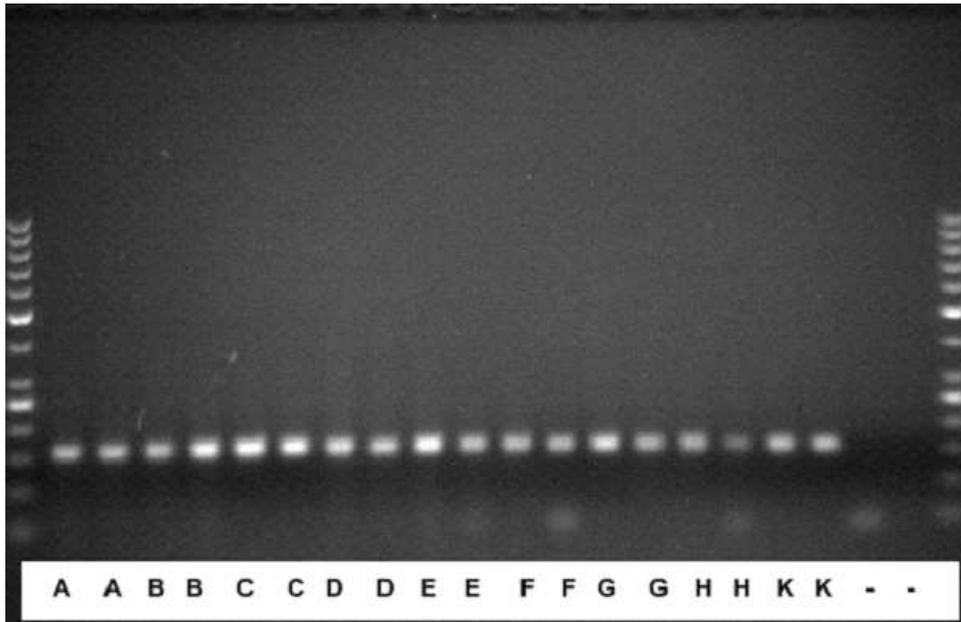


Abb.05 GAPDH-Nachweis

Dargestellt ist der gelelektrophoretische Nachweis von GAPDH in den Ansätzen der Proben A-H, der negativen Kontroll-RNA aus Prostatagewebe (K) und von Wasser.

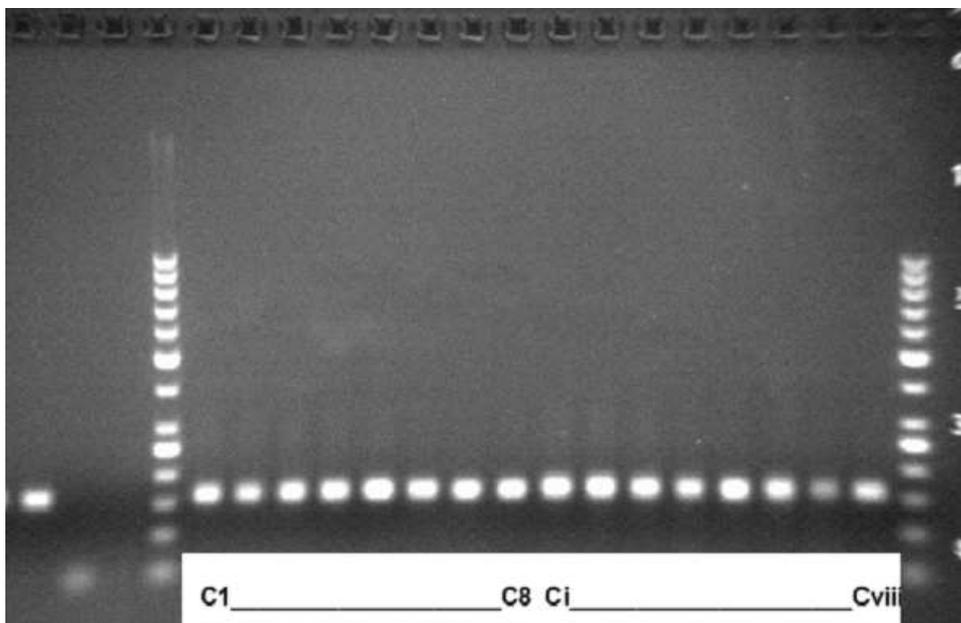


Abb.06 GAPDH-Nachweis

GAPDH-Nachweis in den Ansätzen der Verdünnungsreihe von HCV-positiver Kontroll-RNA (mit und ohne Hinzufügen HCV-negativer RNA).

C1-C4: 6e+04/1/2/4/8

C5-C8: 2e+04/1/2/4/8

Ci-Civ: 6e+04/1/2/4/8 + jeweils 11 µl RNA von Probe H (HCV-negative RNA)

Cv-Cviii: 2e+04/1/2/4/8 + jeweils 11 µl RNA von Probe H (HCV-negative RNA)

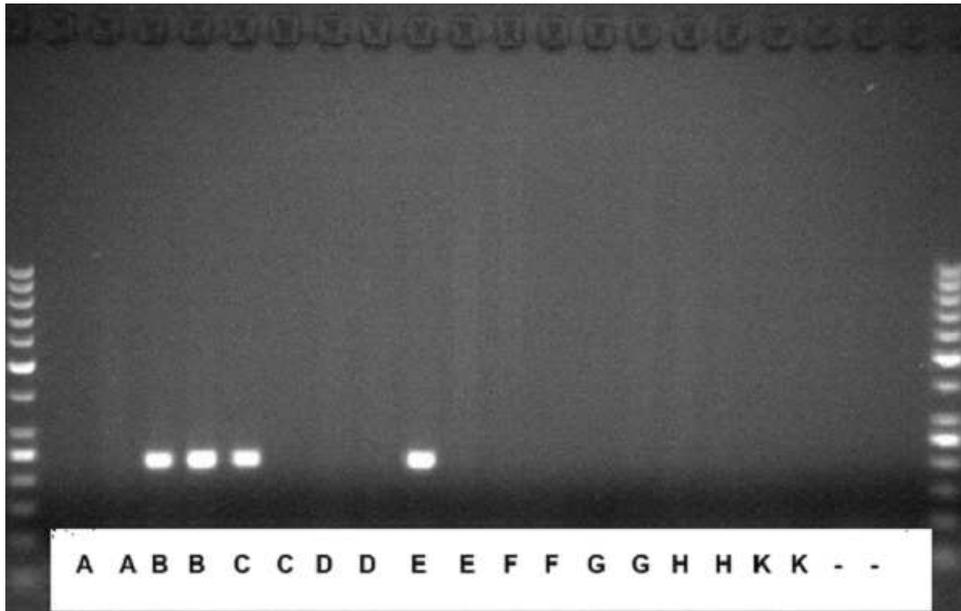


Abb. 07 HCV-Nachweis

Dargestellt ist der Nachweis von HCV im ersten PCR-Durchlauf der Proben A-H, negative Kontroll-RNA aus Prostatagewebe (K) und Wasser.

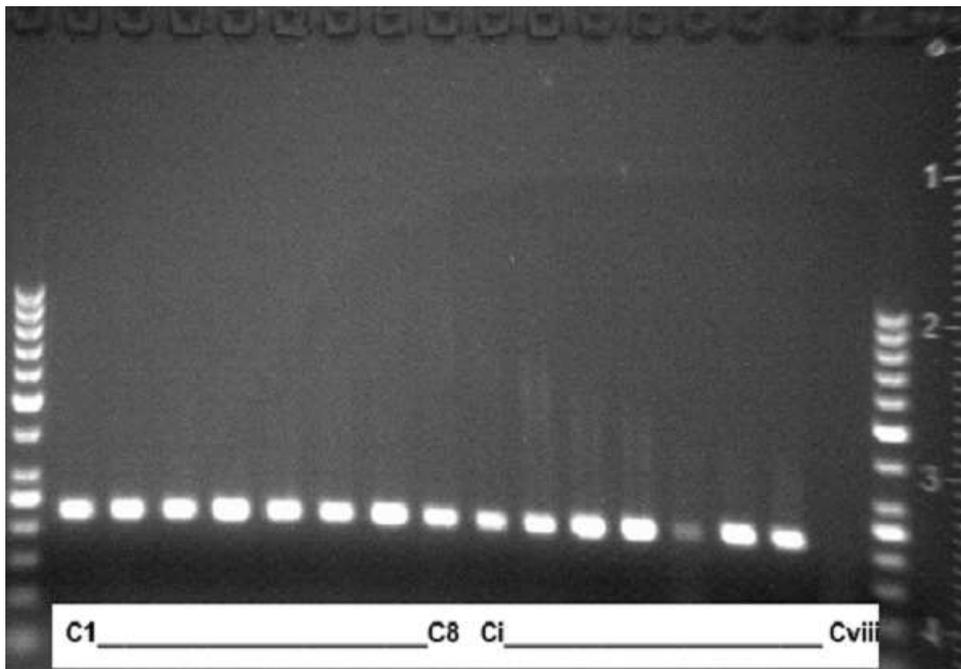


Abb.08 HCV-Nachweis

HCV-Nachweis (erster PCR-Durchlauf) in den Ansätzen der Verdünnungsreihe von HCV-positiver Kontroll-RNA (mit und ohne Hinzufügen HCV-negativer RNA).

C1-C4: 6e+04/1/2/4/8

C5-C8: 2e+04/1/2/4/8

C9-C14: 6e+04/1/2/4/8 + jeweils 11 µl RNA von Probe H (HCV-negative RNA)

C13-C14: 2e+04/1/2/4/8 + jeweils 11 µl RNA von Probe H (HCV-negative RNA)

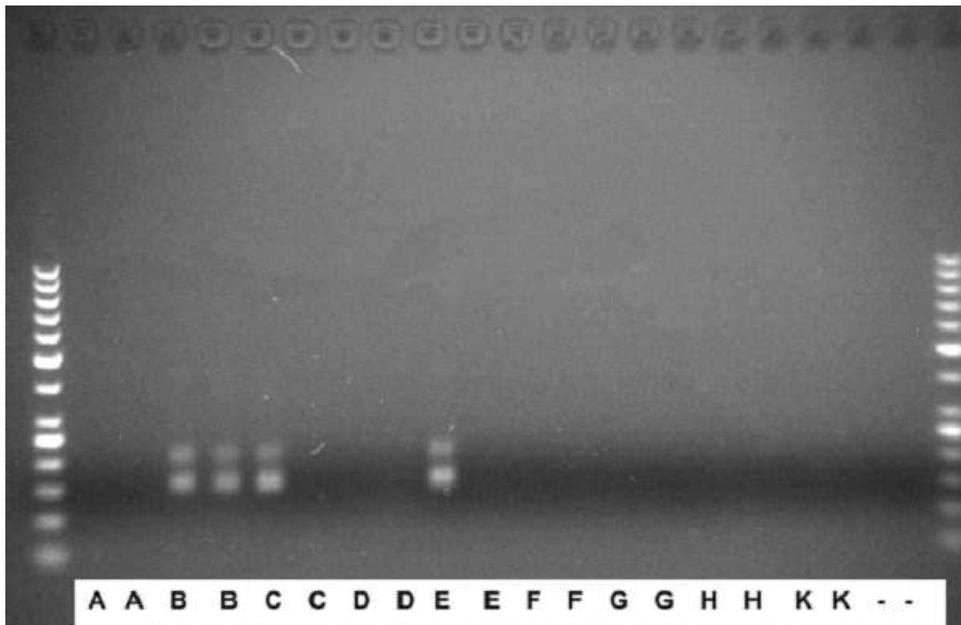


Abb. 09 Nested-PCR

Nested-PCR zum Nachweis von HCV in den Proben A-H, negative Kontroll-RNA aus Prostatagewebe (K) und Wasser.

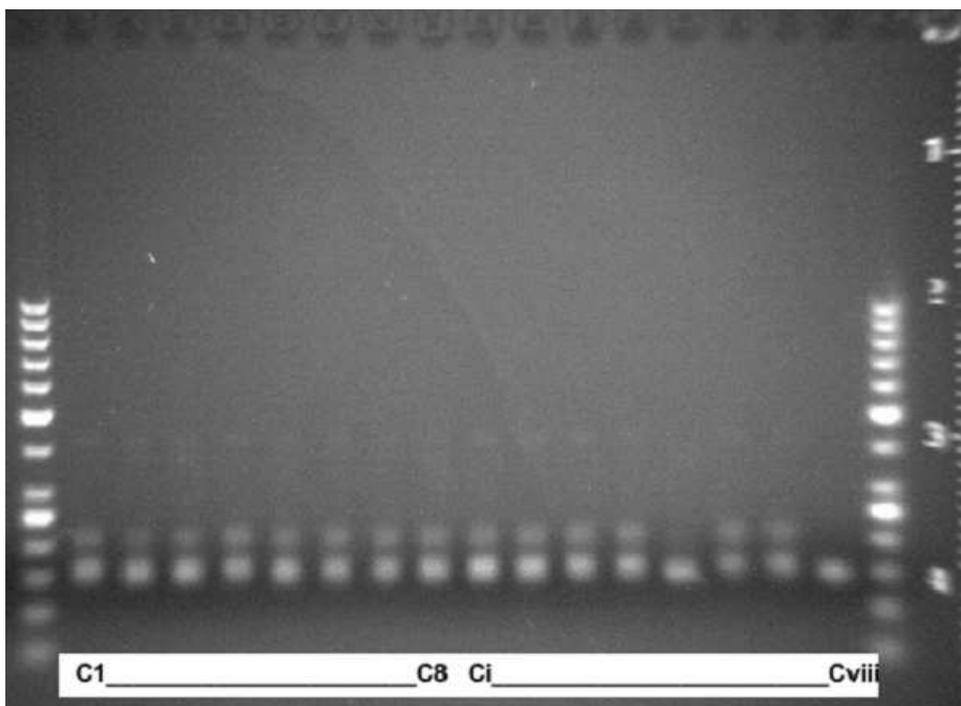


Abb. 10 Nested-PCR

HCV-Nachweis (Nested-PCR) in den Ansätzen der Verdünnungsreihe von HCV-positiver Kontroll-RNA (mit und ohne Hinzufügen HCV-negativer RNA).

