

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

I. Medizinische Klinik und Poliklinik des Zentrums für Innere Medizin

Direktor: Prof. Dr. Ansgar W. Lohse

Eine Analyse der Rolle des angeborenen Immunsystems in Lebern chronisch Hepatitis B infizierter Patienten mit unterschiedlicher viraler Aktivität.

Dissertation

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

vorgelegt von:

Jan-Hendrik Bockmann
aus Oldenburg

Hamburg 2012

**Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg
am: 06.08.2012.**

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

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Jörg Petersen

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Hans Will

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: Prof. Dr. Gisa Tiegs

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	Seite 6
1.1 Epidemiologie	Seite 6
1.2 Therapie	Seite 6
1.3 Virologie	Seite 7
1.4 Der natürliche Krankheitsverlauf der chronischen HBV-Infektion	Seite 9
1.5 Das angeborene Immunsystem	Seite 10
1.5.1 Übersicht	Seite 10
1.5.2 TLR-Liganden	Seite 12
1.5.3 TLR-Signalweg	Seite 13
1.5.3.1 Übersicht	Seite 13
1.5.3.2 Der MYD88-Signalweg	Seite 14
1.5.3.3 Der TRIF-Signalweg	Seite 14
1.6 Interaktionsmechanismen zwischen Viren und TLR-Signalwegen	Seite 15
1.7 Das HBV im Kontext des angeborenen Immunsystems	Seite 16
1.8 Studienziel	Seite 19
2. Material und Methoden	Seite 21
2.1 Material	Seite 21
2.1.1 Substanzen	Seite 21
2.1.2 Werkstoffe und Geräte	Seite 24
2.2 Methoden	Seite 26
2.2.1 Herkunft, Lagerung und Auswahl- kriterien der Patientenbiopsien	Seite 26
2.2.2 Analyse von Patientenblutproben	Seite 27
2.2.3 Homogenisation der Biopsie	Seite 27
2.2.4 RNA-Extraktion	Seite 28
2.2.5 Reverse Transkription der RNA in cDNA	Seite 28

2.2.6	DNA-Extraktion	Seite 29
2.2.7	Plasmiderhaltender Verdau für eine ccc-DNA-spezifische RT-PCR- Messung	Seite 30
2.2.8	Messung von totaler HBV-DNA, ccc-DNA und β -Globin mit dem Lightcycler® 1.5	Seite 30
2.2.9	Sequenzierung der HBV-DNA	Seite 33
2.2.9.1	PCR 968-1974 Accu Prime	Seite 33
2.2.9.2	Geneclean Turbo for PCR	Seite 34
2.2.10	TLR Signaling Pathway PCR Array	Seite 34
2.2.11	Messung von TGF β und GAPDH mit dem Lightcycler	Seite 36
2.2.12	Das uPA-Mausmodell	Seite 37
2.2.12.1	Übersicht	Seite 37
2.2.12.2	Stimulation der TLR- Signalkaskade in uPA-Mäusen	Seite 38
2.2.12.3	Messung der TLR2- und TLR4- Expression in den humanen Hepatozyten chimärer Mäuse	Seite 39
3.	Ergebnisse	Seite 41
3.1	Patientencharakteristika	Seite 41
3.1.1	Alter, Geschlecht und HBeAg-Status	Seite 41
3.1.2	ALT-Werte	Seite 41
3.1.3	Serum-HBV-DNA	Seite 42
3.1.4	Serum-HBsAg	Seite 43
3.1.5	Leberhistologie	Seite 44
3.1.6	Virusgenotypologie	Seite 44
3.1.7	Intrahepatische HBV-Parameter	Seite 47
3.1.7.1	Intrahepatische rcDNA/ Zelle und cccDNA/Zelle	Seite 47
3.1.7.2	Replikative Aktivität	Seite 48

3.1.7.3	Virushalbwertszeit	Seite 49
3.2	Intrahepatische Expression des TLR-Signalweges und seiner Zytokine	Seite 50
3.2.1	Reproduzierbarkeit des RT-PCR-Array-Systems	Seite 50
3.2.2	Stabilität der Housekeepinggene	Seite 51
3.2.3	Expressionsprofil der Zytokine	Seite 51
3.2.4	Expressionsprofil der Toll-Like Rezeptoren	Seite 57
3.2.4.1	Überblick der Toll-like-Rezeptoren 1 bis 10	Seite 57
3.2.4.2	TLR2	Seite 59
3.2.4.3	TLR4	Seite 62
3.2.5	Intrazelluläre Signalkaskade des TLR-Signaltransduktionsweges	Seite 63
3.3	Das uPA-Mausmodell	Seite 68
3.3.1	Stimulation der TLR-Signalkaskade in uPA-Mäusen	Seite 68
3.3.2	Messung der TLR2- und TLR4-Expression in den humanen Hepatozyten chimärer Mäuse	Seite 69
4.	Diskussion	Seite 71
5.	Zusammenfassung	Seite 77
6.	Abkürzungsverzeichnis	Seite 79
7.	Literaturverzeichnis	Seite 82
8.	Danksagung	Seite 86
9.	Lebenslauf	Seite 87
10.	Eidesstattliche Erklärung	Seite 89

1. Einleitung

1.1 Epidemiologie:

Das der Familie der Hepadnaviridae (Hepatitis-assoziierte-DNA-Viren) zugehörige Hepatitis B Virus (HBV) kann beim Menschen sowohl eine akute als auch eine chronische (CHB) Infektion hervorrufen. Etwa 360 Millionen Menschen sind weltweit chronisch infiziert und ca. 600000 sterben jährlich an der Infektion. Ungefähr ein Drittel aller Leberzirrhosefälle und die Hälfte aller Fälle des hepatozellulären Karzinoms sind auf die CHB zurückzuführen (Shepard et al, 2006).

1.2 Therapie:

Zurzeit stehen zwei medikamentöse Therapiemöglichkeiten der CHB-Infektion zur Verfügung: Die immunmodulatorische (pegyliertes Interferon α) und die antivirale mit Reverse-Transkriptase-Inhibitoren, die sich in Nukleosid- (Lamivudin, Entecavir und Telbivudin) und Nukleotid- (Adefovir und Tenofovir) Analoga einteilen lassen. Die Interferontherapie führt nicht zu Resistenzen, ist zeitlich begrenzt und weist höhere HBeAg- und HBsAg-Serokonversionsraten auf, jedoch ist sie v.a. bei dekompensierter Leberzirrhose sowie bei Schwangerschaft und Stillzeit kontraindiziert. Reverse-Transkriptase-Inhibitoren sind potente antivirale Medikamente, können oral eingenommen werden und sind gut verträglich. Da sie die HBV-Polymerase inhibieren, werfen einige von ihnen das Problem der Resistenzentwicklung auf, die allerdings bei Entecavir und Tenofovir selten auftritt (EASL Clinical Practice Guidelines, 2009).

1.3 Virologie:

Das 42 nm große Hepatitis-B-Virion, welches elektronenmikroskopisch auch als Dane-Partikel beschrieben wurde, enthält das HBV-Kapsid, welches sich aus den C-Proteinen zusammensetzt (c=core), und die rc-HBV-DNA (rc=relaxed circular). Die partiell doppelsträngige rc-HBV-DNA setzt sich aus einem zirkulären, jedoch nicht vollständig geschlossenem Minusstrang, und einem dazu komplementären und kürzeren Plusstrang zusammen. Dieses kleinste virale Genom von ca. 3200 Basenpaaren ist durch 4 überlappende Leserahmen dicht gepackt, die für die 7 HBV-Proteine codieren und alle dieselbe poly-A-Sequenz benutzen (Seeger et al, 2000).

Das HBV-Kapsid wird von einer sphärischen Hülle aus einer Virusmembran und integralen Membranproteinen, den S-Proteinen (S=surface), umgeben, die ihrer Größe nach in S (s=small), M (m=middle) und L (l=large) unterteilt werden. Der Rahmen für die HBV-Hüllproteine codiert mit Startcodons in der preS1-Region, preS2-Region und S-Region für die L-, M- und S-Surface-Proteine. Durch die weiter 5`-gelegenen Startcodons werden das M- und L-Protein N-terminal erweitert. Das c-terminale Ende ist allen drei Proteinen gemeinsam und enthält die a-Determinante, gegen deren Epitop die Impfantwort auf rekombinant hergestellte Vakzinen hauptsächlich gerichtet ist. Hauptsächlich das S-Protein bildet sphärische und filamentöse subvirale Partikel, die nicht infektiös sind und im Vergleich zum Dane-Partikel mindestens um ein Hundertfaches mehr vom infizierten Hepatozyten sezerniert werden (Seeger et al, 2000).

Ein weiterer Leserahmen codiert mit einem Startcodon in der Precore-Region und einem in der Core-Region für das Precore-Protein bzw. das Core-Protein. Das Precore-Protein ist N-terminal um ein Signalpeptid erweitert, das dessen Synthese am ER bewirkt. Nach proteolytischer Prozessierung wird es über den Golgi-Apparat als HBeAg sezerniert. Dieses Antigen ist nicht essenziell für die HBV-Replikation, jedoch werden ihm tolerogene Eigenschaften zugeschrieben: Neben der Dysfunktion von T-Zell-Rezeptoren, die auf das HBcAg und das

HBeAg reagieren, wurden suppressive Effekte auf die Signalkaskade des angeborenen Immunsystems beobachtet, wie z.B. auf die Toll-like-Rezeptoren 2, 3 und 4 (siehe unten). Des Weiteren existiert ein Leserahmen für das regulatorische, nichtstrukturelle HB-X-Protein und einer für die HBV-Polymerase (Seeger et al, 2000).

Bei der Infektion eines Hepatozyten mit einem HBV-Virion wird das HBV-Kapsid intrazellulär freigesetzt und zum Zellkern transportiert. Ausschließlich im Nukleus des Hepatozyten wird die rc-HBV-DNA durch Verlängerung des Plusstranges sowie durch jeweilige Prozessierung und Ligation der Enden beider Stränge zu einer kovalent geschlossenen zirkulären DNA, der ccc-HBV-DNA (covalently closed circular DNA), repariert. In dieser stabilen Form fungiert sie als Matrize für die Transkription viraler mRNA durch die wirtseigene RNA-Polymerase II. Die viralen Ribonukleinsäuren lassen sich einteilen in subgenomische mRNAs, die in Surface- und X-Proteine translatiert werden, und in prägenomische mRNAs, die sowohl in virale Proteine wie die Kapsid-Proteine und die HBV-Polymerase translatiert als auch in HBV-DNA revers transkribiert werden. Nachdem die HBV-Polymerase mit der prägenomischen mRNA in ein Kapsid eingebaut wurde, transkribiert sie diese mRNA revers in den Minusstrang und synthetisiert dann den Plusstrang der neuen rc-HBV-DNA. Das HBV-Kapsid gelangt entweder zum Zellkern und dient auf diese Weise der Bildung eines neuen ccc-DNA-Moleküls oder es interagiert mit der L-Komponente der HBV-Surface-Proteine, integraler Membranproteine im Endoplasmatischen Retikulum. Durch Abknospung vom ER entsteht ein von allen 3 Hüllproteinen umgebener neuer infektiöser Viruspartikel, der über den Golgi-Apparat sezerniert wird und einen weiteren Hepatozyten infizieren kann (Seeger et al, 2000).