C1-C4: 6e+04/1/2/4/8

C5-C8: 2e+04/1/2/4/8

Ci-Civ: 6e+04/1/2/4/8 + jeweils 11 µl RNA von Probe H (HCV-negativer RNA)

Cv-Cviii: 2e+04/1/2/4/8 + jeweils 11 µl RNA von Probe H (HCV-negativer RNA)

### Dritte Versuchsreihe:

In den ersten beiden Versuchsreihen waren bei Probe B in der Doppelbestimmung jeweils immer zwei Banden positiv, während Probe C und E immer nur eine positive Bande aufwiesen. Ziel dieser Versuchsreihe war es, anhand der Proben B, C und H zu klären, ob auch in größerem Umfang, d.h. bei Einsatz von mehr Gewebematerial für mehr Extraktionen und damit auch für mehr PCR-Produkte, diese Beobachtung reproduziert werden kann. Bisher dienten zwei am Mikrotom gewonnene Schnitte von einem Paraffinblock von je 20 µm für die Extraktion und Isolierung einer RNA-Lösung, aus der dann zwei cDNA Lösungen synthetisiert wurden. Die zwei daraus resultierenden PCR-Produkte wurden gelelektrophoretisch aufgetragen.

In dieser Versuchsreihe wurden von den drei Blöcken B, C und H jeweils acht Schnitte à 20 µm angefertigt, die dann vier RNA-Lösungen ergaben. Analog oben genanntem Procedere wurden daraus acht cDNA-Lösungen synthetisiert und die sich daraus ergebenden acht PCR-Produkte dann auf das Argarosegel aufgetragen.

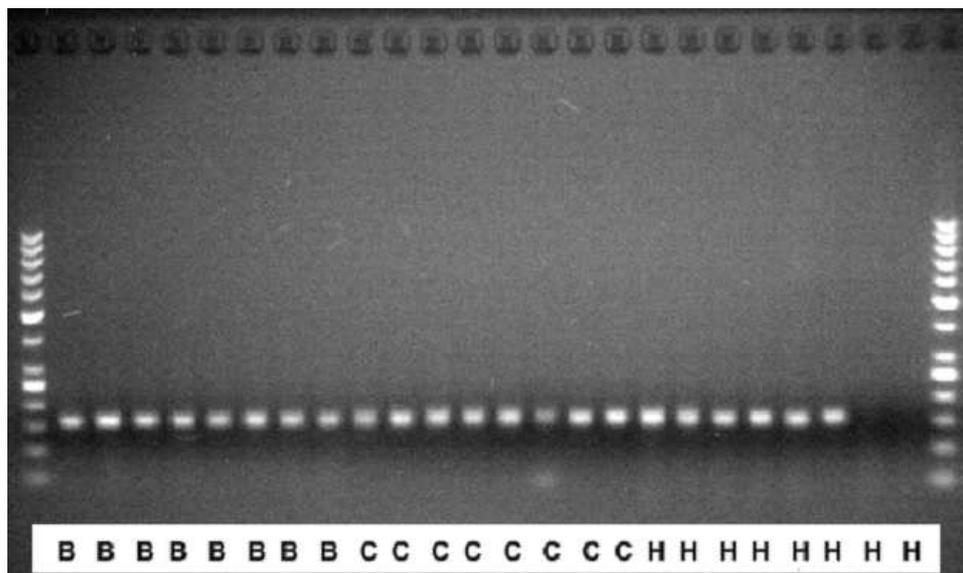


Abb. 11 : GAPDH-Nachweis von Proben B,C und H

GAPDH konnte in allen acht aufgetragenen Ansätzen der Proben B und C nachgewiesen werden. Von Probe H wiesen sechs Ansätze positive Banden auf.

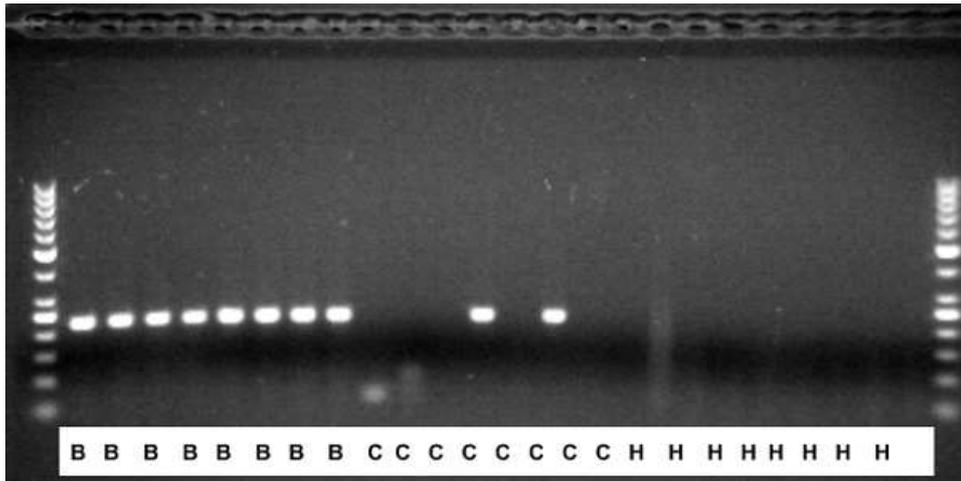


Abb.12: HCV-Nachweis (PCR, erster Durchlauf) von Proben B, C und H

HCV konnte im ersten und zweiten PCR-Durchlauf in allen acht aufgetragenen Ansätzen der Probe B nachgewiesen werden. Probe C wies zwei positive Banden auf, Probe H zeigte erwartungsgemäß keine Positivität.

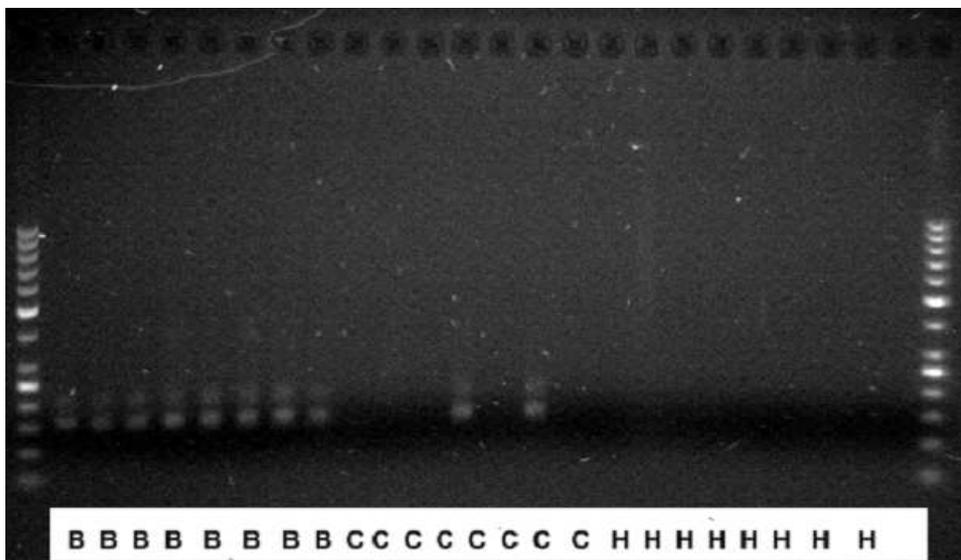


Abb.13: Nested-PCR

Kommentar s. Abb. 12

In den beiden folgenden Kapiteln werden die Ergebnisse der allgemeinen Histologie der untersuchten Gewebsproben und der Immunhistochemie präsentiert. Die unten aufgelistete Tabelle 3 stellt eine Ergebniszusammenfassung der getesteten monoklonalen Antikörper gegen die nichtstrukturellen HCV-Antigene NS3, NS4 und NS5 an ausgewählten HCV-positiven Gewebsproben und einer Negativkontrolle dar.

Tabelle 3:

<b>E-Nummer</b>	<b>Diagnose</b>	<b>HCV-PCR am Paraffingewebe</b>	<b>Immunhistochemie</b>
E-23750/06	Leberexplantat mit einer komplett feinknotigen Leberzirrhose; serologisch HCV-positiv	positiv	<i>NS-3-Antikörper:</i> Zytoplasmatisches, feingranuläres Färbemuster mit vereinzelt portalen Anfärbungen (s. Abb. 20a+b) <i>NS-4-Antikörper:</i> Ges. Zytoplasma umfassende feingranuläre Färbung (s. Abb. 22a+b)
E-09001/06	Leberexplantat eines Oxalose-Patienten; serologisch HCV-negativ	negativ	<i>NS-3-Antikörper:</i> Feingranuläres Anfärbemuster mit portaler Anfärbung (s. Abb. 21a-d) <i>NS-4-Antikörper:</i> Ges. Zytoplasma umfassende feingranuläre Färbung (s. Abb. 23) <i>NS-5-Antikörper:</i> Nukleäres Färbemuster (s. Abb. 25a-e)
E-13805/04	Leberexplantat mit einer komplett feinknotigen Leberzirrhose; serologisch HCV-positiv	positiv	<i>NS-5-Antikörper:</i> Nukleäres Färbemuster (s. Abb. 24a+b)

## 2) Histologische Diagnosen

Im Folgenden dargestellt ist die allgemeine Histologie der untersuchten Proben:

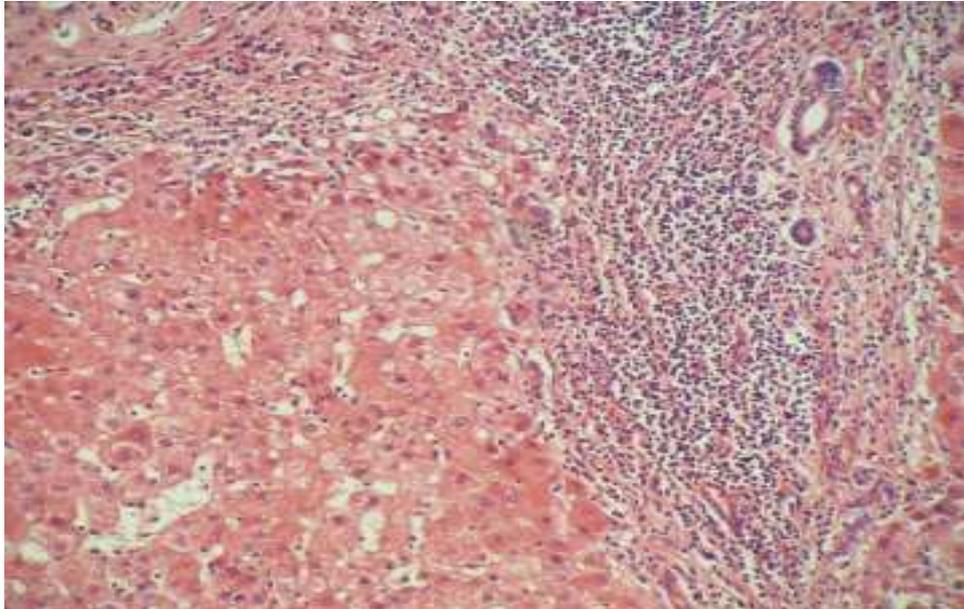


Abb. 14a A+D E-10187/04 HE x20

*Komplette feinknotige Leberzirrhose* mit ausgeprägter chronischer Entzündung mit entzündlicher Interface-Aktivität bei klinisch angegebener Hepatitis C. Keine Malignität

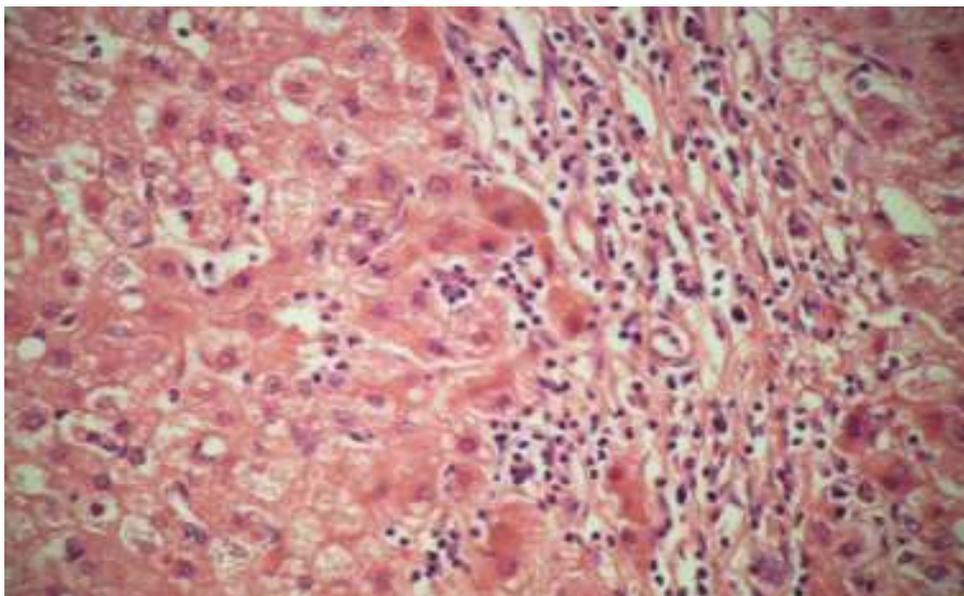


Abb. 14b A+D E-10187/04 HE x40

Kommentar s. Abb. 14a

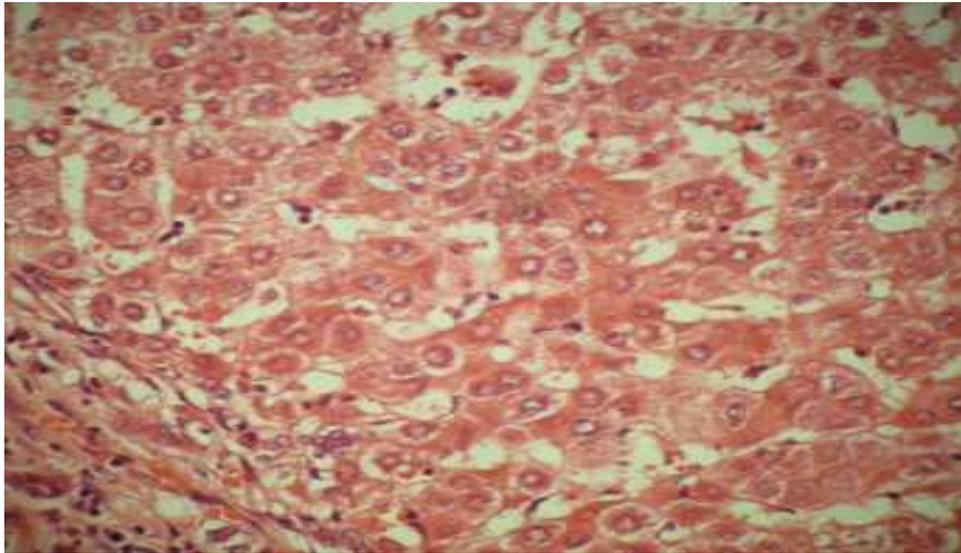


Abb. 15      B      E-23750/06      HE x40

*Leberexplantat mit einer kompletten feinknotigen Leberzirrhose mit geringer entzündlicher Interface-Aktivität und geringer herdförmiger Leberparenchymverfettung (ca. 2-5%). Kein Anhalt für Malignität. Die beschriebenen entzündlichen Veränderungen können der angegebenen Hepatitis gut zugeordnet werden.*