1.4 Der natürliche Krankheitsverlauf der chronischen HBV-Infektion:

Die erste Phase des natürlichen Krankheitsverlaufes einer chronischen HBV-Infektion ist die der Immuntoleranz. Sie tritt im Wesentlichen bei perinatal infizierten Kindern und jungen Erwachsenen auf und ist durch eine hohe HBV-Replikation bei gleichzeitig geringer hepatischer Inflammation sowie ALT-Werten im Normbereich gekennzeichnet. Die tolerogene Eigenschaft des HBeAg scheint hierbei eine Rolle zu spielen, von welchem vermutet wird, dass es im Thymus von Neugeborenen eine Dysfunktion von T-Zell-Rezeptoren bewirkt, die auf das HBcAg und das HBeAg reagieren (Vierling et al, 2007; McMahon et al, 2009).

Die Phase der immunaktiven HBeAg-positiven chronischen HBV-Infektion geht mit gleichzeitig hoher HBV-Virämie und aktiver hepatischer Inflammation bei erhöhten ALT-Werten einher, der Grad an Leberfibrose kann hierbei unterschiedlich ausgeprägt sein (Vierling et al, 2007; McMahon et al, 2009).

Die HBeAg-Serokonversion kann durch eine antivirale Therapie oder spontan erfolgen. Durch immunologische Kontrolle des Wildtyp-HBV sowie durch Prädominanz von HBV-Varianten, die das HBe-Ag aufgrund von Mutationen im precore-Gen nicht mehr exprimieren, geht die HBV-Infektion in die HBeAg-negative Phase über, in der das HBeAg im Serum nicht mehr detektierbar ist und anti-HBe-Antikörper messbar sind (Vierling et al, 2007; McMahon et al, 2009).

HBe-Ag-negative Patienten zeigen eine signifikant niedrigere HBV-Virämie als HBe-Ag-positive Patienten. Auch die intrahepatische Viruslast (rc-HBV-DNA/Leberzelle) ist unter HBe-Ag-negativen Patienten niedriger als unter positiven und korreliert signifikant mit der Virämie. Der verminderten intrahepatischen Viruslast HBeAg-negativer Patienten liegt neben einer verminderten Anzahl an ccc-DNA-Molekülen und damit weniger Matrizen pro Zelle eine verminderte

replikative Aktivität zugrunde, d.h. die Bildung neuer rc-DNA-Moleküle pro ccc-DNA-Matrize ist in den Hepatozyten dieser Patienten ebenfalls signifikant niedriger (Volz et al, 2007). Parallel zur replikativen Aktivität ist auch die transkriptionelle Aktivität (pg-HBV-RNA/ ccc-HBV-DNA) in den Hepatozyten HBe-Ag-negativer Patienten erniedrigt und korreliert mit der ersten, sodass ein möglicher Regulationsmechanismus für die unterschiedliche replikative Aktivität zwischen HBe-Ag-negativen und –positiven Patienten bereits vor der reversen Transkription des Virus ansetzt (Volz et al, 2007). Es konnte bisher nicht gezeigt werden, dass Mutationen, die in Virusvarianten HBeAg-negativer Patienten häufiger vorkommen, ihre niedrigere replikative Aktivität erklären. Nach T. Volz et al. korrelieren Mutationen in der Precore- und Basalcore-Promotor-Regionen, auf deren Einfluss auf die replikative Aktivität in in-vitro-Studien hingewiesen wurde, nicht mit einer verminderten replikativen Aktivität (Volz et al, 2007).

Die Phase der klinischen Ausheilung der chronischen HBV-Infektion ist gekennzeichnet durch die HBsAg-Serokonversion. Jedoch kann bei einigen der Patienten noch HBV-DNA in Serum und Leber gefunden werden und es besteht weiterhin das Risiko eines HCC (McMahon et al, 2009).

1.5 Das angeborene Immunsystem

1.5.1 Übersicht

In Säugetieren wird zwischen einem angeborenen und einem adaptiven Immunsystem unterschieden. Das adaptive Immunsystem erkennt Peptidantigene über Immunglobulin- und T-Zellrezeptoren auf B- und T-Zellen. Durch eine Rekombination der Rezeptorgensegmente entstehen über 10^{11} verschiedene hochspezifische Rezeptoren, die in ihrer Gesamtheit eine hohe Diversität an potentiellen Peptidantigenen erkennen können. Ihre Aktivierung

durch ein kognates Antigen führt im Zusammenspiel mit kostimulatorischen Signalen zu einer klonalen Expansion des Lymphozyten und resultiert in einer zellulären Immunantwort bzw. der Produktion von Immunglobulinen. CD4-T-Zellen differenzieren sich zu verschiedenen Subtypen wie T-Helfer-1- (TH1-) Zellen, T-Helfer-2- (TH2-) Zellen oder regulatorischen T-Zellen. TH1- und TH2-Zellen sezernieren Zytokine, die die Proliferation und Sekretion des jeweils anderen Subtyps inhibieren. Bei Th1-Prädominanz werden vorrangig Interferon γ (IFN γ), Tumornekrosefaktor α/β (TNF α/β) und Interleukin 6 (IL-6) sezerniert, bei TH-2 Prädominanz IL-4, IL-5 und IL-10. Das erstgenannte Zytokinmilieu ist mit der Proliferation, Differenzierung und Reifung von CD8-zytotoxischen-T-Lymphozyten (CTLs) assoziiert, das zweite mit verstärkter Produktion von Antikörpern durch B-Lymphozyten (Vierling et al, 2007; Delves et al, 2000; Takeda et al, 2003).

Im Gegensatz zum adaptiven erkennt das angeborene Immunsystem sogenannte PAMPs (= pathogen-associated molecular patterns), stereotype Strukturen pathogener Mikroorganismen, die über Peptide hinaus auch Nukleinsäuren, Kohlenhydrate und Lipide umfassen. Die Rezeptoren der PAMPs sind die PRRs (pattern-recognition receptors), deren Aktivierung die Synthese von Typ1-Interferonen und inflammatorischen Zytokinen induziert. Auf diese Weise ergänzt und verstärkt das angeborene das adaptive Immunsystem durch direkte antimikrobielle Effekte und die Schaffung bestimmter Zytokinmilieus (Vierling et al, 2007; Takeda et al, 2003; Kawai et al, 2008).

Die Erkennung von Viren durch PRRs ist für die Familie der Toll-like receptors (TLRs) und die der RIG-I-like receptors (RIG-I = retinoic-acid-inducible gene I) genauer beschrieben. Insgesamt sind 10 funktionell bedeutsame humane TLRs bekannt. Der Name TLR geht auf den strukturverwandten Toll receptor in *Drosophila* zurück, als dessen Funktion neben der dorso-ventralen Polarisierung in der embryonalen Entwicklung schließlich die Abwehr von Pilzinfektionen erkannt wurde. Die TLRs 3, 7 und 9 sind in der Membran von Endosomen lokalisiert und erkennen Nukleinsäuren, während TLR 1,2,4 und 6

auf der Zelloberfläche lokalisiert sind und Zellwandbestandteile oder virale Partikel erkennen (Takeda et al, 2003; Kawai et al, 2008).

1.5.2 TLR-Liganden

Die Liganden des TLR2 umfassen zahlreiche bakterielle Zellwandbestandteile sowie Zymosan aus Pilzen. Für die Aktivierung durch das diacetylierte Lipopeptid MALP-2 ist eine Assoziation mit TLR6 essenziell. Eine Aktivierung des TLR2 durch verschiedene triacetylierte Lipopeptide ist in Abwesenheit des TLR1 vermindert, in einigen Fällen kann jedoch der TLR6 aufgrund hoher Homologie zu TLR1 in der Aminosäuresequenz die Funktion übernehmen. Das Hämagglutininprotein des Masernvirus ist ein viraler Aktivator des TLR2-Signalweges (Takeda et al, 2003; Akira et al, 2006).

Der klassische Ligand des TLR4 ist das Lipopolysaccharid (LPS), ein Zellwandbestandteil gramnegativer Bakterien. Im Serum bildet LPS mit dem LPS-binding protein (LBP) einen Komplex und bindet auf der Zelloberfläche z.B. eines Monozyten an CD14. Dadurch gelangt LPS in die Nähe von TLR4 und kann diesen aktivieren. Für die Oberflächenexpression von TLR4 ist die Assoziation des Rezeptors mit MD2 essentiell. Inhibiert wird der TLR4-MD2-Komplex auf der Zelloberfläche von einem Komplex aus dem Transmembranprotein RP105 und dem extrazellulär assoziierten MD-1, welches für die Oberflächenexpression von RP105 ebenfalls essentiell ist. Neben LPS wurden virale Proteine wie das Fusionsprotein vom RSV, Hüllproteine vom MMTV und cHSP60 von *Chlamydia pneumoniae* als Liganden des TLR4 identifiziert. In wesentlich höheren Konzentrationen als LPS können auch endogene Bestandteile der extrazellulären Matrix den Rezeptor aktivieren (Takeda et al, 2003; Divanovic et al, 2005; Miyake et al, 2004). Der TLR5 erkennt Flagellin, die Proteinkomponente bakterieller Flagellen (Takeda et al, 2003).

Sowohl dsRna z.B. von Reoviren oder das synthetische poly(I:C) als auch Replikationsintermediate der ssRNA-Viren RSV, EMCV (encephalomyocarditis virus) und WNV (West Nile virus) aktivieren den TLR3. ssRNA vom HIV und Influenza Virus hingegen sind Liganden des TLR7. Der TLR9 erkennt virale unmethylierte 2`-deoxyribo (Cytidin-Phosphat-Guanosin) (CpG)-DNA, z.B. des Herpes simplex Virus 2. TLR 7 und 9 werden selektiv von plasmazytoiden dendritischen Zellen expremiert, welche in der Lage sind, schnell große Mengen an TypI IFNs als Immunantwort auf die Viren zu synthetisieren (Kawai et al, 2008; Bowie et al, 2008).

1.5.3 TLR-Signalweg

1.5.3.1 Übersicht

Die Aktivierung eines TLR durch seinen Liganden resultiert in der Induktion von inflammatorischen Zytokinen und TypI Interferonen über eine intrazelluläre Signalkaskade, an deren Ende die Phosphorylierung von 3 verschiedenen Familien von Transkriptionfaktoren steht:

- 1) Zu der **NF-κB** (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells)-Familie gehören RelA (p65), RelB, C-Rel, NF-κB1 (p105) und NF-κB2 (p100).
- 2) Activating Transcription Factor 2 (ATF2)/ c-Jun/ FOS als Komponenten von **AP1**.
- 3) Interferon Regulatory Factors (**IRFs**) werden hauptsächlich durch Viren aktiviert und induzieren spezifisch Typ I IFNs.

Ein humaner TLR enthält eine extrazelluläre LRR (Leucin-rich repeats)-Domäne und eine intrazelluläre TIR (Toll/ IL-1 receptor)-Domäne, über die er bei seiner

Aktivierung Adaptermoleküle mit ebenfalls TIR-Domänen rekrutiert. Nach ihren initialen Adaptermolekülen werden zwei verschiedene Signalwege unterschieden: TLR2 , TLR5, TLR7 und TLR9 rekrutieren MYD88 (myeloid differentiation primary-response gene 88), während TLR3 TRIF (TIR-domain-containing adaptor inducing IFN β) bindet. TLR4 kann beide Signalwege aktivieren, benötigt für einen funktionierenden MYD88-Signalweg ebenso wie der TLR2 die zusätzliche Rekrutierung von MAL (MYD88-adaptor-like) und für den TRIF-Signalweg das zusätzliche Adaptermolekül TRAM (TRIF-related adaptor molecule) (Kawai et al, 2008; Kawai et al, 2007; Shaulian et al, 2002).

1.5.3.2 Der MYD88-Signalweg:

MYD88 enthält neben der TIR-Domäne eine death-Domäne, über die es Mitglieder der IRAK (IL-1 receptor associated kinase)-Familie rekrutiert. Zuerst wird IRAK4 aktiviert, welche wiederum IRAK 1 und 2 aktiviert. Der IRAK-Komplex dissoziiert daraufhin von MYD88 ab und interagiert mit TRAF6 (TNF receptor associated factor 6). TRAF6 katalysiert im Komplex mit Ubc13 und Uev1 A die eigene Polyubiquitinierung und rekrutiert einen Komplex aus TAK1 (TGF- β -activated kinase 1) und TAK1-binding proteins (TAB1-3). Die von TRAF6 aktivierte TAK1 phosphoryliert den IKK-Komplex (IkB kinase α - γ) oder MAP-Kinasen. Der IKK-Komplex phosphoryliert IkB, welches daraufhin degradiert und so die Translokation von NF- κ B in den Nukleus erlaubt. Die Phosphorylierung von MAP-Kinasen hingegen resultiert in der Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 (Kawai et al, 2008; Kawai et al, 2007).

1.5.3.3 Der TRIF-Signalweg:

Das Adaptermolekül TRIF bindet n-terminal TRAF6, welcher wiederum polyubiquitiniert wird und TAK1 im Komplex mit TABs bindet und aktiviert. Der weitere Signalweg führt dann ebenfalls zur NF- κ B-Aktivierung. Ein alternativer

Weg hierzu ist die Bindung von RIP1 an eine c-terminale Region von TRIF mit folgender TRAF6- und TAK1-Rekrutierung. Die Assoziation von TRAF3 mit TBK1 und TRIF führt zur Aktivierung von IRF3 mit anschließender Induktion von IFN β (Kawai et al, 2008).

1.6 Interaktionsmechanismen zwischen Viren und TLR-Signalwegen:

Als die sich am schnellsten entwickelnden pathogenen Mikroorganismen, mit denen das angeborene humane Immunsystem konfrontiert ist, haben Viren Strategien entwickelt, um die Immunantwort zu ihren Gunsten zu manipulieren. Eine feine Modulation der Wirtsabwehrmechanismen kann hierbei neben der Suppression auch die parallele Aktivierung von Signalkaskaden beinhalten, um ein optimales Zytokinmilieu für die Virusreplikation zu schaffen (Bowie et al, 2008).

Das Protein A46R des VACV (Vaccinia Virus) bindet die TIR-Domänen enthaltenden Adaptermoleküle MYD88 und TRIF und inhibiert dadurch die Aktivierung von NF- κ B und IRFs. Die Deletion des für A46R kodierenden Gens führt zu einem attenuierten Virus (Stack et al, 2005). A52R, ein Protein desselben Virus, inhibiert den NF- κ B-Signalweg, indem es IRAK2 bindet (Harte et al, 2003). Die Interaktion mit TRAF6 führt über die MAPK p38 zu einer vermehrten TLR-induzierten IL10-Produktion (Maloney et al, 2005). IL10 hat unter anderem einen suppressiven Einfluss auf die TH1-Immunantwort. Durch die Betonung des MAPK-IL10-Signalweges und die gleichzeitige Unterdrückung des NF- κ B-Signalweges könnte das VACV somit ein Zytokinmilieu herstellen, welches seine Virulenz begünstigt (Maloney et al, 2005).

Die Funktion des NS1 (non-structural protein 1) des WNV besteht in der Verhinderung der TLR3-abhängigen Translokation von IRF3 und NF- κ B in den Nukleus sowie in der Inhibition der TLR3-abhängigen Induktion von IL6 (Wilson et al, 2008). Der TLR3-Signalweg scheint jedoch auch zur Virulenz des Virus in Mäusen beizutragen, indem er Zytokine induziert, die die Blut-Hirn-Schranke herabsetzen und so sein Eindringen in das Gehirn ermöglichen (Wang et al, 2004).

NS3-4A ist ein Protein des Hepatitis-C-Virus (HCV) mit einer Serin-Protease-Aktivität. Neben verschiedenen anderen immunsuppressiven Funktionen ist es fähig TRIF proteolytisch zu spalten und dadurch die Aktivierung der NF- κ B- und IRF3-Signalkaskade durch poly(I:C) zu unterdrücken (Li et al, 2005). NS5A hingegen inhibiert den TLR-Signalweg, indem es MYD88 bindet und dadurch die Rekrutierung von IRAK1 verhindert (Abe et al, 2007).

Im Gegensatz zu den oben geschilderten Proteininteraktionen inhibiert das virale Protein p30 des HTLV (human T-cell leukaemia virus type 1) den TLR4-Signalweg auf transkriptioneller Ebene, indem es den Transkriptionsfaktor PU.1 bindet, welcher für die Expression von TLR4 benötigt wird (Datta et al, 2006).

1.7 Das HBV im Kontext des angeborenen Immunsystems

Studien über die Interaktion zwischen dem HBV und dem Immunsystem sind gekennzeichnet durch verschiedene Tiermodelle und eine kontroverse Datenlage. Über die Immunantwort während der frühen Inkubation des Virus in Menschen ist bis auf einzelne Fallvorstellungen wenig bekannt: Webster et al berichten von Patienten, bei denen bereits vor dem Auftreten von HBV-spezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten (CTLs) in der Leber und vor steigenden ALT-Werten die HBV-DNA im Serum deutlich absinkt, begleitet von einem vermehrten intrahepatischen Auftreten von NK-Zellen (natürliche Killer-

Zellen) als Teil des HBV-unspezifischen angeborenen Immunsystems. Es wurde daher vermutet, dass während der akuten HBV-Infektion die nichtzytolytische Immunantwort eine entscheidende Rolle spielt und die zytotoxische Immunantwort alleine nicht für eine schnelle Viruselimination während der akuten HBV-Infektion ausreichend ist (Webster et al, 2000).

Gestützt wird diese Hypothese durch Experimente mit dem transgenen HBV-Mausmodell, in welchem CTLs die Virusreplikation durch die Synthese von IFN γ etwa 10- bis 100-fach effizienter als durch Zytolyse der infizierten Hepatozyten supprimieren (Wieland et al, 2005). Außerdem wurde mit diesem Mausmodell gezeigt, dass durch aktivierte antigenpräsentierende Zellen bzw. TLR-Signalkaskaden induzierte nichtzytolytische Zytokine die HBV-Replikation ebenfalls inhibieren können (Kimura et al, 2002a; Kimura et al, 2002b; Isogawa et al, 2005).

In Schimpansen konnten jedoch während der frühen HBV-Infektionsphase keine Veränderungen der Genexpression von Hepatozyten im Sinne einer Aktivierung einer nichtzytolytischen Immunantwort beobachtet werden, einschließlich der Expression von Typ I und II Interferonen sowie der TLR-Signalkaskade. Es wurde daher vermutet, dass sich das HBV als sogenanntes „stealth-virus“ möglicherweise einer nichtzytolytischen Immunantwort entzieht (Wieland et al, 2004).

Im Gegensatz zu den Ergebnissen des Fallberichtes und der infizierten Schimpansen steht die Viruselimination des WHV in akut infizierten Murmeltieren: Hier ist die Viruselimination eng mit einer suffizienten zytotoxischen zellulären Antwort des adaptiven Immunsystems assoziiert. Sowohl in neonatal als auch in adult infizierten Murmeltieren geht die akute WHV-Infektion in den Tieren, die prospektiv eine chronische Infektion entwickeln, mit einer Toleranz von PBMCs gegenüber dem WHcAg, mit einer verminderten intrahepatischen Expression der TNF α und IFN γ sowie mit

verminderter Leberinflammation und Apoptose gegenüber den Tieren mit ausheilender akuter Infektion einher (Menne et al, 2007).

Über die Hypothese des „stealth virus“ hinausgehend manifestiert sich in der jüngeren Literatur die Hypothese einer Suppression des angeborenen Immunsystems durch das Hepatitis B Virus. Es konnte bisher gezeigt werden, dass einerseits die Stimulation von TLRs durch ihre spezifischen Liganden die HBV-Replikation supprimieren kann und dass andererseits virale Komponenten die TLR-Signalkaskade inhibieren können. Wu et al. zeigten, dass sowohl die Stimulation muriner Hepatozyten als auch die muriner nichtparenchymaler Zellen (NPZ) wie Kupffer-Zellen (KCs), LSECs oder plasmacytoide dendritische Zellen (pDC) mit TLR3- oder TLR4-Liganden in-vitro in Abhängigkeit vom Zelltyp Zytokine induziert, die die HBV-Replikation in HBV-Met-Zellen supprimieren können (Wu et al, 2007). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Inkubation von Hepatozyten oder NPZ mit HBeAg, HBsAg oder HBV-Virionen vor der Stimulation mit TLR-Liganden die Bildung einer antiviralen Zytokinantwort dieser Zellen inhibiert. Hierbei wurde eine supprimierte Aktivierung von NF- κ B, ERK (extracellular signal-regulated kinase) und IRF3 und damit eine Unterdrückung von 3 wesentlichen TLR-Signalwegen beobachtet (Wu et al, 2009).

Ein suppressiver Effekt des HBeAg wurde außerdem von Visvanathan et al. beschrieben. Ihnen zufolge ist in-vitro die TLR2-abhängige Zytokininduktion in PBMCs aus dem Blut HBeAg-positiver hochvirämischer Patienten gegenüber der HBeAg-negativer niedrigvirämischer Patienten erniedrigt. Die schwächere Zytokinantwort der Zellen HBeAg-positiver Patienten geht mit einer niedrigeren TLR2-Oberflächenexpression auf Kupffer-Zellen, Hepatozyten und PBMCs dieser Patienten gegenüber Kontrollen einher, während die Oberflächenexpression auf den gleichen Zellen HBeAg-negativer Patienten gegenüber Kontrollen erhöht ist. Des Weiteren wurde in-vitro gezeigt, dass die Anwesenheit des HBeAg, nicht jedoch die des HBcAg, die Stimulation des

TLR2-Signalweges in PBMCs gegenüber Kontrollen herabsetzt (Visvanathan et al, 2007).

Die Daten von Chen et al. suggerieren einen suppressiven Effekt des HBsAg auf das TLR-System, da die Induktion von Zytokinen durch die Stimulation von PBMCs aus CHB-Patientenblut mit TLR-Liganden negativ mit dem Serum-HBsAg der Patienten korreliert. Sie beobachteten eine verminderte mRNA-Expression der TLRs 1,2,4 und 6 in PBMCs von CHB-Patienten gegenüber gesunden Kontrollen. Im Gegensatz zu Visvanathan et al. sahen sie keine Korrelation zwischen TLR2-Expression und Serum-HBeAg oder anderen viralen Faktoren wie HBsAg oder Viruslast, sodass in dieser Studie die TLR-Expression selber keine mögliche Erklärung für einen immunsuppressiven Effekt des HBsAg oder HBeAg liefert. Sie wiesen auf die Abhängigkeit der TLR2-Expression in PBMCs vom HBV-Genotyp hin: PBMCs aus Patienten mit prädominantem HBV-Genotyp C exprimieren diesen TLR niedriger als solche aus Patienten mit dem Genotyp B (Chen et al, 2008).