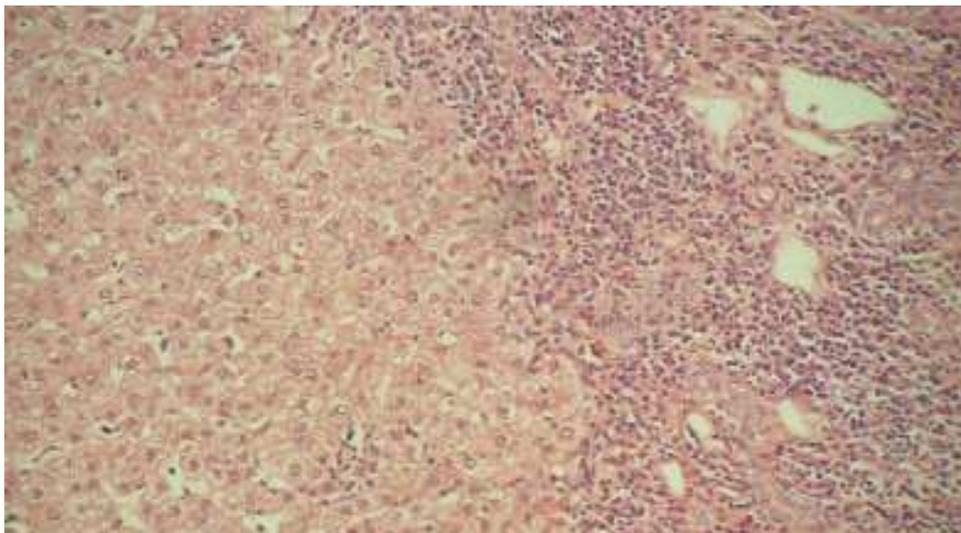


Abb. 16a      C      E-10141/07      HE x20

*Gering floride chronische Hepatitis mit mäßiggradiger portaler, teils septenbildender, geringgradiger auch intralobulärer Fibrose bei klinisch angegebener Hepatitis C. Tumorfremie Absetzungsänder.*

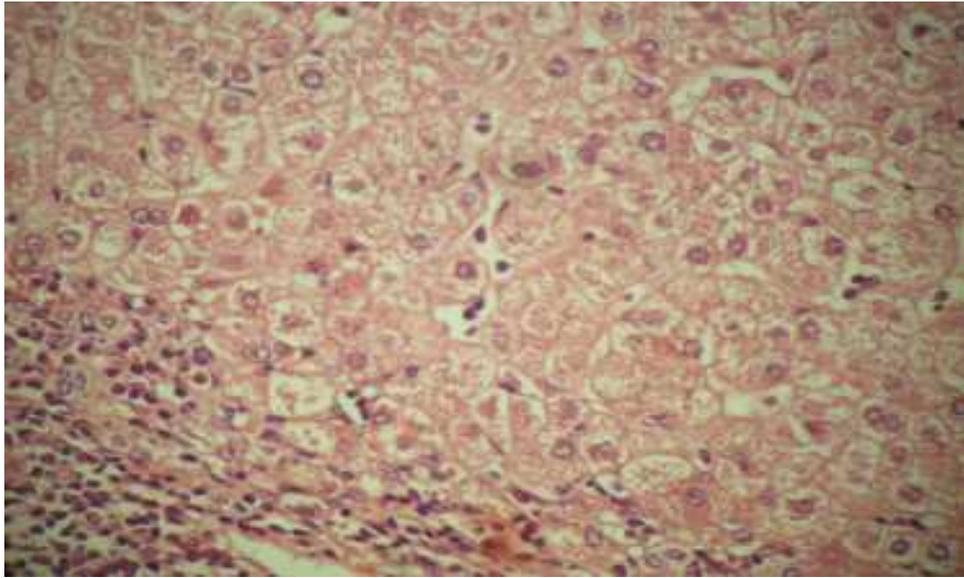


Abb. 16b C E-10141/07

HE x40

Kommentar s. Abb. 16a

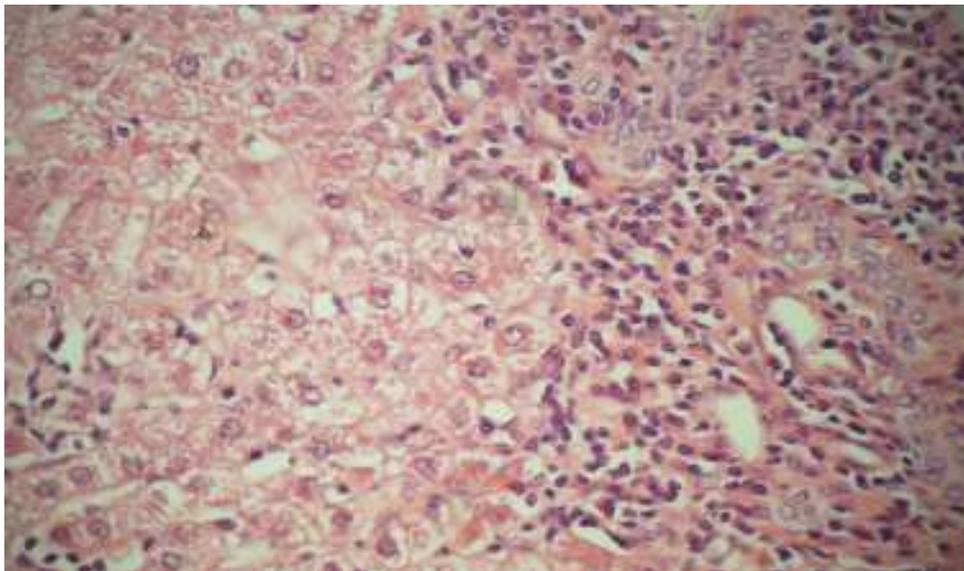


Abb. 16c C E-10141/07

HE x40

Kommentar s. Abb. 16a

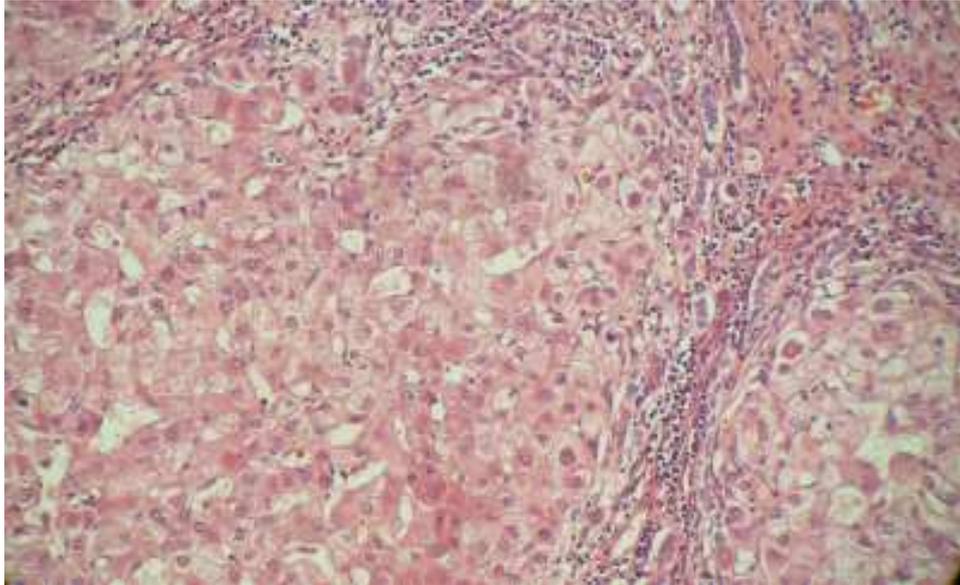


Abb. 17a F E-04550/07 He x 20

*Gemischtknotige, komplette Leberzirrhose* (bei klinisch angegebener chronischer HCV-Infektion) mit mäßiggradiger chronischer (portoseptaler) und aktiver Entzündung (Grad 2 nach Scheuer) mit begleitender prominenter Neocholangiogenese und kanalikulärer Cholestase. Keine signifikante Siderose. Geringgradige chronische Cholezystitis. Keine Malignität.

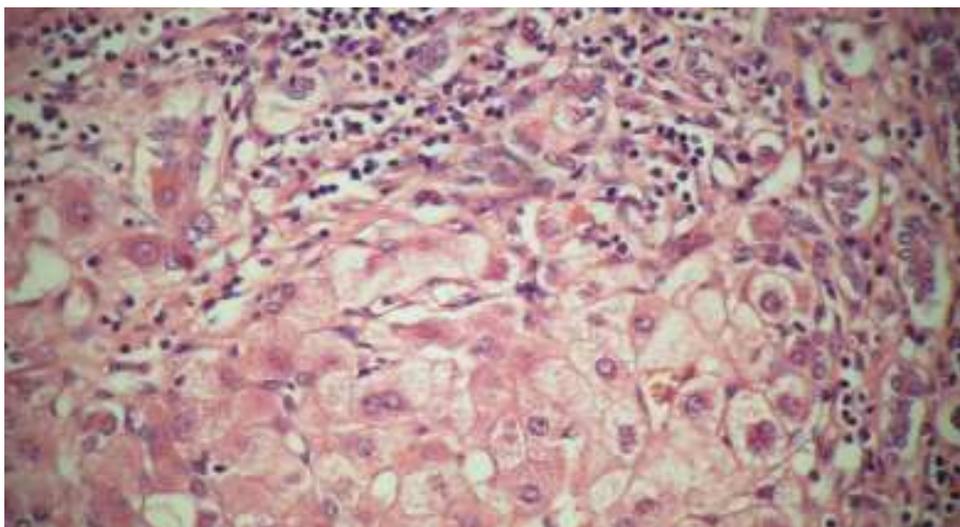


Abb. 17b F E-04550/07 HE x40

Kommentar s. Abb. 17a

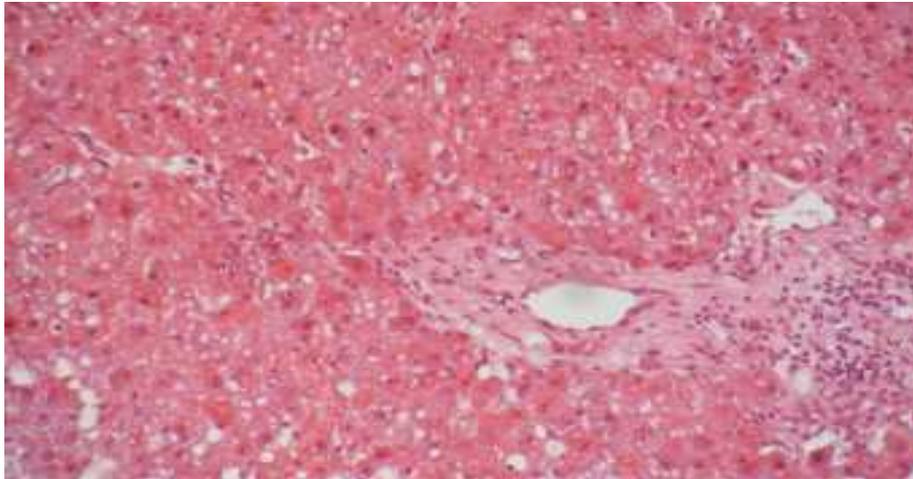


Abb. 18a G E-23923/06 HE x20

*Transplantatleber* mit ausgeprägter feintropfiger Verfettung (ca.80 %) und disseminierten Einzel- und Gruppenzellnekrosen.