1.8 Studienziel

Ziel dieser Studie war es, die Expression der gesamten TLR-Signalkaskade in HBV-infizierten Lebergewebe in vivo zu untersuchen. Hierzu wurden Leberbiopsien aus HBeAg-positiven Patienten, HBeAg-negativen Patienten und gesunde Lebern als Kontrollen herangezogen. Die HBeAg-positiven Patienten unterscheiden sich von den HBeAg-negativen durch eine höhere Virämie und eine höhere replikative Aktivität. Die Expression der TLR-Signalkaskade wurde zwischen den drei Gruppen verglichen, um Hinweise auf eine mögliche Interaktion zwischen dem HBV und Teilen der TLR-Signalkaskade zu erhalten.

Darüber hinaus wurde die Expression einiger TLR zwischen HBV-infizierten und nicht-HBV-infizierten chimären Mäusen in vivo verglichen, um die Ergebnisse

der Patientenbiopsien weiter zu überprüfen, denn in diesem Modell ist eine feinere Unterscheidung zwischen der Expression der TLR in humanen Hepatozyten und nichtparenchymalen Zellen möglich.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Substanzen

- Aqua bidest/deion
 - Laboreigene Aufbereitungsanlage
- Ultra pure distilled water, DNase-/RNase-free
 - GIBCO
- H₂O sterile, PCR grade, Light Cycler control kit
 - Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
- Ethanol absolute
 - J.T.Baker
- Isopropanol
- RNeasy mini kit
 - Quiagen
- MasterPure Complete DNA&RNA Purification Set
 - Epicentre, Madison,WI,USA über Biozym,Deutschland
- Plasmid-Safe™ ATP-dependant DNase (1000 U/μl)
 - Epicentre, Madison, WI, USA über Biozym, Deutschland
- GeneClean® Turbo for PCR
 - MP Biomedicals, LLC, Solon, Ohio, USA

- Quant-iT™ RNA BR, Molecular Probes™
 - invitrogen™, Eugene, Oregon, USA
- Quant-iT™ ds DNA BR, Molecular Probes™
 - invitrogen™, Eugene, Oregon, USA
- Quant-iT™ ds DNA HS, Molecular Probes™
 - invitrogen™, Eugene, Oregon, USA
- Transcriptor First Strand DNA Synthesis Kit
 - Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
- Light Cycler Fast Start DNA Master HybProbe
 - Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
- Light Cycler Fast Start DNA Master SYBR Green I
 - Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
- Light Cycler DNA Control Kit
 - Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
- Human Toll-like Receptor Signaling Pathway PCR Array, PAHS-018
 - SuperArray, Bioscience Corporation, Frederick, USA
- RT² SYBR Green/ ROX qPCR Master Mix, PA-012
 - SuperArray, Bioscience Corporation, Frederick, USA
- QuantiFast™ SYBR® Green PCR Kit
 - Qiagen

- QuantiTect® Primer Assay, TGFβ1, Cat.No.QT00000728
 - Quiagen

- QuantiTect® Primer Assay, GAPDH, Cat.No.QT00079247
 - Quiagen

- HBV Plasmid pHBVEcoR1
 - Zur Verfügung gestellt von William E. Delaney, Fa. Gilead Sc., Foster City, USA

- HBV-Sonden
 - Totale HBV-DNA
 - HBVRC/ccL: LC-Red640-tgt cct ggt tat cgc tgg atg tgt ct-PH
 - HBVRC/ccFL: cac tca cca acc tcc tgt cct cca a-FL

 - HBV-ccc-DNA
 - HBVcccLC: LC-Red640-agg tga agc gaa gtg cac acg gac c-PH
 - HBVcccFL: gtt cac ggt ggt ctc cat gca acg t-FL

- HBV-Primer
 - Totale HBV-DNA
 - HBVccs : ctc gtg gtg gac ttc tct c
 - HBVccAS: cag cag gat gaa gag gaa

 - HBV-ccc-DNA
 - HBVnccc: ctc ccc gtc tgt gcc ttc t
 - HBVcccAS: gcc cca aag cca ccc aag

- Humanspezifische Primer
 - TLR2
 - Forward: GGCGTTCTCTCAGGTGACTGCTCG
 - Reverse: GAAAGCAGTGAAAGAGCAATGGGCACAA

- TLR4
Forward: AATATGACCACAGTCAGAAGTGTTTGTAC
Reverse: GGGATGTTCAATCACCTAGACCT
- IL6
Forward: GTACCTCCAGAACAGATTTGAGAGTAGTG
Reverse: GTTGGGTCAGGGGTGGTTATTGC
- TNF α
Forward: TGCCCTGTGAGGAGGACGAA
Reverse: CGAAGTGGTGGTGGTCTTGTTC

2.1.2 Werkstoffe und Geräte

- Safe-Lock Tubes 1,5ml/ 2ml
 - Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
- Reaktionsgefäße PP natur, 0,2ml, für die PCR
 - Nerbe plus, Winsen/ Luhe, Deutschland
- Pipettierhilfen „pipetman“ (2 μ l, 10 μ l, 20 μ l, 100 μ l, 200 μ l, 1000 μ l)
- Pipettenspitzen oberflächenoptimiert (10 μ l, 20 μ l, 100 μ l, 200 μ l, 1000 μ l)
 - Nerbe plus, Winsen/ Luhe, Deutschland
- Multipette® stream
 - Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
- Combitips 1ml
 - Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

- QuBit™ Fluorometer
 - invitrogen™

- QuBit™ assay tubes, set of 500, Molecular Probes™
 - invitrogen™

- Potter, Wheaton Dounce Tissue grinder tight
 - Wheaton Science Products, Miville, USA

- Thermomixer compact
 - Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

- Tischzentrifuge – Centrifuge 5415R
 - Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

- Tischzentrifuge – Centrifuge 5417C
 - Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

- iCycler
 - BioRad

- Light Cycler Capillaries (20µl)
 - Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland

- Kühlblock Light Cycler Centrifuge Adapters
 - Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland

- Light Cycler Instrument 1.5
 - Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland

- Light Cycler Software 3.5
 - Diagnostics, Mannheim, Deutschland

- ABI PRISM 7000, 96-well RT-PCR Gerät

2.2 Methoden

2.2.1 Herkunft, Lagerung und Auswahlkriterien der Patientenbiopsien

In dieser Studie wurden Leberbiopsien verwendet, die indikationsgerecht chronisch infizierten Hepatitis B Patienten der Universitätsklinik Hamburg Eppendorf als Stanzbiopsie zur histologischen Beurteilung von Inflammation und Fibrose entnommen worden waren. Im Rahmen des genehmigten Ethikkommissionsantrages OB-042/06 konnte den Patientenbiopsien mit dem Einverständnis des jeweiligen Patienten ein Teil für wissenschaftliche Zwecke entnommen und in flüssigem Stickstoff bei -80°C eingefroren werden. Insgesamt wurden für diese Arbeit Patientenbiopsien von 17 chronisch infizierten Hepatitis B Patienten sowie Gewebe aus 4 nicht mit HBV infizierten Lebern, die zur Transplantation bestimmt waren, herangezogen. Als Auswahlkriterien der Patienten galten ein seit mindestens 6 Monaten positiver HBs-Ag-Status, Therapienaivität und die Abwesenheit von BCP-Mutationen sowie positiven serologischen Markern für andere Leberinfektionen oder HIV. Die Patientenbiopsien wurden pseudonomisiert, indem ihnen jeweils eine Nummer zugeordnet wurde.

2.2.2 Analyse von Patientenblutproben

Blutproben der 17 chronisch Hepatitis B (CHB) infizierten Patienten wurden bei entsprechender klinischer Indikation im Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf gesammelt. Die folgenden Laborwerte wurden hierbei vom Institut für medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf erhoben. Es handelt sich um die ALT-Werte (sequentieller multipler Analysierer), das HBeAntigen bzw. die anti-HBeAg-Antikörper (ELISA), die qualitative (Axsym™ System) und quantitative (Elektroimmundiffusionsassay, Laurell-Methode) Bestimmung des HBsAg sowie die Serum-HBV-DNA (Realtime-PCR mit einer unteren Detektionsgrenze von 100 HBV-Genomen/ ml). Die genannten Daten wurden retrospektiv den entsprechenden Patientenakten entnommen.

2.2.3 Homogenisation der Biopsie

Zunächst wurden 420µl RLT-Buffer aus dem RNeasy mini kit in einen Potter auf Eis vorgelegt. Die -80°C kalte Biopsie wurde möglichst schnell in den Buffer eingetaucht und dann mit einem tight-Potter homogenisiert, der in Kombination mit dem Buffer sowohl die Zellmembran als auch die Kernmembran zerstört und so die Nukleinsäuren freisetzt. Diesem Homogenisat wurden je 200µl für die RNA und DNA-Extraktion entnommen. Während des einstündigen Proteinase-k-Verdau der DNA konnte dann zuerst die empfindlichere RNA extrahiert werden.

Dieses Protokoll ermöglicht die simultane quantitative Analyse von DNA und RNA von sowohl Wirt als auch Virus. Es wurde einschließlich der anschließenden PCR-Analyse von totaler und ccc-HBV-DNA von Volz et al. etabliert (Volz et al, 2007).

2.2.4 RNA-Extraktion

Die RNA wurde mit dem RNeasy mini kit (Quiagen) aus 200µl Homogenisat extrahiert. Nach Zugabe von 150µl RLT-Buffer, 3,5µl β-Mercapto-Purin als RNase-Inhibitor und 350µl 70% Ethanol wurde die Probe auf eine Extraktionssäule pipettiert und 15 Sekunden bei 11000 rpm zentrifugiert und nach Verwerfung des Unterstandes und Zugabe von 350µl RWI-Buffer unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Die RNA wurde dann nach Verwerfung des Unterstandes in der Säule 15 Minuten mit 10 µl DNase und 70 µl RDD-Buffer inkubiert und ein zweites Mal in gleicher Weise mit RWI-Buffer gereinigt. Es folgten zwei Reinigungsschritte mit jeweiliger Zugabe von 500µl RPE-Buffer, Zentrifugation bei 11000 rpm sowie Verwerfung des Unterstandes, mit 15 Sekunden Zentrifugation im ersten Schritt und 2 Minuten im zweiten. Danach wurde die Säule in ein neues Tube gesetzt, eine Minute mit 50µl H₂O inkubiert und eine Minute bei 11000 rpm zentrifugiert. Inkubation und Zentrifugation wurden wiederholt und die 100µl RNA-Eluat in ein neues Tube pipettiert. Die RNA-Konzentration wurde mit dem Quant-iT™ RNA BR-Assay (invitrogen™, Eugene, Oregon, USA) bestimmt. Zur Fällung der RNA wurde zu einem 500ng RNA enthaltenen Volumen zuerst ein µg Glycogen hinzugefügt. Zu diesem Volumen wurde 10% Volumen an 5M Ammoniumacetatlösung addiert und zu dem neuen Volumen wiederum ein 2,5-faches Volumen an 100% Ethanol. Die Probe wurde über Nacht bei -20°C gelagert. Am nächsten Tag wurde sie 15 min bei 4°C und 14000 rpm zentrifugiert und der Überstand wurde entfernt. Das RNA-pellet wurde einmal mit 75% Ethanol gewaschen und nach vollständiger Entfernung des Ethanols in 12µl H₂O gelöst.