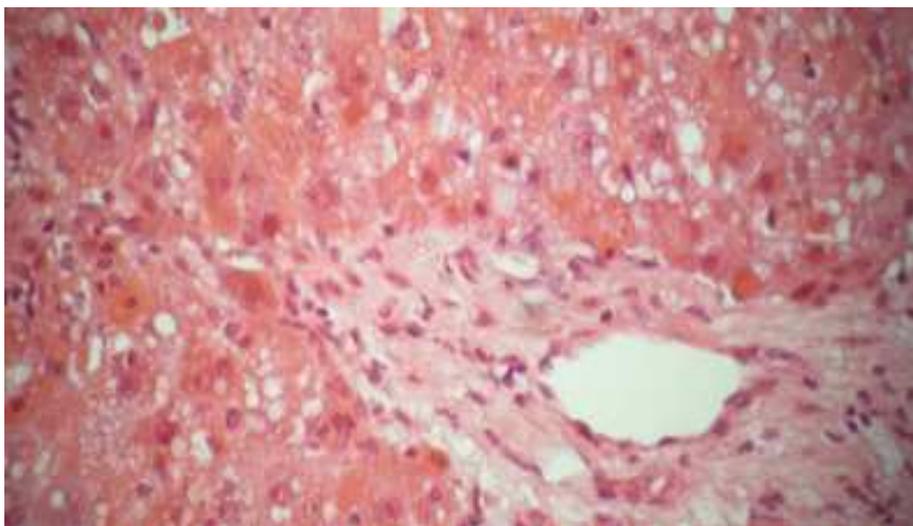


Abb. 18b G E-23923/06 HE x40

Kommentar s. Abb. 18a

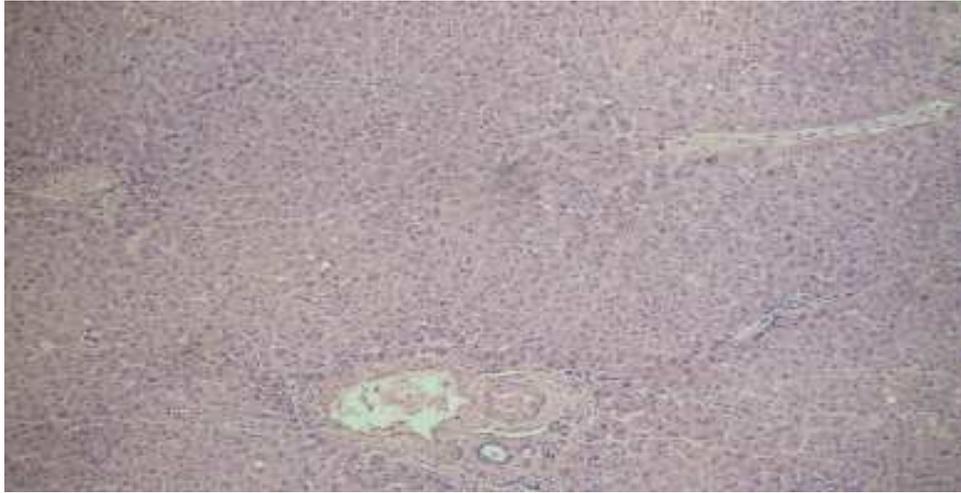


Abb. 19a H E-09001/06 HE x10

*Explantierte Leber bei klinisch angegebener Oxalose (Negativ-Kontrolle) mit geringer Leberepithelverfettung (ca. 5% der Hepatozyten) mit gering erhöhter Lipofuzinspeicherung. Keine Leberzirrhose. Keine Cholangitis. Keine Hepatitis.*

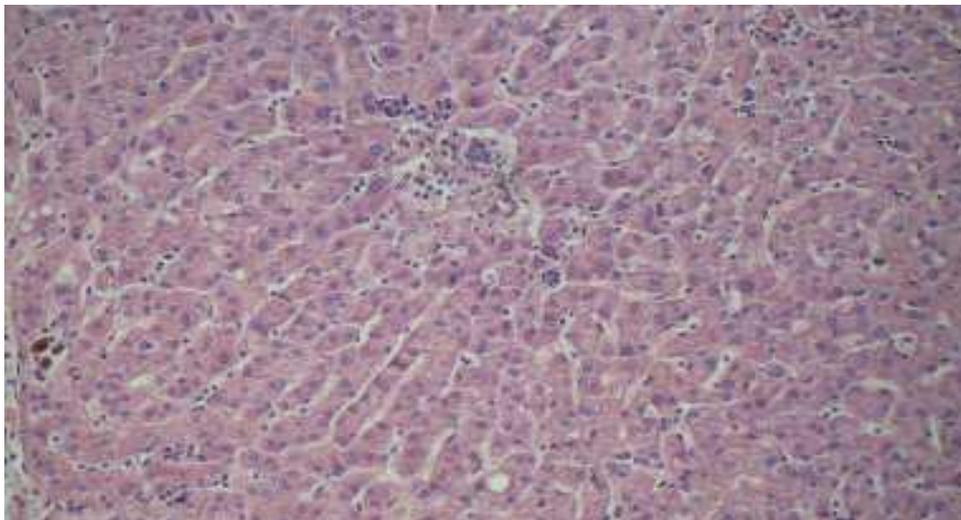


Abb. 19b H E-09001/06 HE x20

Kommentar s. Abb. 19a

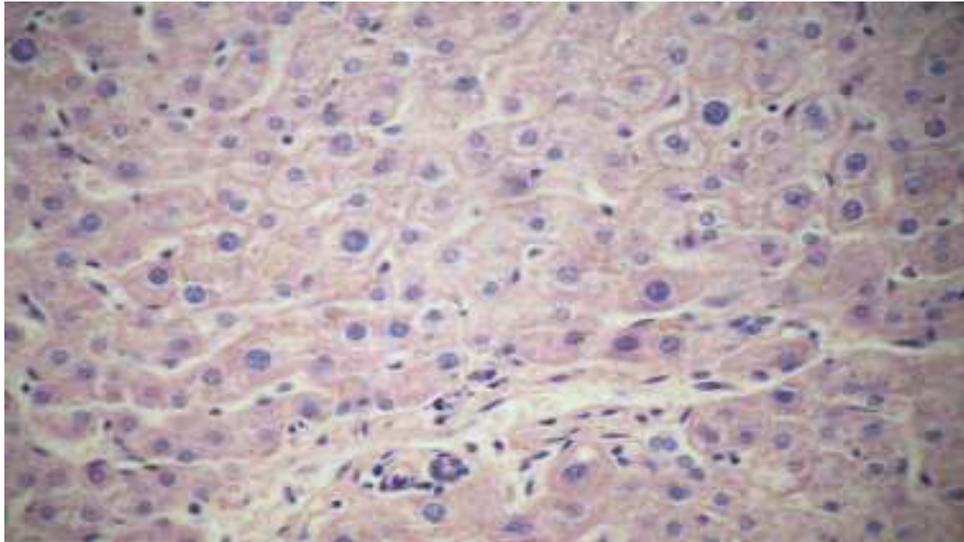


Abb. 19c H E-09001/06

HE x40

Kommentar s. Abb. 19a

### 3) Immunhistochemische Ergebnisse



Abb. 20a B (NS3) Pronase 1:20 x40

Zytoplasmatisch lokalisiertes, feingranuläres lobulär disseminiertes bräunliches Färbemuster; vereinzelt portale Anfärbungen sichtbar; AK: NS3; Gewebe: E-23750/06 (Probe B); Pronase 1:20



Abb. 20b B (NS3) Pronase 1:20 x40

Kommentar s. Abb. 20a



Abb. 21a H (NS3) Pronase 1:20 x40

Feingranuläres Anfärbungsmuster, deutliche Prominenz der Lipofuszingranula; ebenfalls portale Anfärbungen; AK: NS3; Gewebe: E-09001/06 (Probe H); Pronase 1:20

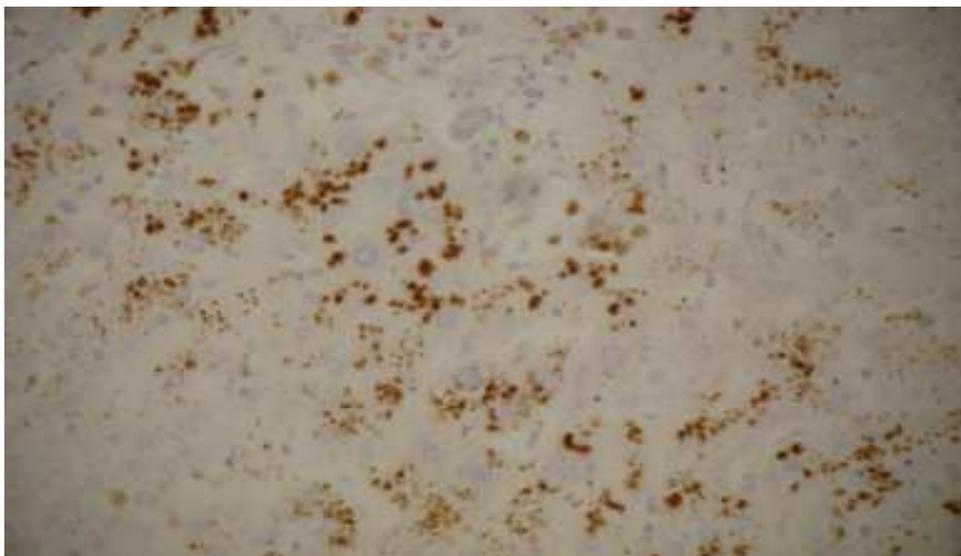


Abb. 21b H (NS3) Pronase 1:20 x40

Kommentar s. Abb. 21a

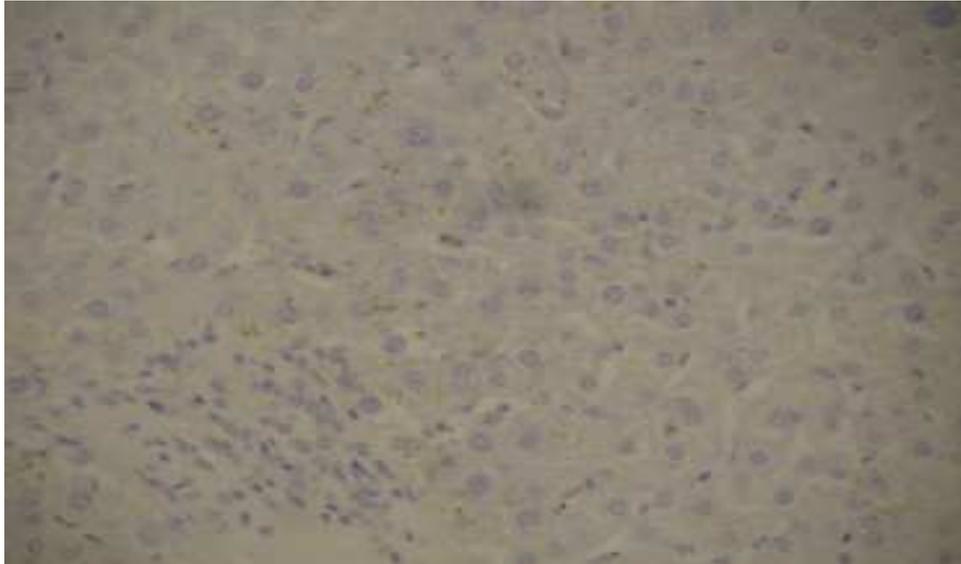


Abb. 21c H (NS3) Pronase 1:2000 x40

Keine Eliminierung der Färbung; AK: NS3; Gewebe: E-09001/06 (Probe H); Pronase 1:2000

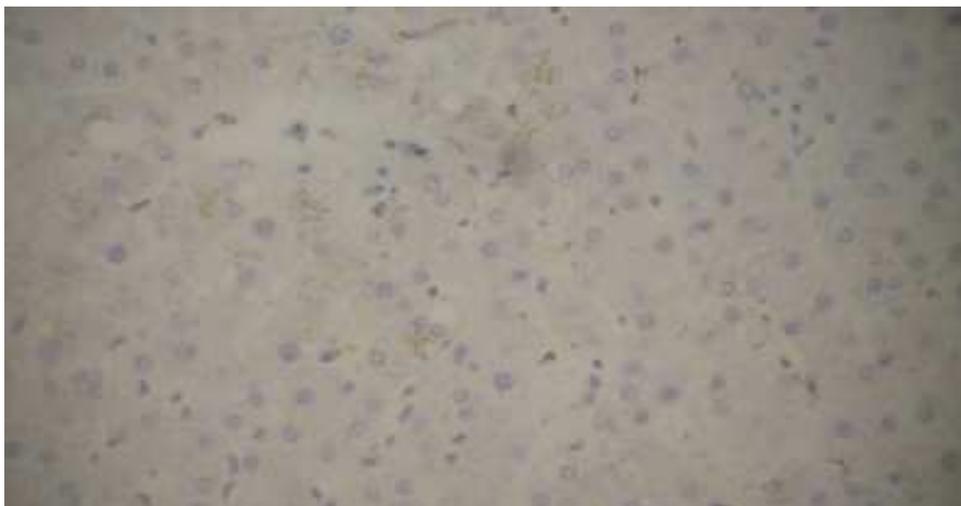


Abb. 21d H (NS3) Pronase 1:2000 x40

Kommentar s. Abb. 21c

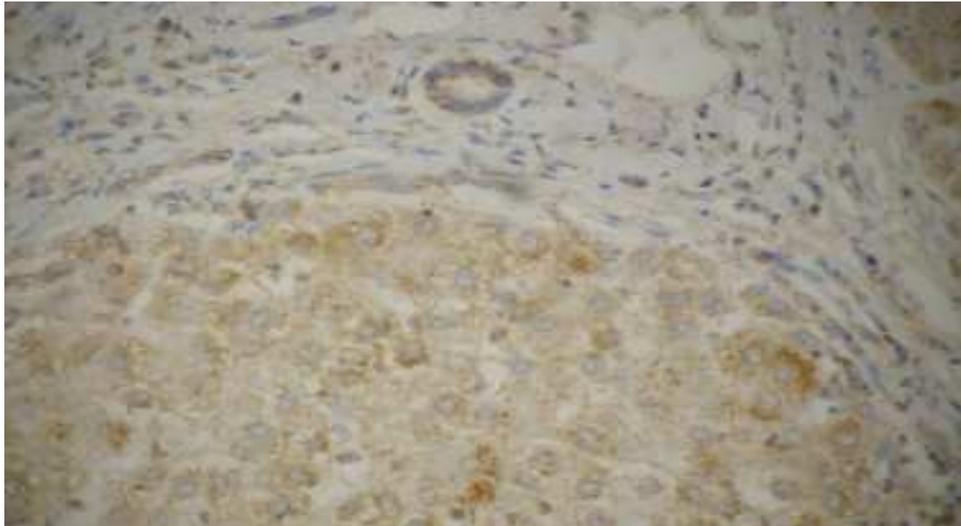


Abb. 22a      B      (NS 4) ACPH 1:150      x40

Bräunliche, über das gesamte Leberläppchen kontinuierlich verteilte Anfärbung; das gesamte Zytoplasma ist feingranulär angefärbt; AK: NS4; Gewebe: E-23750/06 (Probe B); Autoclave in Citrate Buffer 1:150



Abb. 22b      B      (NS4) ACPH 1:450      x40

Eliminierung der Hintergrundfärbung durch stärkere AK-Verdünnung; AK: NS4; Gewebe: E-23750/06 (Probe B); Autoclave in Citrate Buffer 1:450

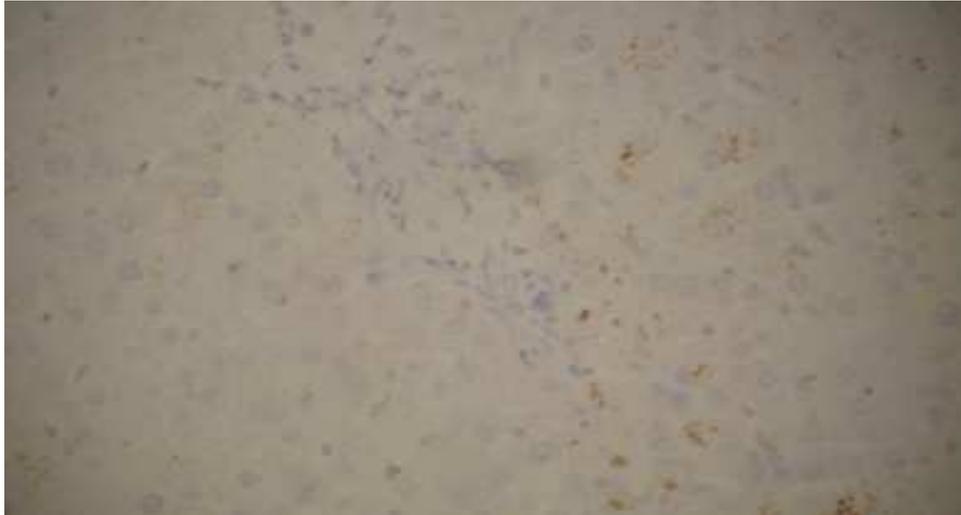


Abb. 23 H (NS4) ACPH 1:450 x40

Färbereaktion wie bei Abb. 22a beschrieben; AK: NS4; Gewebe: E-09001/06 (Probe H); Autoclave in Citrate Buffer 1:450

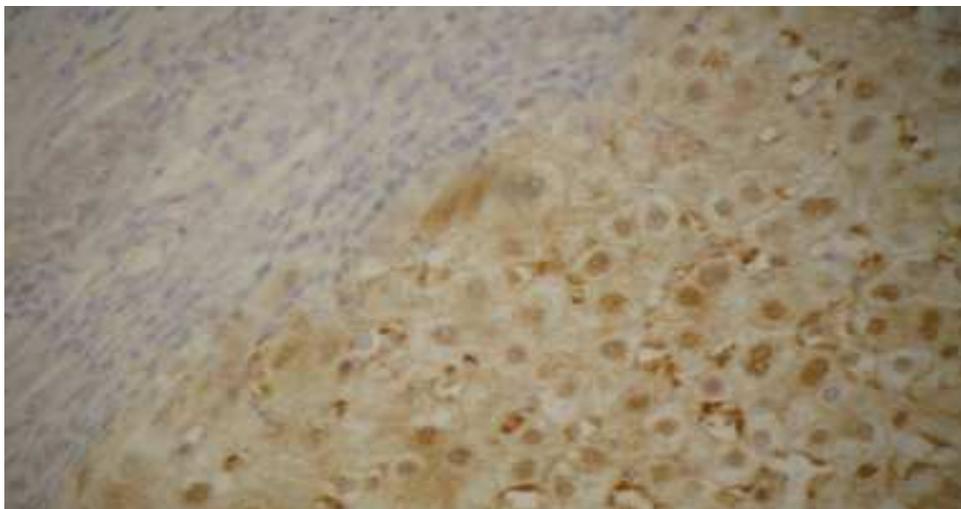


Abb. 24a E (NS5) ACPH 1:1000 x40

Nukleäres Färbemuster; AK: NS5; Gewebe: E-13805/04 (Probe E); Autoclave in Citrate Buffer 1:1000

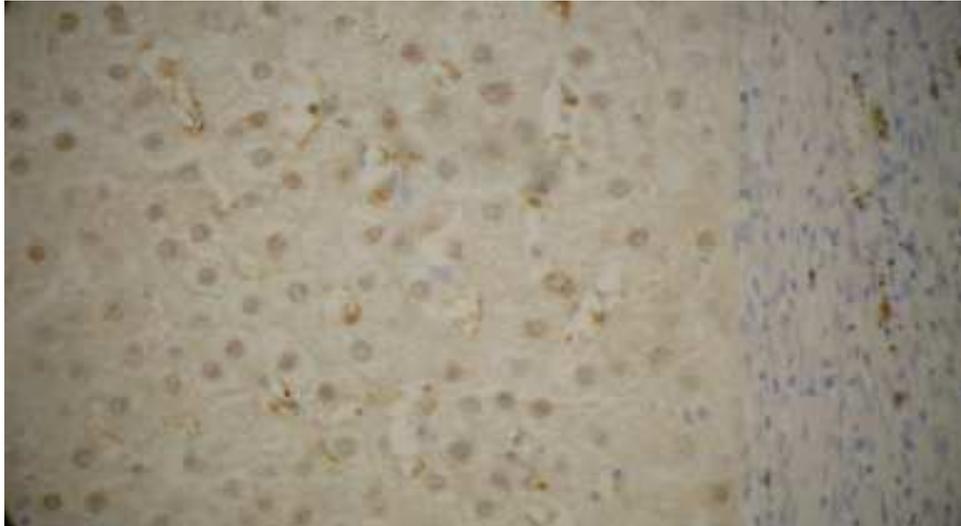


Abb. 24b E (NS5) ACPH 1:2000 x40

Kommentar s. Abb. 24a

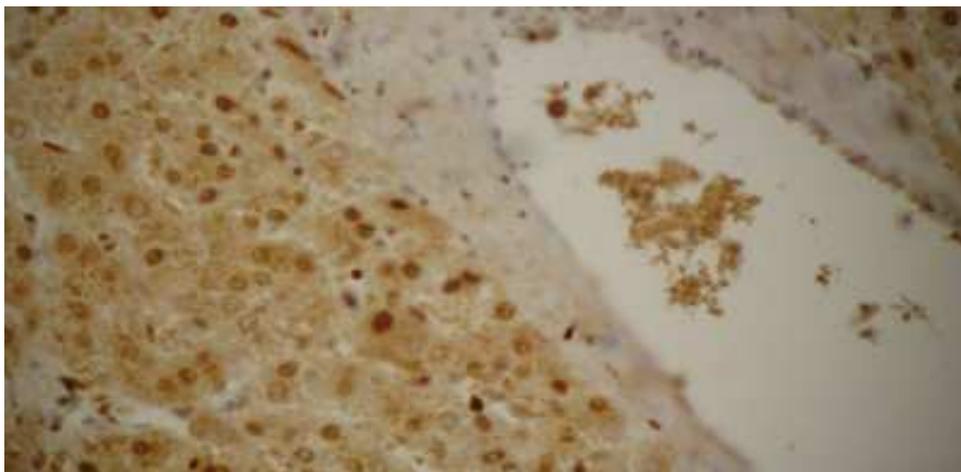


Abb. 25a H (NS5) ACPH 1:1000 x40

Nukleäres Färbemuster; keine Eliminierung der Anfärbung; AK: NS5; Gewebe: E-09001/06 (Probe H); Autoclave in Citrate Buffer 1:1000 + 1:2000