2.2.5 Reverse Transkription der RNA in cDNA

Die 500ng RNA wurden mit dem Transcriptor First Strand DNA Synthesis Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) in cDNA umgeschrieben. Den

12µl RNA-Lösung wurden in einem PCR-Tube zusammen mit einem µl oligo-dt-Primer bei 65°C für 10 Minuten im iCycler (BioRad) inkubiert. Darauf wurde folgender Mastermix hinzugefügt:

- 4µl Reverse Transcription Buffer
- 2µl dNTPs
- 0,5µl RNase-Inhibitor
- 0,5µl Reverse Transcriptase

Die Probe wurde im iCycler für 30 Minuten bei 60°C und dann 5 Minuten bei 85°C inkubiert.

Bis zur Analyse wurden die cDNA-Proben bei -80°C gelagert.

2.2.6 DNA-Extraktion

Die DNA wurde mit dem MasterPure complete DNA purification kit (Epicentre, Biozym, Deutschland) aus den 200µl Homogenisat extrahiert. Um den pH-Wert für den folgenden Verdau zu optimieren, wurden 10µl 1M Tris pH 8 zu den 200µl hinzugegeben. Mit zusätzlich einem µl Proteinase K wurde die Probe dann bei 65°C eine Stunde im Thermomixer compact inkubiert. Nachdem diese dann auf Raumtemperatur heruntergekühlt war, wurde sie mit RNaseA eine halbe Stunde lang bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde sie auf Eis gestellt. Nach der Zugabe von 400µl TC-Buffer und 300µl MPC-Buffer wurde sie 10 Sekunden lang gevortext. Die Probe wurde 10 min bei 4°C und 14000 rpm zentrifugiert und anschließend wurde der klare Überstand vorsichtig in ein neues Tube pipettiert. Dem Überstand wurden 1000µl Isopropanol hinzugefügt und nach mehrmaligem Drehen wiederum 10 min bei 4°C und 14000 rpm zentrifugiert. Nach Entfernung des Isopropanol wurde daraufhin das DNA-pellet zuerst mit 75% und dann mit 70% Ethanol gewaschen und, nachdem der restliche Ethanol vollständig entfernt worden war, in 35µl TE-Buffer gelöst. Bis zur Analyse wurde die gelöste DNA bei -80°C gelagert.

2.2.7 Plasmiderhaltender Verdau für eine ccc-DNA-spezifische RT-PCR-Messung

10µl aus den 35µl an DNA-Probe wurden mit dem Plasmid-Safe™ ATP-dependant DNase Kit (Epicentre, Madison, WI, USA über Biozym, Deutschland) verdaut. Hierbei wurden 3µl Plasmid-safe DNase, 5µl ATP, 5µl Plasmid-safe Buffer und 27µl DNase-free H₂O hinzugefügt. Dieses Volumen wurde dann 45 Minuten bei 37°C und 30 Minuten bei 70°C im Thermomixer compact inkubiert. Durch den Verdau der rcDNA wird die Spezifität der ccc-DNA-Primer zusätzlich unterstützt. Bei der Zugabe der Verdaureagenzien wurde die ccc-DNA im Verhältnis 1:5 verdünnt. Um bei den anderen DNA-Messungen die gleiche Verdünnung beizubehalten, wurden für diese Messungen weitere 10µl aus den 35µl DNA-Eluat mit 40µl DNase-free H₂O verdünnt.

2.2.8 Messung von totaler HBV-DNA, ccc-DNA und β-Globin mit dem Lightcycler® 1.5

Für die absolute quantitative Bestimmung der totalen HBV-DNA und HBV-ccc-DNA wurden spezifische Primer und Fluoreszenzhybridisierungssonden verwendet. Primer und Sonden für die Bestimmung der Zellzahl wurden aus dem Roche β-Globin Kit entnommen. Für alle drei RT-PCR-Messungen wurde das Light Cycler Fast Start DNA Master HybProbe (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) verwendet. Als Standard für die Zellzahlbestimmung diente humane genomische DNA aus dem Light Cycler Control Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland): 60ng humane DNA (entspricht 10.000 Genomäquivalenten) wurden im Verhältnis 1:2 bis auf 3,75 ng (entspricht 625 Genomäquivalenten) als Standardreihe verdünnt. Als Standard für die totale HBV-DNA und die ccc-HBV-DNA wurde der Plasmid pHBV EcoR1 verwendet, wobei 2×10^7 Kopien (= 120 pg) im Verhältnis 1:10 bis auf 2×10^1 Kopien als Standardreihe verdünnt wurden.

Die Lightcycler Kapillaren wurden in den Lightcycler-Kühlblock gesteckt, mit 16µl Mastermix und 4µl template befüllt, eine Minute bei 3000 rpm zentrifugiert und abschließend in das Lightcycler-Karussell gesetzt. Im folgenden ist der jeweilige Mastermix und eine Zusammenfassung der 3 PCR-Programme dargestellt:

	TOTALE HBV-DNA	CCC-HBV-DNA	B-GLOBIN
Polymerase	2µl	2µl	2µl
Primer (je 10µMol)	Je 1µl	Je 1µl	Je 1µl
Sonden (Lc:4µMol; Fl:2µMol)	Je 2µl	Je 2µl	2µl
MgCl₂ (15mMol)	1,6µl	1,6µl	2,4µl
H₂O	6,4µl	6,4µl	7,6µl

Tabelle 1: Mastermix für die PCR-Messung von totaler HBV-DNA, ccc-DNA und β-Globin mit dem Lightcycler® 1.5.

STEP	CYCLES	TARGET TEMPERATURE IN °C	INCUBATION TIME (MIN:SEC)	TEMPERATURE TRANSITION RATE (°C / SEC)	STEP DELAY (CYCLES)	ACQUISITION MODE
Incubation	1x	95	10:00	20	0	None
Amplification	45x	95	10	20	0	None
		totHBV: 57 ccc-DNA: 58, 63 β-Globin: 55	totHBV: 10 ccc-DNA: 5, 10 β-Globin: 10	20	0	Single
		72	totHBV: 15 ccc-DNA: 20 β-Globin: 5	20	0	None
Cooling	1x	totHBV: 35 ccc-DNA: 35 β-Globin: 40	totHBV: 2:00 ccc-DNA: 2:00 β-Globin: 0:30	20	0	None

Tabelle 2: PCR-Programme des Lightcycler® 1.5 für die Messung von totaler HBV-DNA, ccc-DNA und β-Globin.

Ausgewertet wurden die Lightcyclermessungen mit der Light Cycler Software 3.5 (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland), die C_t -Werte wurden mit der Methode des „second derived maximums“ berechnet. Die total HBV-DNA- und ccc-DNA-Genomzahlen wurden zunächst auf die Zellzahl normalisiert. Die rc-HBV-DNA/ Zelle wurde dann aus der Differenz von totaler HBV-DNA/ Zelle und ccc-DNA/ Zelle berechnet. Die replikative Aktivität berechnet sich aus dem Quotienten von rc-HBV-DNA/ Zelle und ccc-DNA/ Zelle.

2.2.9 Sequenzierung der HBV-DNA

2.2.9.1 PCR 968-1974 Accu Prime

Aus den 50µl ccc-DNA-Lösung des plasmiderhaltenden Verdaus wurden 5µl Probe für die Sequenzierung herangezogen. Dazu wurde zunächst die HBV-ccc-DNA von Stelle 968-1974 über eine PCR amplifiziert. Der dargestellte Mastermix wurde zusammen mit den 5µl Probe in 0,2ml-Tubes (Multiply-Pro, Biosphere) gefüllt und in einem PCR-Gerät (DNA Engine Dyad, Bio-Rad Laboratories GmbH) dem folgenden PCR-Programm zugeführt.

	VOLUMEN
Accu Prime Polymerase	0,2µl
Primer 1: HBV forward 968 (10µMol)	1µl
Primer 2: HBV reverse 1974 (10µMol)	1µl
Accu Prime Buffer I	5µl
H ₂ O	37,8µl

Tabelle 3: Mastermix für die PCR-Amplifikation des zu sequenzierenden HBV-ccc-DNA-Abschnitts 968-1974.

CYCLES	TEMPERATUR IN °C	ZEIT MIN:SEC
1x	95	4:00
40x	95	0:45
	58	0:30
	72	2:00
1x	72	7:00
1x	4	Forever

Tabelle 4: PCR-Programm für den ccc-DNA-Abschnitt 968-1974.

2.2.9.2 Geneclean Turbo for PCR

Die DNA-Aufreinigung wurde mit Geneclean® Turbo for PCR (MP Biomedicals, LLC, Solon, Ohio, USA) wie nach Anleitung empfohlen durchgeführt. Dabei wurde die PCR-Probe mit 500 µl Salt-Solution versetzt, auf eine Reinigungssäule gesetzt und 5 sec bei 11000 rpm zentrifugiert. Nach Verwerfung des Durchflusses und Zugabe von 500µl Wash-Solution wurde sie erneut 5 sec zentrifugiert. Der Durchfluss wurde wieder verworfen und die Säule jetzt 4 min zentrifugiert. Dann wurde diese in ein neues Tube gesetzt und 5 min lang mit 30µl Elution-Solution inkubiert. Danach wurde die DNA-Lösung 30 sec lang in das neue Tube abzentrifugiert. Die aufgereinigte DNA wurde dann zur Sequenzierung an die Firma MWG geschickt.

2.2.10 TLR Signaling Pathway PCR Array

10 der 20µl cDNA wurden mit 1275µl RT qPCR Master Mix und 1265µl H₂O vermischt. Dann wurden mit der Multipipette® stream (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) 25µl Mastermix in jede Vertiefung der 96-well-Platte pipettiert. Die Platte wurde dann mit der optischen Folie versiegelt, 10 Sekunden bei 1000rpm zentrifugiert und dann in den ABI PRISM 7000 gestellt. Bei der RT-PCR wurde folgendes Programm gewählt:

CYCLES	TEMPERATUR IN °C	ZEIT MIN:SEC
1x	50	2:00
1x	95	10:00
40x	95	0:15
	60	1:00

Tabelle 5: PCR-Programm des ABI PRISM 7000 mit dem TLR-PCR-Array.

Zusätzlich wurde innerhalb der ABI-Software ein Standardschmelzkurvenmodul angeschlossen. Die Grenzwertlinie wurde nach dem Lauf auf Empfehlung des Herstellers manuell gesetzt. Ct-Werte über 35 wurden nicht mehr gewertet. Die Genexpression wurde nach der δ Ct-Methode berechnet:

$$\text{Expression}_{\text{Gen } x} = 1 / 2^{(\text{Ct}_{\text{Gen } x} - \text{Ct}_{\text{Housekeeping Gen}})}$$

Das Genstabilitätsmaß M der 5 Housekeepinggene wurde mit der geNorm-Software berechnet. Das Programm bildet unter den 5 Housekeepinggenen Zweierpärchen, wobei alle möglichen Kombinationen ausgeführt werden, in diesem Fall 10 verschiedene Pärchen. Jedem Housekeepinggen ist eine Datenreihe zugeordnet, die die Messwerte der 17 Patienten sowie die 4 Kontrollen umfasst (Werte 1 bis 21). Die Datenreihe des einen Housekeepinggens (j) wird dann jeweils durch die des zweiten (k) dividiert und dann logarithmisch transformiert:

$$A_{jk} = (\log_2(a_{1j}/a_{1k}), \log_2(a_{2j}/a_{2k}), \dots, \log_2(a_{21j}/a_{21k}))$$

Für die transformierten Datenbereiche jedes Pärchens wurde dann die jeweilige Standardabweichung bestimmt:

$$V_{jk} = \text{Standardabweichung} (A_{jk})$$

Jedes Housekeepinggen war an 4 Pärchen beteiligt. Das Genstabilitätsmaß M_j eines Gens wurde dann durch den arithmetischen Mittelwert der dazugehörigen 4 Standardabweichungen bestimmt:

$$M_j = (\sum V_{jk}) : (n-1)$$

2.2.11 Messung von TGFβ und GAPDH mit dem Lightcycler

Für die relative Quantifizierung von TGFβ und GAPDH mit dem Lightcycler wurde als Enzym Kit das QuantiFast™ SYBR® Green PCR Kit (Quiagen) benutzt und als Primer das QuantiTect® Primer Assay TGFβ1 (Quiagen) sowie das QuantiTect® Primer Assay GAPDH (Quiagen). Als Mastermix wurden 2µl Primer mit 10µl SYBR Green und 7,7µl H2O zusammen mit 0,3 aus den oben beschriebenen 20µl cDNA-template (= 7,5 ng) in die Lightcyclerkapillaren pipettiert. Das Lightcyclerprogramm wurde wie vom Hersteller empfohlen angewandt:

STEP	CYCLES	TARGET TEMPERATURE IN °C	INCUBATION TIME (MIN:SEC)	TEMPERATURE TRANSITION RATE (°C / SEC)	STEP DELAY (CYCLES)	ACQUISITION MODE
Incubation	1x	95	5:00	20	0	None
Amplification	40x	95	10	20	0	None
		60	30	20	0	Single
Melting Curves	1x	95	15	20	0	None
		60	15	20	0	None
		95	0	0,1	0	Continuous
Cooling	1x	40	30	20	0	None

Tabelle 6: PCR-Programm des Lightcycler® 1.5 für die Messung von TGFβ und GAPDH.

Die relative Quantifizierung wurde nach der δC_t -Methode vorgenommen wie oben beschrieben.

Die statistischen Analyse der Daten dieser Studie wurde mit SPSS vorgenommen.

2.2.12 Das uPA-Mausmodell

2.2.12.1 Übersicht

Für dieses Mausmodell wurden Mäuse verwendet, die aus der Kreuzung von uPA-transgenen-Mäusen und SCID/beige-Mäusen hervorgehen. Das uPA-Transgen induziert unter der Kontrolle des Albuminpromotors den Zelltod von Maushepatozyten und schafft somit günstige Bedingungen für die Repopulation humaner Hepatozyten. Des Weiteren wird einer Abstoßung dieses Xenografts durch die Immundefizienz der Mäuse entgegengewirkt. Die SCID-Mäuse sind hierbei RAG-2-/Perforin-defizient, es fehlen reife und funktionsfähige B-, T- und NK-Zellen.

Die Anwesenheit des uPA-Transgens und des SCID-Phänotyps wurden mittels PCR nachgewiesen. 4 Wochen alten Mäusen wurden 10^6 humane Hepatozyten einer für die Transplantation bestimmten Leber intrasplenisch injiziert und ihre Repopulation in der Mausleber über die Serum-Humanalbuminspiegel per ELISA bestimmt. Ein Teil der chimären Mäuse mit Humanalbuminspiegeln über 1mg/ml wurde danach mit HBV-positivem Serum (5×10^7 Genom-Äquivalente) infiziert. Signifikant infizierte sowie nichtinfizierte chimäre Mäuse wurden nach über 10 Wochen sakrifiziert. Die Lebern der Mäuse wurden bei -80°C eingefroren. Ein repräsentatives Leberstück wurde dann jeweils für die RNA- und DNA-Isolation herangezogen, die nach dem gleichen Protokoll wie bei humanen Biopsien vorgenommen wurde. Die beschriebene Züchtung, Repopulation, Infektion und Sakrifizierung der Mäuse wurden von Tassilo Volz und Marc Lütgehetmann durchgeführt (Petersen et al, 2008; Lütgehetmann et al 2011).

2.2.12.2 Stimulation der TLR-Signalkaskade in uPA-Mäusen

Um die repopulierten humanen Hepatozyten in den chimären Mäusen auf eine funktionierende TLR-Signalkaskade hin zu untersuchen, wurden nicht infizierten chimären Mäusen PBS, TLR2- oder TLR4-Liganden intraperitoneal injiziert. Als TLR2- bzw. TLR4-Ligand wurden je 50µg Pam3Cys bzw. 5µg LPS verwendet, die vorher mit Hilfe eines Ultraschallbades in PBS gelöst worden waren. Eine Stunde nach der Injektion wurden die Mäuse sakrifiziert und mRNA sowie DNA wurden nach dem bereits beschriebenen Protokoll isoliert, die mRNA wurde wiederum in cDNA umgeschrieben. Die cDNA enthielt dabei sowohl humane als auch murine cDNA. Es wurde daraufhin die humane mRNA-Expression von IL6 und TNFα als Antwort auf die Stimulation der TLR-Signalkaskade in humanen Hepatozyten gemessen. Die Normalisierung der Expression erfolgte auf die humane GAPDH-mRNA-Expression. Es wurden dabei humanspezifische IL6-, TNFα- und GAPDH-Primer verwendet. Die Spezifität wurde mit der Lightcyclersoftware berechnet und mit der Messung von reiner Maus- bzw. humaner cDNA verifiziert. Im Folgenden wird der Mastermix und das PCR-Protokoll der Messung der IL6-, TNFα und GAPDH-mRNA-Expression mit dem Light Cycler® Fast Start DNA Master SYBR Green I (Roche Diagnostics) gezeigt.

	VOLUMEN
Polymerase, SYBR-Green	2µl
Primer (je 10µMol)	1µl
MgCl₂ (25mMol)	1,6µl
H₂O	14,4µl

Tabelle 7: Mastermix für die PCR-Messung von IL6, TNFα und GAPDH mit dem Lightcycler® 1.5.

STEP	CYCLES	TARGET TEMPERATURE IN °C	INCUBATION TIME (MIN:SEC)	TEMPERATURE TRANSITION RATE (°C / SEC)	ACQUISITION MODE
Incubation	1x	95	10:00	20	None
Amplification	45x	95	10	20	None
		IL6/ TNF α : 66 GAPDH: 55	5	20	
		72	IL6/ TNF α : 10 GAPDH: 7	20	Single
Melting Curves	1x	95	0	20	None
		65	15	20	None
		95	0	0,1	Continuous
Cooling	1x	40	30	20	None

Tabelle 8: PCR-Programm des Lightcycler® 1.5 für die Messung von IL6, TNF α und GAPDH.

2.2.12.3 Messung der TLR2- und TLR4-Expression in den humanen Hepatozyten chimärer Mäuse

Die isolierte RNA der chimären Mauslebern enthält sowohl humane als auch murine RNA, die beide wie bereits für die humanen Leberbiopsien beschrieben in cDNA umgeschrieben wurden. Für die Messung der humanen TLR-mRNA-Expression wurden humanspezifische Primer und Light Cycler® Fast Start DNA Master SYBR Green I verwendet. Die Spezifität wurde mit der Lightcyclersoftware berechnet und mit der Messung von reiner Maus- bzw. humaner cDNA verifiziert. Die Normalisierung erfolgte wiederum auf die humane GAPDH-mRNA-Expression.

	VOLUMEN
Polymerase, SYBR-Green	2µl
Primer (je 10µMol)	1µl
MgCl₂ (25mMol)	2,4µl
H₂O	13,6µl

Tabelle 9: Mastermix für die PCR-Messung von TLR2 und TLR4 mit dem Lightcycler® 1.5.

STEP	CYCLES	TARGET TEMPERATURE IN °C	INCUBATION TIME (MIN:SEC)	TEMPERATURE TRANSITION RATE (°C / SEC)	ACQUISITION MODE
Incubation	1x	95	10:00	20	None
Amplification	45x	95	10	20	None
		65	5	20	None
		72	10	20	Single
Melting Curves	1x	95	0	20	None
		65	15	20	None
		95	0	0,1	Continuous
Cooling	1x	40	30	20	None

Tabelle 10: PCR-Programm des Lightcycler® 1.5 für die Messung von TLR 2 und TLR4.

3. Ergebnisse

3.1 Patientencharakteristika

3.1.1 Alter, Geschlecht und HBeAg-Status

Das Patientenkollektiv dieser Studie umfasst 9 HBeAg-positive Patienten ohne nachweisbare antiHBe-Antikörper, 8 serokonvertierte HBeAg-negative Patienten mit nachweisbaren antiHBe-Antikörpern und 4 gesunde Leberspender als Kontrollgruppe. Mit je zwei Frauen hat die HBeAg-positive Gruppe einen Frauenanteil von 22,22 % und die HBeAg-negative Gruppe einen von 25%. Die Kontrollgruppe enthält eine Frau und somit einen Frauenanteil von 25%, die 3 Gruppen haben daher insgesamt einen vergleichbaren Frauenanteil. Das Alter variiert in der HBeAg-positiven Gruppe zwischen 17 und 56 Jahren und in der HBeAg-negativen Gruppe zwischen 23 und 62 Jahren mit einem jeweiligen Median von 23 bzw. 44 Jahren. Die Altersverteilung unterscheidet sich zwischen beiden Gruppen signifikant ($p=0,03$; Mann-Whitney-Test), da die HBeAg-negativen Patienten sich in einem späteren Krankheitsstadium befinden. Der jüngste Leberspender der Kontrollgruppe ist 12 Jahre, der älteste 52 Jahre alt und der Median liegt bei 32 Jahren.

3.1.2 ALT-Werte

Die ALT-Werte sind im folgenden als Vielfaches des oberen Grenzwertes (ULN) angegeben, der bei Männern 50 IU/L und bei Frauen 35 IU/L beträgt. Die ALT-Werte der HBeAg-positiven Patienten schwanken zwischen 0,22 und 3,46 bei einem Median von 2,02 und die der HBeAg-negativen Patienten zwischen 0,36 und 2,7 bei einem Median von 1,04. Beide Gruppen unterscheiden sich nicht signifikant ($p=0,067$).

3.1.3 Serum-HBV-DNA

Bei allen 17 CHB-Patienten ist HBV-DNA im Serum messbar, die Werte werden in HBV-DNA-Genomen/ml Serum angegeben. Die Werte der HBeAg-negativen Patienten schwanken zwischen 1×10^2 und 5×10^3 Kopien, der Median beträgt $1,25 \times 10^3$ Kopien/ml. Der Wertebereich der HBeAg-positiven umfasst 6×10^4 - 4×10^9 Kopien/ml und zeigt somit keine Überschneidung mit dem ersten (Abb.1). Mit 8×10^7 Kopien/ml ist sein Median $6,4 \times 10^4$ -fache höher als der der HBeAg-negativen Gruppe. Die Serum-HBV-DNA-Werte der HBeAg-positiven Patienten sind signifikant höher als die der negativen: $p=0,001$ (Mann-Whitney-Test).