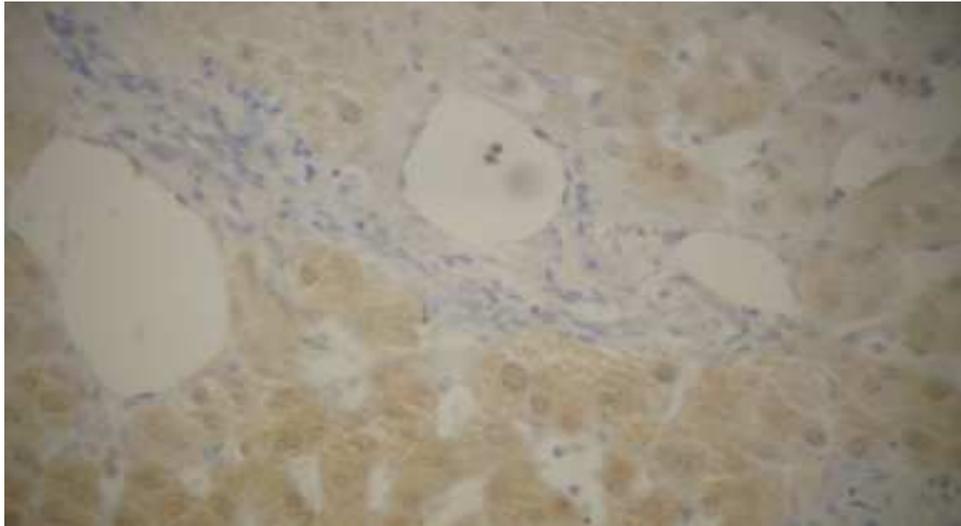


Abb. 25b H (NS5) ACPH 1:1000 x40

Kommentar s. Abb. 25a

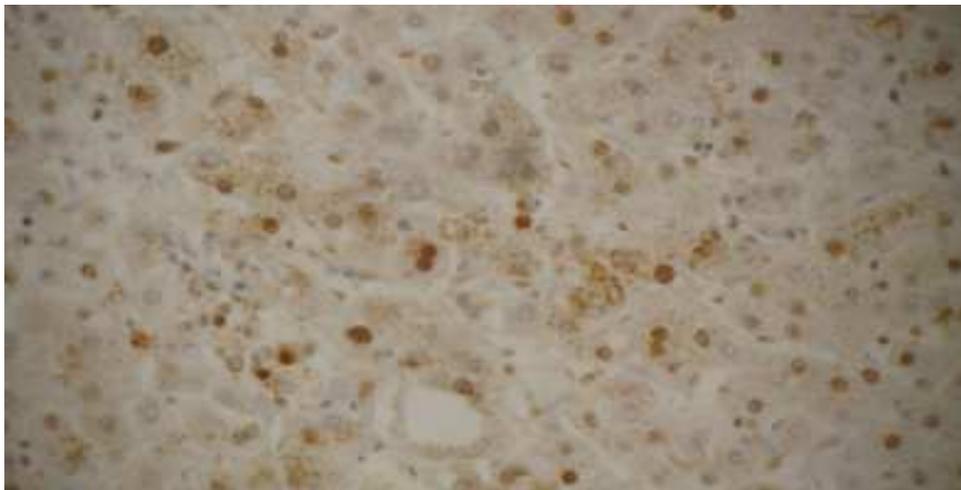


Abb. 25c H (NS5) ACPH 1:2000 x40

Kommentar s. Abb. 25a

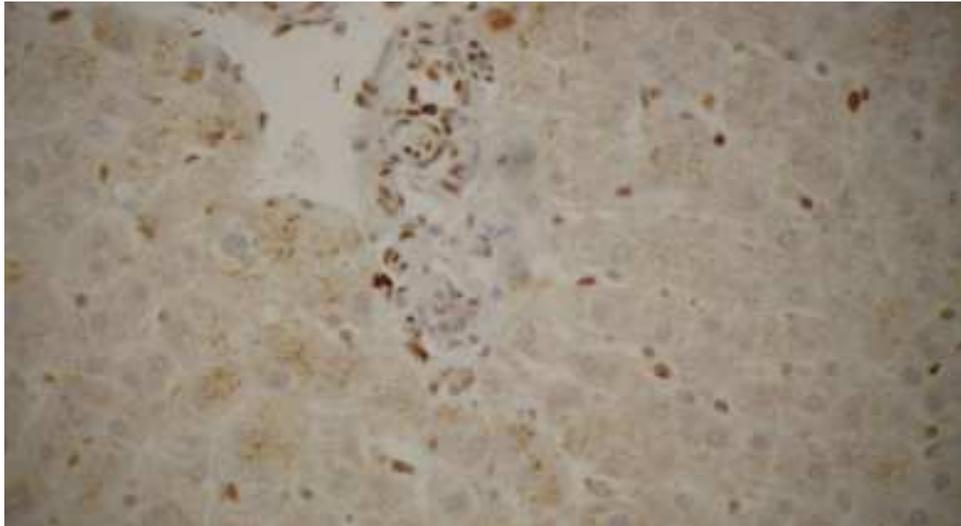


Abb. 25d H (NS5) ACPH 1:2000 x40

Kommentar s. Abb. 25a

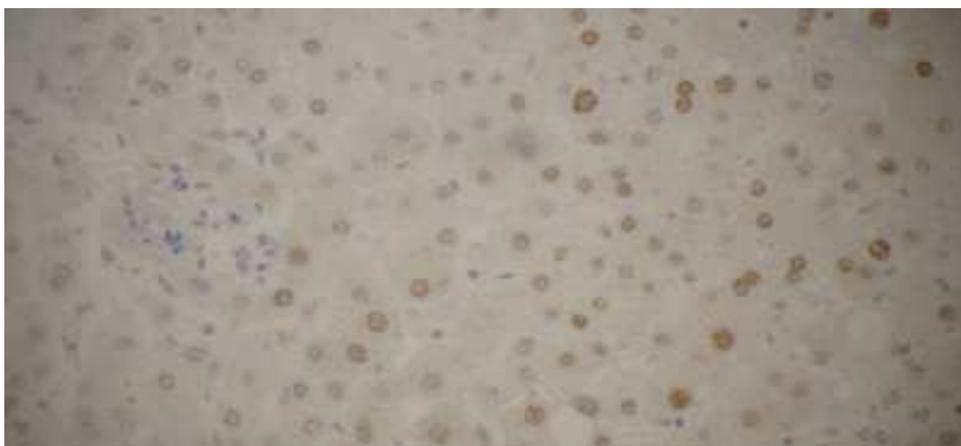


Abb. 25e H (NS5) ACPH 1:2000 x40

Kommentar s. Abb. 25a

## V. Diskussion

Von sechs gemäß Serologie HCV-positiven Proben (Institut für Mikrobiologie) ließen sich in der ersten Versuchreihe mittels RT-PCR vier Proben als viruspositiv im Lebergewebe identifizieren. In der zweiten Versuchsreihe (zur Wiederholung und Überprüfung der Ergebnisse der ersten Versuchsreihe unter Einschluss einer HCV-negativen Patientenprobe) konnte unter gleichen Bedingungen in nur drei der sechs Proben das Virus nachgewiesen werden. Dies entspricht einer Sensitivität von 66% bzw. 50% und liegt damit knapp unterhalb des publizierten Sensitivitätsbereichs von 60-84% [18]. Einzelne Publikationen weichen mit einer Sensitivität von 33% [29] und 98% [28] extrem von diesem Bereich ab. Die Tatsache, dass die Probe Nummer 4 in der ersten Versuchsrunde positiv, in der zweiten jedoch negativ ist, zeigt die Sensitivitätsproblematik dieses Nachweisverfahrens auf und ist somit als ein Beweis für die Insensitivität dieser Methode zu werten. Somit wird deutlich, dass nur der positive Befund verwertbar ist, da falsch-positive Ergebnisse nicht beobachtet wurden. Negative Befunde sind jedoch aufgrund o.g. falsch-negativer Ergebnisse äußerst kritisch zu hinterfragen.

Alle Proben wurden in einer Doppelbestimmung untersucht. Allerdings waren nur in einem Fall (Probe B / E-23750/06) beide Ansätze positiv, während in den anderen Fällen nur jeweils ein Ansatz ein positives Ergebnis zeigte. Dies deutet auf eine entsprechend höhere Virusmenge in diesem Gewebe hin. Ebenso denkbar wäre, dass eine qualitativ höherwertige Formalinfixierung und folglich eine geringere RNA-Degradierung vorliegt. Durch Isolierung der vierfachen RNA-Menge und gelelektrophoretischer Auftragung der Probe B, der ebenfalls HCV-positiven Probe C und der virusfreien Probe H konnte o.g. Beobachtung, dass nur bei der Probe B alle Ansätze positiv waren, reproduziert werden. Definitive Aussagen über die Viruslast bleiben aber quantitativen Verfahren wie der Real-time-RT-PCR vorbehalten.

Grundsätzlich konnte gezeigt werden, dass der HCV-Nachweis mittels RT-PCR am Paraffingewebe möglich ist. Allerdings zeigte sich erst nach diversen Modifikationen wie Erhöhung der Anzahl von PCR-Zyklen, Anpassung von Primerkonzentrationen und der Wahl eines anderen Kitsystems der gewünschte Erfolg. Durch Sequenzierung der als positiv identifizierten Proben konnten falsch-positive Ergebnisse ausgeschlossen werden. Neben der Zielsetzung des Virusnachweises am Paraffingewebe konnten zusätzlich für die anschließende Immunhistochemie positive Referenzkontrollen bereitgestellt werden.

Alle mit der RT-PCR untersuchten Proben A-F waren sorgfältig anhand serologischer Daten ausgewählt und somit sicher HCV-positiv. Für die Insensitivität bzw. die falsch-negativen Ergebnisse müssen daher Gründe gefunden werden. Diskussionsansätze lassen sich in den gewählten Primern und den unter Umständen materialbedingten PCR-Inhibitoren vermuten.

Die für unsere Studie gewählten Primer zur HCV-Detektion entstammen der Publikation von Vogt et al. [18]. Die Primer des ersten PCR-Durchlaufs (45-61, sense; 246-265, antisense) generieren ein Fragment der Länge von 221 bp, die des zweiten Durchlaufs (63-82, sense; 188-207, antisense) ein Fragment von 145 bp. Sie sind spezifisch für die konservierte nichtkodierende 5' Region des HCV-Genoms. Untersuchungen auf interne Sekundärstrukturen wie Haarnadelstrukturen und unterschiedliche Schmelztemperaturen TM wurden unter folgendem Link vorgenommen:

<http://scitools.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/Default.aspx>. Dabei zeigten Sense- und Antisense-Primer des ersten Durchlaufs eine

Schmelztemperaturdifferenz von 4,4°C (TM-sense: 51, 2°C, TM-antisense: 55,6°C). Die Temperaturdifferenz der Primer des zweiten Durchlaufs betrug 1,7°C (TM-sense: 55,0°C, TM-antisense: 53,3°C). Hinweise auf Haarnad elstrukturen konnten nicht erarbeitet werden.

Ebenfalls haben Dries et al. [17] und Kalinski et al. [16] diese Primer benutzt. Während es sich bei Kalinski et al. um eine Kasuistik eines einzelnen Patienten handelt und daher keine statistischen Aussagen zur Sensitivität und Spezifität gemacht werden können, wird bei Dries et al. in 61% und bei Vogt et al. in 70% bzw. 85% der Fälle über einen positiven intrahepatischen Virusnachweis berichtet.

Einstimmig werden auch in anderen Studien ausschließlich Primer verwendet, die komplementär zur 5'NCR sind. [25, 28, 29, 21, 19, 14, 41] Allerdings sind die Primer an unterschiedlichen Stellen innerhalb der 5'NCR positioniert und weisen im Gegensatz zu den in dieser Studie eingesetzten Primer unterschiedliche Längen auf. So benutzen Guerrero et al. [19, 21, 41] in den Studien zur Bestimmung des durchschnittlichen Zeitpunkts der Reinfektion beim OLT-Patienten [19], zur Untersuchung des Einflusses der Formalinfixierung auf den HCV-Nachweis [41] und zur Klärung der Fragestellung, ob der Virusnachweis im Paraffingewebe nur eine begleitende Virämie widerspiegelt, ein Primerset von nicht benannter Position innerhalb der 5'NCR und einer Länge von 308 bp (1. PCR-Durchlauf) bzw. 251 bp (2. PCR-Durchlauf). Guerrero et al. konnten in ihren Studien zeigen, dass bei einer Formalinfixierungsdauer von 24 Stunden ein HCV-Nachweis an sicher virushaltigem Paraffingewebe in 100 % der Fälle möglich ist. Bei prolongierter Fixierungsdauer von drei bis fünf Tagen sank die Sensitivität auf 85% und bei Monate bis Jahre andauernder Fixierung war keine Virusdetektion mehr möglich. Eine Lagerung des Paraffinblocks von mehreren Jahren zeigte hingegen keine Auswirkung auf die Diagnostik. [41] Basierend auf diesen Ergebnissen scheint aufgrund der Tatsache, dass bei 14 transplantationspflichtigen HCV-positiven Patienten die Spenderorgane vor und nach Abschluss der Transplantation mittels RT-PCR als virusnegativ identifiziert wurden, die Schlussfolgerung naheliegend, dass die RT-PCR im Fall einer positiven Diagnose keine die Hepatozyten begleitende Virämie widerspiegelt. Allerdings räumen die Autoren ein, dass nicht näher spezifiziert werden kann, welche Menge an virämischer Kontamination nötig ist, um ein falsch-positives Ergebnis zu provozieren. [21] Zusätzlich konnten sie nachweisen, dass der Zeitpunkt der Reinfektion des Transplantats mehrheitlich ca. eine Woche (42,8%) post transplantationem ist. Dieses Ergebnis kollidiert mit der Erkenntnis von einer durchschnittlich 6-7 wöchigen Inkubationszeit des Hepatitis-C-Virus im nontransplant setting. [19]

Komminoth et al. [29] gelang der Virusnachweis am Paraffingewebe in 33% aller Hepatitis-Fälle. Das Primerset (72-91, sense; 153-135, antisense) generiert ein PCR-Fragment der Länge 82 bp. Brody et al. [25] publizieren eine Sensitivität von 71% und eine Spezifität von 88%. Das Primerset (90-109, sense; 171-153, antisense) generiert ebenfalls ein Fragment der Länge 82 bp. Nach der Studie von Svoboda-Newman et al. [28] gelang die HCV-Detektion in 98% aller Fälle. Das Primerset des ersten PCR-Durchlaufs (324-303, sense; 205-185, antisense) generiert ein Fragment der Länge 140 bp, das Primerset des zweiten PCR-Durchlaufs (302-284, sense; 238-221, antisense) ein Fragment der Länge 82 bp.

Aufgrund der zum Teil starken RNA-Fragmentierung ist primär anzunehmen, dass die Wahrscheinlichkeit, das Virus im Paraffingewebe nachzuweisen, mit abnehmender Länge des PCR-Produktes zunimmt. Dieser Vermutung wird aber durch die hier angeführten Ergebnisse diverser Studien widersprochen. Weitere wichtige Faktoren für ein korrektes Primerdesign sind eine hohe Bindungsspezifität,

ähnliche Schmelztemperaturen und das Fehlen von Haarnadel- bzw. Sekundärstrukturen. Das Anpassen der Primerkonzentrationen zur Vermeidung von unspezifischen Produkten und Primerdimerbildung sollte ebenfalls sorgfältig vorgenommen werden.

Weitere Probleme der RT-PCR stellen schwankende cDNA-Ausbeute und Inhibitoren dar. Durch den Vorgang der reversen Transkription der isolierten RNA zur cDNA sind in dem Reaktionsprodukt diverse Substanzen wie Puffer, Primer und Salze vorhanden, die eine Inhibierung bzw. Interferenz mit der PCR zur Folge haben können. Wie bereits oben erwähnt, ist die korrekte Formalinfixierung mit einer Dauer von 24 Stunden erforderlich. Leider ist es nicht möglich zu überprüfen, wie lange die in unserer Studie untersuchten Proben fixiert worden sind. Es ist daher denkbar, dass ein Teil der falsch negativen Ergebnisse durch eine inkorrekte bzw. zu lange andauernde Fixierung zu erklären ist. Durch die interne Housekeeping-Gen-Kontrolle mittels GAPDH konnte eine zufriedenstellende cDNA-Ausbeute ermittelt werden. Als Positivkontrolle diente aufgereinigte RNA aus der Blutprobe eines HCV-Patienten. Durch den HCV-Nachweis mittels RT-PCR in einer eigenständigen PCR konnte gezeigt werden, dass die Primer targetspezifisch sind. Als Negativkontrolle dienten Gewebeproben eines Oxalosepatienten, Prostata-RNA und Wasserproben. Keine dieser Proben zeigte unter Verwendung HCV-spezifischer Primer ein positives Ergebnis. Damit konnten falsch-positive Ergebnisse ausgeschlossen werden. Durch Vermischung von viruspositiver und virusnegativer RNA in Form einer Verdünnungsreihe in der zweiten Versuchsreihe sollten mögliche Interferenzen auf die Möglichkeit, das Virus zu detektieren, untersucht werden. Weder die bis zu sechzehnfache Verdünnung noch das Hinzufügen isolierter negativer RNA des Oxalosepatienten zeigten einen Einfluss auf die Möglichkeit des Virusnachweises.

Unter Beachtung eben genannter Tatsachen wie der Durchführung interner Kontrollen zum Nachweis des Housekeeping-Gens und Positiv- und Negativkontrollen zum Nachweis der Targetspezifität lässt sich zusammenfassend sagen, dass in dieser Studie ein stabiles System zum HCV-Nachweis im Paraffingewebe mittels RT-PCR etabliert worden ist. Die Vorkehrung strenger Dekontaminationsmaßnahmen wie Verwendung von sterilen gestopften Pipettenspitzen, Reaktionsgefäßen und Latexhandschuhen und die Separierung der Arbeitsplätze zur Nukleinsäureisolierung, cDNA-Synthese und Vorbereitung des PCR-Ansatzes, haben zusätzlich zur Fehlereliminierung beigetragen.

Grundsätzlich ist zu beachten, dass diese Methode insbesondere aufgrund der sehr arbeitsaufwändigen RNA-Isolierung einen erheblichen Zeitaufwand darstellt. Zudem können nur wenige Proben gleichzeitig bearbeitet werden. Die Varianz der Ergebnisse selbst bei Benutzung gleicher Kits bzw. Primer hervorgerufen durch Personal, verwendete Geräte und Arbeitsprozeduren stellt ein erhebliches Problem dar. [10] Hinzukommt die Notwendigkeit teurer Arbeitsmaterialien, separater Räume und geschulten Personals.