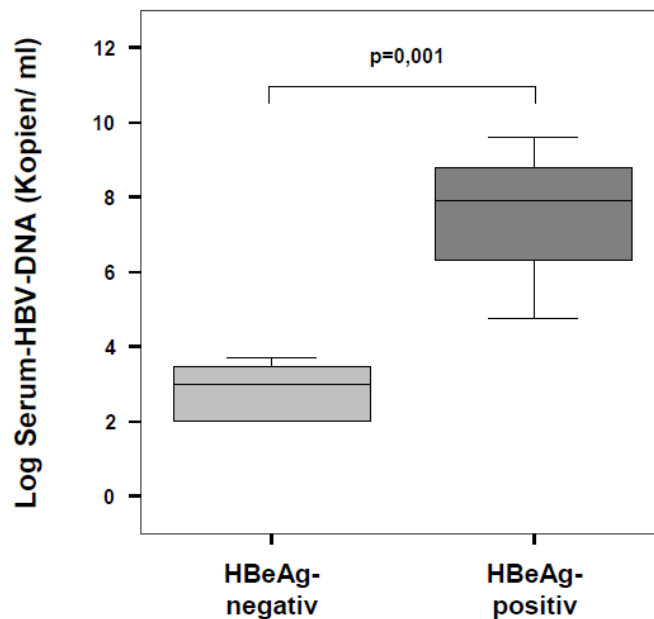


Abbildung 1: HBV-DNA-Kopien/ml im Serum von 9 HBeAg-positiven und 8 HBeAg-negativen Patienten, analysiert mit einem fluoreszenzsondenbasiertem realtime-PCR-Assay vom Institut für medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf.

3.1.4 Serum-HBsAg

In allen 17 Patientenseren war das HBsAg mit dem AxSYM™ System (Abbott Diagnostics, Wiesbaden, Deutschland) qualitativ nachweisbar. Der Median der HBeAg-positiven Patienten ist mit 34 µg/ml signifikant ($p=0,016$; Mann-Whitney-Test) um das 6-fache gegenüber dem der HBeAg-negativen (Median=5,7 µg/ml) erhöht.

Die HBeAg-negativen Patienten zeigten daher nicht nur signifikant weniger zirkulierende HBV-Genome, sondern außerdem auch eine erniedrigte Konzentration subviraler Partikel (6-fach) gegenüber den HBeAg-positiven Patienten.

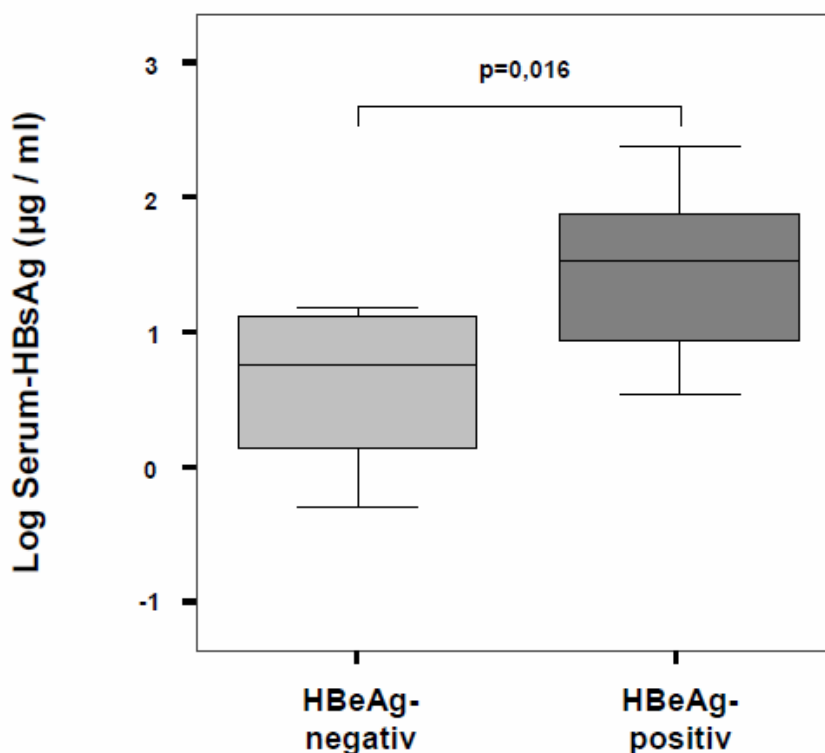


Abbildung.2: HBsAg-Konzentration in µg/ml im Serum von 9 HBeAg-positiven und 8 HBeAg-negativen Patienten, analysiert vom Institut für medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf mit der Laurell-Methode.

3.1.5 Leberhistologie

Ein Teil jeder Leberbiopsie wurde vom Pathologischen Institut der Universitätsklinik Hamburg Eppendorf hinsichtlich Entzündung (Grading) und Fibrose (Staging) nach den Desmetkriterien auf einer Skala von 1-4 beurteilt. Die Entzündungswerte variierten bei den HBeAg-positiven Patienten zwischen 1 und 3 mit einem Median von 2 und bei den HBeAg-negativen zwischen 0 und 3 mit einem Median von 1,5.

Die Fibrosewerte lagen bei den genannten Gruppen zwischen 0 und 1 bzw. zwischen 0 und 2 mit einem Medianwert von 0,5 in beiden Gruppen. Sowohl hinsichtlich Grading als auch Staging unterschieden sich die beiden Gruppen nicht signifikant.

3.1.6 Virusgenotypologie

Für die Analyse wurden nur Patientenbiopsien mit Virusgenotypen herangezogen, die an den Stellen 1762 und 1764 des HBV-Genoms im Bereich des Basalcorepromotors einen Wildtypphänotyp, d.h. die Basen A bzw. G, besitzen. Der BCP-Genotyp der Patienten 1-7 wurde mittels einer Sequenzierung bestimmt. Der BCP-Wildtyp HBV-Genome der Patienten 8-17 wurde per Inno-Lipa-Teststreifen nachgewiesen, diese Daten wurden bereits in der Arbeit von Volz et al. analysiert (Volz et al, 2007). Die Hauptgenotypen der Patienten wurden bei allen Patienten mit Inno-Lipa-Teststreifen bestimmt.

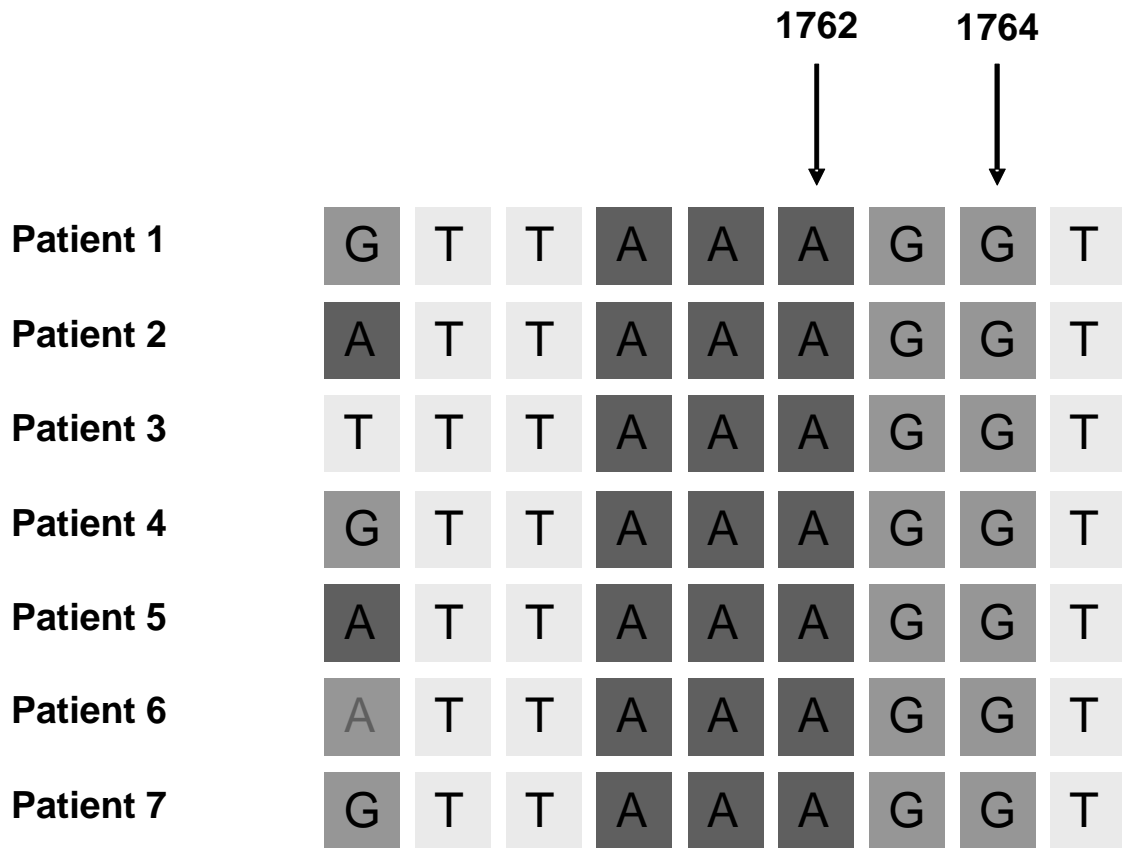


Abbildung 3: Sequenzierungsergebnisse der Basen 1756-1765 der ccc-HBV-DNA.

Patient	Hauptgenotyp
1	A/D
2	D
3	D
4	C/B
5	D
6	A/D
7	E
8	E
9	B
10	E
11	D
12	D
13	A/D
14	A
15	D
16	A/D
17	A

Tabelle 11: Die mit Inno-Lipa-Teststreifen bestimmten Hauptgenotypen der 17 Patienten.

3.1.7 Intrahepatische HBV-Parameter

3.1.7.1 Intrahepatische rc-DNA/Zelle und ccc-DNA/Zelle

Die intrahepatische Viruslast wurde wie oben beschrieben aus rc-HBV-DNA/Zellzahl berechnet. Analog zur Virämie lag der Wertebereich der HBeAg-positiven Patienten ($4 \times 10^1 - 9,95 \times 10^2$) ohne Überschneidung über dem der HBeAg-negativen ($6,2 \times 10^{-2} - 4,58 \times 10^0$). Entsprechend war der Median der HBeAg-positiven Gruppe signifikant ($p=0,001$) um das $1,05 \times 10^2$ -fache gegenüber dem Median der HBeAg-negativen Gruppe erhöht (Abb.3). Die ccc-DNA/Zellzahl lag bei den HBeAg-positiven Patienten ebenfalls signifikant höher als bei den HBeAg-negativen.

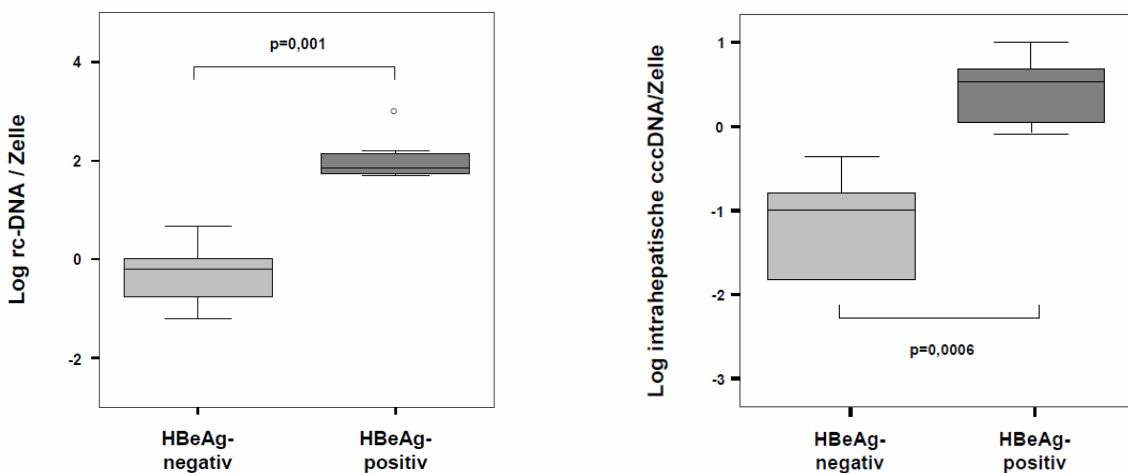


Abbildung 4: Intrahepatische rc-HBV-DNA-Konzentration/Zelle und ccc-HBV-DNA-Konzentration/Zelle von 8 HBeAg-negativen Patienten und 9 HBeAg-positiven Patienten.