Bei der *Immunhistochemie* gibt es zwei entscheidende Kriterien eines Antikörpers: Qualität und Affinität. Daher wurde in unserer Studie ein ganzes Panel an Antikörpern getestet. Durch die Formalinfixierung werden Proteine quervernetzt und sind daher nicht mehr von Proteasen angreifbar. Von entscheidender Bedeutung ist daher die Auflösung dieser Quervernetzung und die damit einhergehende korrekte Demaskierung der Antigene, um die Antigen-Antikörperreaktion zu ermöglichen. Dieses wird als Antigen-Retrieval bezeichnet und wird durch Variation von Druck, Temperatur und pH-Wert erreicht.

In der ersten Versuchsrunde wurden die drei monoklonalen Antikörper NS3, NS4 und NS5 an den drei HCV-positiven Geweben E-23750/06, E-10141/07 und E-13805/04 getestet. Die unterschiedlichen Vorbehandlungen für das Antigen-Retrieval sind oben aufgelistet. Es sollte herausgefunden werden, ob die Antikörper die aufgrund der Klinik und PCR-Ergebnisse als positiv erwarteten Proben spezifisch erfassen. Ferner sollten geeignete Verdünnungen des primären Antikörpers und Antigen-Demaskierungsvorbehandlungen ausfindig gemacht werden, um dann in der oben aufgelisteten zweiten Versuchsrunde unter Hinzunahme einer HCV-negativen Gewebeprobe (E-09001/06) zielorientierter vorgehen zu können. Die dritte Versuchsreihe diente der Eliminierung des Verdachts der unspezifischen Färbung durch weitere Dilution des primären Antikörpers in der für geeignet befundenen Vorbehandlung des jeweiligen Antikörpers am entsprechenden Gewebe.

Der gegen das *NS3-Epitop* gerichtete monoklonale Antikörper vom Klon Tordji-22 zeigte am HCV-positiven Gewebe E-23750/06 in der Pronase-Vorbehandlung (1:20 Verdünnung) ein zytoplasmatisch lokalisiertes, feingranuläres, lobulär disseminiertes Färbemuster von brauner Farbe (s. Abb. 20a+b). Vereinzelt konnten auch in von entzündlichen Infiltrationen durchzogenen Portalfeldern Anfärbungen detektiert werden. Beim HCV-negativen Gewebe E-09001/06 zeigte sich in der gleichen Vorbehandlung ebenso ein feingranuläres Färbeverhalten, die Intensität war jedoch erheblich durch die Anfärbung der in diesem Gewebe prominenten Lipofuszingranula gesteigert. Auch die portal lokalisierten Anfärbungen traten bei diesem Gewebe wesentlich stärker zum Vorschein. In den Verdünnungen 1:1000 und 1:2000 ließen sich die Anfärbungen nicht eliminieren (s. Abb. 21a-d). Daraus ergibt sich eine mangelnde Eignung des getesteten Antikörpers zur sicheren Unterscheidung zwischen viruspositivem und -negativem Gewebe.

Der gegen das *NS4-Epitop* gerichtete Antikörper zeigte in der Vorbehandlung „Autoklavieren in Citrat Puffer pH 6.0, 5 min“ am HCV-positiven Gewebe E-23750/06 in der Verdünnung 1:150 eine bräunliche, über das gesamte Leberläppchen kontinuierlich verteilte zytoplasmatische Anfärbung (s. Abb. 22a). Im Gegensatz zum Färbeverhalten des NS3-Antikörpers am gleichen Gewebe ist annähernd das gesamte Zytoplasma der Hepatozyten mit feingranulären Anfärbungen versehen. Allerdings ließen sich auch portale Anfärbungen inklusive der Gallengänge vorfinden. In der gleichen Vorbehandlung bei höherer Verdünnung (1:450) konnten keine Anfärbungen mehr detektiert werden (s. Abb. 22b). Das negative Kontrollgewebe wies in der 1:450 Verdünnung bei gleicher Vorbehandlung im Gegensatz dazu eine, wie bereits oben beschriebene, positive Färbereaktion auf, woraus auch in diesem Fall auf die mangelnde Eignung des o.g. Antikörpers zu schließen ist, eine HCV-Infektion im Lebergewebe sicher anzuzeigen (s. Abb. 23).

Im Gegensatz zu den oben erwähnten hauptsächlich zytoplasmatisch lokalisierten Färbungen wies der gegen das *NS5 Epitop* gerichtete Antikörper ein vorwiegend nukleäres Färbemuster auf. Die geeignete Vorbehandlung „Autoklavieren in Citrat Puffer pH 6.0, 5 min“ in der Verdünnung 1:1000 und 1:2000 zeigte allerdings sowohl beim HCV-positiven Gewebe E-13805//04 und beim HCV-negativen Kontrollgewebe E-09001/06 die oben genannte Reaktion (s. Abb 24a+b und 25a-e). Somit ist auch in diesem Fall die diagnostische Aussagekraft stark eingeschränkt.

Es lässt sich an dieser Stelle zusammenfassend feststellen, dass kein signifikanter Unterschied zwischen HCV-positivem Gewebe und HCV-negativem Kontrollgewebe hinsichtlich der Färbung besteht. Bei allen drei getesteten monoklonalen Antikörpern ließ sich die Färbereaktion der Negativkontrolle durch entsprechend höhere Verdünnung nicht vollständig eliminieren.

Das in der Literatur beschriebene Anfärbungsmuster des monoklonalen Antikörper NS3 vom Klon Tordji-22 gleicht weitestgehend dem Ergebnis unserer Studie. So wird überwiegend einheitlich von einem zytoplasmatisch und z.T. auch perinukleär lokalisierten, feingranulären Anfärbungsmuster berichtet. [23, 24, 25, 28, 29] In Anklang an unsere Beobachtung portaler Anfärbungen berichten Brody et al. [25] und Nakopoulou et al. [23] von positiven Gallengängen. Auch unsere Beobachtung der unspezifischen Anfärbung insbesondere des virusfreien Kontrollgewebes findet in der Literatur entsprechende Bestätigung. So wird in der Studie von Doughty et al. [24] über die falsch-positive Reaktion von HCV-negativen Lebertransplantaten mit ausgeprägtem Zellschaden berichtet. Die in dieser Studie untersuchten „hepatocyte ballooning sections“ in den virusfreien Geweben sind durch Ischämie, Abstoßungsreaktion oder Blutgruppeninkompatibilität hervorgerufen und stellen ein Beispiel für die schwierige Diagnostik in der Posttransplantationssituation dar, in der zwischen einer Reinfektion, einer akuten Abstoßungsreaktion und einem toxischen Parenchymschaden diskriminiert werden muss. Auffällig ist die positive Korrelation zwischen dem Schweregrad des Zellschadens und der Stärke der Färbereaktion, was insbesondere bei den HCV-positiven Geweben die Hypothese eines zytopathischen Mechanismus des Virus aufwerfen könnte. Komminoth et al. [29] berichten ebenfalls von unspezifischen Kreuzreaktionen mit anderen Epitopen in virusfreien Geweben.

Konträre Ergebnisse werden unter anderem von Svoboda-Newman et al. [28], Brody et al. [25] und Nakopoulou et al. [23] publiziert. Nach Svoboda-Newman et al. [28] gelang der HCV-Nachweis mittels IHC in bis zu 50% der durch die RT-PCR als HCV-positiv evaluierten Fälle. Allerdings wird keine Abbildung von dem HCV-negativen Kontrollgewebe aufgeführt. Brody et al. [25] führen eine Sensitivität von 70% und eine Spezifität von 84% des Tordji-22 Antikörpers an. Trotz der auffallenden Ähnlichkeit zwischen positiver und falsch-positiver Färbereaktion wird behauptet, dass dennoch eine Identifizierung positiver Hepatozyten möglich sei. Wenig Beachtung findet dabei die Tatsache, dass auch positive Gallengänge gefunden wurden. In der Studie von Nakopoulou et al. [23] wird eine Sensitivität von 62% angegeben. Auch hier findet die Präsenz positiver Gallengänge wenig Beachtung.

Bei Vergleich der IHC-Protokolle hinsichtlich des Demaskierungsverfahrens zeigt sich mehrheitlich die Vorbehandlung mit Protease XXIV in 0,5 M Tris-HCl bei pH 7,5. [23,25,28,29] Nur in der Studie von Doughty et al. [24] wird das Antigen-Retrieval mit Citrat-Puffer bei pH 6,0 durchgeführt. Zur Verdünnung des primären Antikörpers lassen sich unterschiedliche Angaben finden: 1:8 [28], 1:10 [29], 1:100 [249] und keine Angabe [23, 25]. Überwiegend einheitlich kommt die Avidin bzw. Streptavidin-Biotin Methode zum Einsatz. [23, 24, 25, 28]

Auch in unserer Studie lassen sich die besten Ergebnisse mit der Verwendung von Pronase XIV oder Citrat Puffer bei pH 6,0 erzielen. Auffällig ist allerdings die zum Teil sehr geringe Verdünnung des primären Antikörpers in den anderen Studien. Bei einer Verdünnung von 1:2000 ist in dieser Studie das Negativkontrollgewebe immer noch angefärbt. Anlass zur Diskussion geben auch das häufig verwendete Avidin und Biotin aufgrund der endogenen Biotinaktivität in der Leber und der Gefahr unspezifischer Anfärbung. Es konnte somit keine Eignung des monoklonalen Antikörpers NS3 vom Klon Tordji-22 zur HCV-Detektion am Paraffingewebe gezeigt werden.

Ähnlich verhält es sich mit den anderen getesteten monoklonalen Antikörpern NS4 und NS5. Die nicht zu eliminierende Anfärbung des virusfreien Kontrollgewebes in beiden Fällen zeigt auch hier die mangelnde Eignung zur HCV-Detektion am Paraffingewebe auf. Zu beiden Antikörpern konnten in der Literatur keine entsprechenden Studien gefunden werden. Unsere Studie zeigt, dass der gesamte

vom HCV-Genom kodierte Nicht-Struktur-Proteinbereich nicht geeignet ist, durch entsprechende monoklonale Antikörper am Paraffingewebe detektiert zu werden.

Der Struktur-Protein-Bereich des HCV-Genoms könnte bezüglich der Diagnostik am Paraffingewebe einen Ausweg darstellen. Die Studien von Verlype et al. [35] und Galy et al. [37] propagieren die HVR 1 (Hypervariable Region) des E2 Glykoproteins als geeignetes Epitop zur HCV-spezifischen Diagnostik am Paraffin- und Kryogewebe. Nach Verslype et al. [35] konnte mit dem monoklonalen Antikörper IG222 eine Sensitivität von 96% und eine Spezifität von 91% erreicht werden. Genaue Angaben zur Sensitivität und Spezifität fehlen in der Studie von Galy et al. [37]. Dieser zufolge sollen alle fünf Genotypen zuverlässig erkannt werden und auch archivierte Proben von mehr als 20 Jahren für die Diagnostik keine Beeinträchtigung darstellen. Anhand weiterer Studien muss die diagnostische Relevanz des E2 Glykoproteins genauer überprüft und reproduziert werden. Zur Zeit ist der Antikörper noch nicht allgemein verfügbar.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse unserer Studie, dass die PCR nur begrenzt und die Immunhistochemie überhaupt noch nicht geeignet sind, HCV im Lebergewebe nachzuweisen.

In den aufwendigen molekularbiologischen Verfahren wie der PCR kann der positive Befund diagnostisch verwertet werden, da falsch-positive Ergebnisse, wie in unserer exemplarischen Studie zu sehen ist, nicht vorkommen. Umgekehrt sind negative Befunde jedoch kritisch zu hinterfragen und deshalb diagnostisch nur unter großer Einschränkung verwertbar. Die Immunhistochemie ist zur HCV-Diagnostik am Paraffingewebe nicht geeignet.

Der Einsatz der PCR kann daher zur Diskriminierung zwischen einer Reinfektion und akuter Abstoßung des Transplantats bei Lebertransplantationspatienten nur eingeschränkt empfohlen werden, da in weiteren Studien noch zu klären wäre, ob die Verwertbarkeit positiver Befunde auch auf die Transplantationssituation übertragbar ist.

## VI. Zusammenfassung

Ziel dieser exemplarischen Studie war es, zwei Methoden zum HCV-Nachweis am Paraffingewebe bezüglich ihrer Sensitivität zu überprüfen und zu etablieren. Die Relevanz dieser Studie ergibt sich aus der Tatsache, dass insbesondere bei Lebertransplantationspatienten mit chronischer HCV-Infektion die diagnostische Diskriminierung anhand der Serologie und Histologie zwischen einer neu auftretenden Reinfektion, einer akuten Abstoßungsreaktion des Transplantats und einem toxischen Parenchymschaden und der sich daraus ergebenden therapeutischen Konsequenz bisweilen nicht sicher möglich ist.

Das Untersuchungsgut bestand aus HCV-positiven Paraffinschnitten von Leberexplantaten, die aufgrund positiver serologischer Daten ausgewählt wurden. Methodisch zum Einsatz kamen die qualitative Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR) und die Immunhistochemie (IHC).

Die RT-PCR zeigte eine Sensitivität von 66% bzw. 50%. Die zu amplifizierende Zielsequenz wurde durch ein Fragment der Länge 221 bp (erster PCR-Durchlauf) bzw. 145 bp (zweiter PCR-Durchlauf) innerhalb der nicht kodierenden 5'Region (NCR) des HCV-Genoms repräsentiert.

Diese exemplarische Studie zeigte eine eingeschränkte Brauchbarkeit des positiven PCR-Befundes, da falsch-positive Ergebnisse nicht zu beobachten waren. Aufgrund der hohen Rate falsch-negativer Ergebnisse sind negative PCR-Befund jedoch äußerst kritisch zu hinterfragen.

In der Immunhistochemie wurden drei monoklonale Antikörper gegen Epitope der Nicht-Struktur-Proteine 3-5 (NS3, NS4 und NS5) getestet. Zu den monoklonalen Antikörpern NS4 und NS5 finden sich derzeit keine Studien in der Literatur. Alle drei Antikörper zeigten in dieser Studie keine Eignung zum in situ Nachweis des Hepatitis-C-Virus am Paraffingewebe, da sich bei allen die Färbereaktion der Negativkontrolle nicht durch entsprechend höhere Verdünnung vollständig eliminieren ließ. Zusätzlich konnten durch Inkubation der entsprechenden Gewebe mit den Antikörpern gegen die Epitope NS3 und NS4 unspezifische Anfärbungen der Gallengänge und lymphozytärer Infiltrationen im Bereich der Portalfelder beobachtet werden.

Der zur Zeit noch nicht allgemein verfügbare monoklonale IG222 Antikörper gegen die im Struktur-Protein-Bereich des HCV-Genoms vorkommende HVR1 des E2 Glykoproteins könnte nach aktueller Studienlage einen vielversprechenden Ausweg darstellen.

In dieser Studie und unter Berücksichtigung vorhandener Literatur wird daher deutlich, dass bislang noch kein zuverlässiges Nachweisverfahren zur Diagnostik intrahepatischer HCV-RNA bzw. HCV-spezifischer Proteine vorhanden ist.

## VII. Literaturverzeichnis

01. Kayser F  
**Hepatitis-C-Virus (HCV)**  
*Taschenlehrbuch Medizinische Mikrobiologie, 11. Aufl. Stuttgart: Thieme, 2005, 501-504*
02. Zuckerman J  
**Hepatitis Viruses**  
*Infectious Diseases, 2004, 2007-2021*
03. Ryder S  
**Viral hepatitis**  
*Infectious Diseases, 2004, 529-547*
04. Revie D, Braich RS, Bayles D, Chelyapov N, Khan R, Geer C, Reisman R, Kelley AS, Prichard JG, Salahuddin SZ.  
**Transmission of human hepatitis C virus from patients in secondary cells for long term culture.**  
*Virology. 2005 Apr 19;2:37.*
05. Salahuddin SZ, Snyder KA, Godwin A, Grewal R, Prichard JG, Kelley AS, Revie D.  
**The simultaneous presence and expression of human hepatitis C virus (HCV), human herpesvirus-6 (HHV-6), and human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) in a single human T-cell.**  
*Virology. 2007 Oct 24;4:106.*
06. Revie D, Alberti MO, Braich RS, Chelyapov N, Bayles D, Prichard JG, Salahuddin SZ.  
**Analysis of in vitro replicated human hepatitis C virus (HCV) for the determination of genotypes and quasispecies.**  
*Virology. 2006 Sep 29;3:81.*
07. Esteban JI, Sauleda S, Quer J.  
**The changing epidemiology of hepatitis C virus infection in Europe.**  
*J Hepatol. 2008 Jan;48(1):148-62. Epub 2007 Nov 5. Review.*
08. **Hepatitis C: global prevalence.**  
*Weekly Epidemiol Rec. 1999 Nov 14;74(49):425-427.*
09. Gretch DR.  
**Diagnostic tests for hepatitis C.**  
*Hepatology. 1997 Sep;26(3 Suppl 1):43S-47S. Review.*
10. Scott JD, Gretch DR.  
**Molecular diagnostics of hepatitis C virus infection: a systematic review.**  
*JAMA. 2007 Feb 21;297(7):724-32. Review.*
11. Thomas L  
**Hepatitis C**  
*Labor und Diagnose, 5. Erw. Auflage, 2000, 1305-1310*
12. Dries V, Odenthal M, Schirmacher P, Dienes HP.  
**Liver biopsy in chronic hepatitis C. Histopathology, molecular diagnostic analysis, and implications for therapeutic management**  
*Pathologie. 2001 Nov;22(6):362-8. German.*

13. Böcker W, Denker H, Heitz P  
**Entzündliche Lebererkrankungen**  
*Pathologie, Urban & Fischer, 2004*
14. Castillo I, Pardo M, Bartolomé J, Ortiz-Movilla N, Rodríguez-Iñigo E, de Lucas S, Salas C, Jiménez-Heffernan JA, Pérez-Mota A, Graus J, López-Alcorocho JM, Carreño V.  
**Occult hepatitis C virus infection in patients in whom the etiology of persistently abnormal results of liver-function tests is unknown.**  
*J Infect Dis. 2004 Jan 1;189(1):7-14. Epub 2003 Dec 31.*
15. Carreño V, Pardo M, López-Alcorocho JM, Rodríguez-Iñigo E, Bartolomé J, Castillo I.  
**Detection of hepatitis C virus (HCV) RNA in the liver of healthy, anti-HCV antibody-positive, serum HCV RNA-negative patients with normal alanine aminotransferase levels.**  
*J Infect Dis. 2006 Jul 1;194(1):53-60. Epub 2006 May 16.*
16. Kalinski T, Klante T, Päge I, Schneider-Stock R, Dombrowski F, Roessner A.  
**Liver cirrhosis and membranoproliferative glomerulonephritis caused by inapparent hepatitis C virus infection.**  
*Pathol Res Pract. 2006;202(12):891-4. Epub 2006 Nov 7.*
17. Dries V, von Both I, Müller M, Gerken G, Schirmacher P, Odenthal M, Bartenschlager R, Drebber U, Meyer zum Büschenfeld KH, Dienes HP.  
**Detection of hepatitis C virus in paraffin-embedded liver biopsies of patients negative for viral RNA in serum.**  
*Hepatology. 1999 Jan;29(1):223-9.*
18. Vogt S, Schneider-Stock R, Klauck S, Roessner A, Röcken C.  
**Detection of hepatitis C virus RNA in formalin-fixed, paraffin-embedded thin-needle liver biopsy specimens.**  
*Am J Clin Pathol. 2003 Oct;120(4):536-43.*
19. Guerrero RB, Batts KP, Burgart LJ, Barrett SL, Germer JJ, Poterucha JJ, Wiesner RH, Charlton MR, Persing DH.  
**Early detection of hepatitis C allograft reinfection after orthotopic liver transplantation: a molecular and histologic study.**  
*Mod Pathol. 2000 Mar;13(3):229-37.*
20. Grassi A, Quarneti C, Ravaioli M, Bianchini F, Susca M, D'Errico A, Piscaglia F, Tamè MR, Andreone P, Grazi G, Galli S, Zauli D, Pinna AD, Bianchi FB, Ballardini G.  
**Detection of HCV antigens in liver graft: relevance to the management of recurrent post-liver transplant hepatitis C.**  
*Liver Transpl. 2006 Nov;12(11):1673-81.*
21. Guerrero RB, Batts KP, Germer JJ, Perez RG, Wiesner RH, Persing DH.  
**Reverse transcriptase-polymerase chain reaction fails to detect peripheral-blood hepatitis C RNA in formalin-fixed liver tissue.**  
*Liver Transpl Surg. 1998 Nov;4(6):455-60.*
22. Gowans EJ.  
**Distribution of markers of hepatitis C virus infection throughout the body.**  
*Semin Liver Dis. 2000;20(1):85-102. Review.*

23. Nakopoulou L, Manolaki N, Lazaris AC, Kostaridou S, Gakiopoulou H, Davaris P, Kattamis C.  
**Tissue immunodetection of c100 hepatitis C virus antigen in major thalassemic patients.**  
*Hepatogastroenterology*. 1999 Jul-Aug;46(28):2515-20.
24. Doughty AL, Painter DM, McCaughan GW.  
**Nonspecificity of monoclonal antibody Tordji-22 for the detection of hepatitis C virus in liver transplant recipients with cholestatic hepatitis.**  
*Liver Transpl Surg*. 1999 Jan;5(1):40-5.
25. Brody RI, Eng S, Melamed J, Mizrachi H, Schneider RJ, Tobias H, Teperman LW, Theise ND.  
**Immunohistochemical detection of hepatitis C antigen by monoclonal antibody TORDJI-22 compared with PCR viral detection.**  
*Am J Clin Pathol*. 1998 Jul;110(1):32-7.
26. Shiha GE, Zalata KR, Abdalla AF, Mohamed MK.  
**Immunohistochemical identification of HCV target antigen in paraffin-embedded liver tissue: reproducibility and staining patterns.**  
*Liver Int*. 2005 Apr;25(2):254-60.
27. Frustaci A, Calabrese F, Chimenti C, Pieroni M, Thiene G, Maseri A.  
**Lone hepatitis C virus myocarditis responsive to immunosuppressive therapy.**  
*Chest*. 2002 Oct;122(4):1348-56.
28. Svoboda-Newman SM, Greenson JK, Singleton TP, Sun R, Frank TS.  
**Detection of hepatitis C by RT-PCR in formalin-fixed paraffin-embedded tissue from liver transplant patients.**  
*Diagn Mol Pathol*. 1997 Apr;6(2):123-9.
29. Komminoth P, Adams V, Long AA, Roth J, Saremaslani P, Flury R, Schmid M, Heitz PU.  
**Evaluation of methods for hepatitis C virus detection in archival liver biopsies. Comparison of histology, immunohistochemistry, in-situ hybridization, reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) and in-situ RT-PCR.**  
*Pathol Res Pract*. 1994 Nov;190(11):1017-25.
30. Walker FM, Dazza MC, Dauge MC, Boucher O, Bedel C, Henin D, Lehy T.  
**Detection and localization by in situ molecular biology techniques and immunohistochemistry of hepatitis C virus in livers of chronically infected patients.**  
*J Histochem Cytochem*. 1998 May;46(5):653-60.
31. Schiff ER, de Medina M, Kahn RS.  
**New perspectives in the diagnosis of hepatitis C.**  
*Semin Liver Dis*. 1999;19 Suppl 1:3-15.
32. Nepomnyashchikh GI, Aidagulova SV, Nepomnyashchikh DL, Tolokonskaya NP, Karavaeva YY, Sakharova EG, Mezentseva GA, Batemirova EV.  
**Immunohistochemical, molecular, and pathomorphological study of liver biopsy specimens during chronic hepatitis C.**  
*Bull Exp Biol Med*. 2002 Sep;134(3):307-11.

33. Kasprzak A, Biczysko W, Adamek A, Wysocki J, Zabel M, Jurczyszyn D, Chmielewski M, Surdyk-Zasada J.  
**Studies on tissue expression of HCV proteins (NS3 and C) in chronic hepatitis C using the ImmunoMax technique.**  
*Scand J Gastroenterol.* 2004 Apr;39(4):387-8.
34. Lake-Bakaar G, Sorbi D, Mazzoccoli V.  
**Nitric oxide and chronic HCV and HIV infections.**  
*Dig Dis Sci.* 2001 May;46(5):1072-6.
35. Verslype C, Nevens F, Sinelli N, Clarysse C, Pirenne J, Depla E, Maertens G, van Pelt J, Desmet V, Fevery J, Roskams T.  
**Hepatic immunohistochemical staining with a monoclonal antibody against HCV-E2 to evaluate antiviral therapy and reinfection of liver grafts in hepatitis C viral infection.**  
*J Hepatol.* 2003 Feb;38(2):208-14.
36. De Vos R, Verslype C, Depla E, Fevery J, Van Damme B, Desmet V, Roskams T.  
**Ultrastructural visualization of hepatitis C virus components in human and primate liver biopsies.**  
*J Hepatol.* 2002 Sep;37(3):370-9.
37. Galy O, Petit MA, Benjelloun S, Chevallier P, Chevallier M, Srivatanakul P, Karalak A, Carreira C, Lyandrat N, Essaid A, Trepo C, Hainaut P, Chemin I.  
**Efficient hepatitis C antigen immunohistological staining in sections of normal, cirrhotic and tumoral liver using a new monoclonal antibody directed against serum-derived HCV E2 glycoproteins.**  
*Cancer Lett.* 2007 Apr 8;248(1):81-8. Epub 2006 Aug 1.
38. Zhong YW, Cheng J, Wang G, Shi SS, Li L, Zhang LX, Chen JM.  
**Preparation of human single chain Fv antibody against hepatitis C virus E2 protein and its identification in immunohistochemistry.**  
*World J Gastroenterol.* 2002 Oct;8(5):863-7.
39. Malhotra V, Sakhuja P, Gondal R,  
**Immunohistochemistry in liver diseases**  
*J Gastroenterol.* 2004 Dec;19(7):364-70
40. Fenwick F, Bassendine MF, Agarwal K, Bevitt D, Pumeechockchai W, Burt AD, Toms GL.  
**Immunohistochemical assessment of hepatitis C virus antigen in cholestatic hepatitis after liver transplantation.**  
*J Clin Pathol.* 2006 Feb;59(2):174-8.
41. Guerrero RB, Batts KP, Brandhagen DJ, Germer JJ, Perez RG, Persing DH.  
**Effects of formalin fixation and prolonged block storage on detection of hepatitis C virus RNA in liver tissue.**  
*Diagn Mol Pathol.* 1997 Oct;6(5):277-81.

## VIII. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich sehr herzlich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Hansjörg Schäfer für die fachliche Unterstützung, die Überlassung des spannenden Themas und die kompetente Einweisung in die Welt der Pathologie bedanken.

Herrn PD Dr. rer. nat. Ronald Simon möchte ich ebenso gebührend danken, insbesondere für die kompetente Beratung bei der Konzeption des molekularbiologischen Teils dieser Arbeit und sein stets offenes Ohr.

Ein ganz besonderer Dank gilt der MTA Frau Agata Wewer. Durch Frau Wewers fachliche Unterstützung war es mir nach vielen anfänglichen Bemühungen erst möglich, die Versuchsreihen im Labor erfolgreich durchzuführen.

Herrn Dr. rer. nat. Olaf Hellwinkel und der MTA Frau Gaby Rieck danke ich ebenfalls sehr herzlich für fruchtbare Anmerkungen und Ideen.

## **IX. Lebenslauf**

## **X. Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: .....