3.1.7.2 Replikative Aktivität

Die replikative Aktivität berechnet sich aus dem Verhältnis von rc-HBV-DNA zu ccc-DNA und repräsentiert die Anzahl neu gebildeter Viruspartikel pro ccc-DNA-Matrize unter der Annahme, dass die ccc-Moleküle der jeweiligen Leberbiopsie eine gleichmäßig verteilt transkriptionelle Aktivität besitzen. Im Median wurden in der HBeAg-positiven Gruppe 42,56 Partikel pro Matrize gebildet, während der Median der HBeAg-negativen Gruppe von 3,22 Partikeln pro Matrize signifikant ($p=0,001$; Mann-Whitney) und um den Faktor 13,22 niedriger ausfiel.

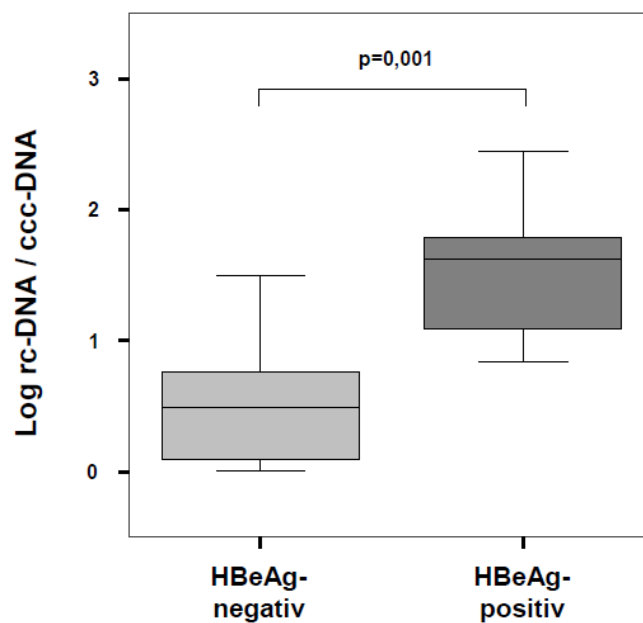


Abbildung 5: Intrahepatische replikative Aktivität des HBV: rc-HBV-DNA/ccc-HBV-DNA in den Leberbiopsien 8 HBeAg-negativer Patienten und 9 HBeAg-positiver Patienten.

3.1.7.3 Virushalbwertszeit

Die Virushalbwertszeit entspricht der Zeit in Minuten, in der sich eine bestimmte Menge aus der Leber in das zirkulierende Blutvolumen exportierter HB-Virionen halbiert hat. Sie berechnet sich $t_{1/2} = ((\text{Virämie} \times \text{ca. } 3000\text{ml Blutvolumen}) / (0,5 \times \text{rcDNA/Zelle} \times \text{ca. } 10^{11} \text{ Leberzellen})) \times 1440$. Die Halbwertszeit in HBeAg-positiven und negativen CHB-Patienten wurde bereits von Dandri et al. beschrieben (Dandri et al, 2008).

Die HBV-Halbwertszeit der HBeAg-positiven Patienten (Median: 52,1 Minuten) war gegenüber der Halbwertszeit der HBeAg-negativen Patienten (Median: 0,12 Minuten) signifikant ($p=0,007$) und um den Faktor 434,17 erhöht.

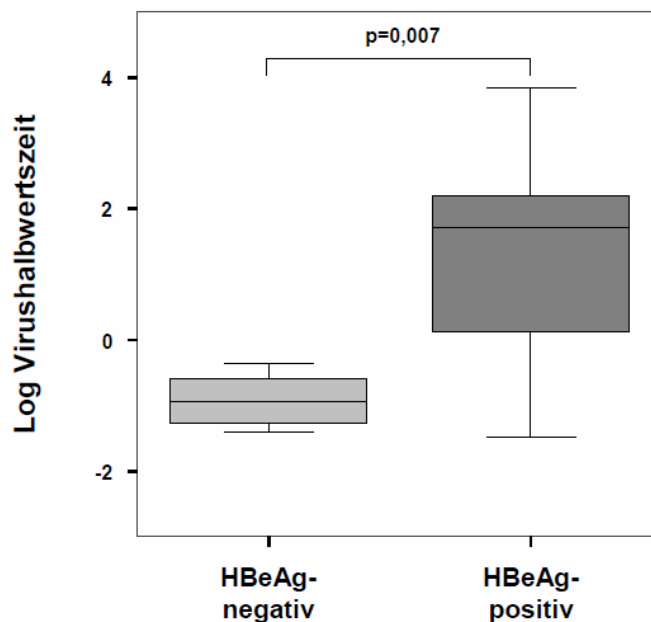


Abbildung 6: HBV-Halbwertszeit im Blut von 8 HBeAg-negativen und 9 HBeAg-positiven Patienten in Minuten.

3.2 Intrahepatische Expression des TLR-Signalweges und seiner Zytokine

3.2.1 Reproduzierbarkeit des RT-PCR-Array-Systems

Um die Reproduzierbarkeit des Human Toll-like Receptor Signaling Pathway PCR Array (SuperArray, Bioscience Corporation, Frederick, USA) zu validieren, wurden 500 ng RNA desselben Lebergewebes zweimal in cDNA umgeschrieben und dann mit dem Array gemessen. Die folgende Grafik veranschaulicht die Relation zwischen dem Genexpressionsprofil der ersten Messung im Verhältnis zu dem der zweiten Messung. Die mediane Abweichung des Quotienten beider Messwerte vom Faktor 1, der dem Quotienten aus zwei identischen Messwerten entspricht, hatte innerhalb der 96 gemessenen Gene den Betrag 0,12, wobei die 25er-Quartile bei 0,05 und die 75er-Quartile bei 0,26 lag.

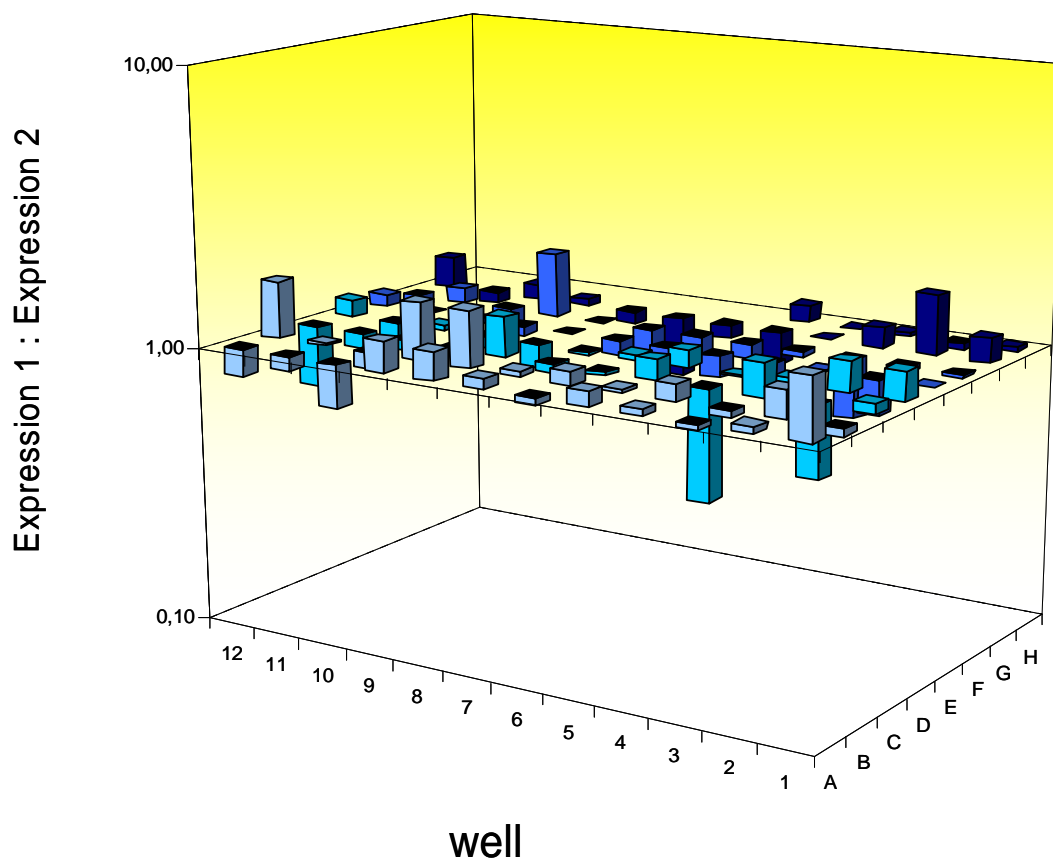


Abbildung 7: Abweichung des Quotienten aus der Expression/GAPDH,RPL, ACTB der ersten und der zweiten Messung vom Faktor 1, dargestellt für jedes der 96 im Array enthaltenen Gene.

3.2.2 Stabilität der Housekeeping-Gene

Die oben erläuterte Berechnung des Genstabilitätsmaßes M ergab für β -2-M den Wert 0,849, für HPRT 0,667, für RPL 0,645, für GAPDH 0,640 und für ACTB 0,652. Die Housekeeping-Gene GAPDH, ACTB und RPL zeigen nach diesem System eine vergleichbare und höhere Genstabilität als β -2-M und HPRT. Für die Normalisierung der folgenden Genexpressionsprofile wurde daher der Mittelwert der Ct-Werte von GAPDH, RPL und ACTB herangezogen.

Die Validierung des RT-PCR-Array-Systems ergab eine mediane Abweichung der 96 Plattengene von 0,12 bei jeweils doppelter Messung und liegt damit unterhalb der im Folgenden beschriebenen signifikanten Expressionsunterschiede der Patientengruppen.

3.2.3 Expressionsprofil der Zytokine

Es wurden Zytokine aus allen 5 Hauptklassen gemessen (Delves et al, 2000; Charo et al, 2006; Dufour et al, 2002; Hibbs et al, 2007; Vierling et al, 2007):

Interferone:

Interferon α	Induktion der zellulären Resistenz gegen virale Infektion
Interferon β	Induktion der zellulären Resistenz gegen virale Infektion
Interferon γ	Aktivierung von Makrophagen, Inhibition von T-H2-Zellen

Interleukine:

IL1a	Aktivierung von T-Zellen und Makrophagen, Promotion der Entzündung
IL1b	Aktivierung von T-Zellen und Makrophagen, Promotion der Entzündung
IL2	Aktivierung von Lymphozyten, NK-Zellen und Makrophagen
IL6	Aktivierung von Lymphozyten, Differenzierung von B-Zellen, Produktion von akute-Phase-Proteinen
IL10	Inhibition der TH1-Inflammation und Promotion der TH2-Inflammation
IL12a	Stimulation der IFN γ -Produktion von TH1-Zellen und NK

Chemokine:

IL8	Chemotaxis von Neutrophilen, Basophilen und T-Zellen
CCL2	Chemotaxis von Monozyten, dendritische Zellen, T-Gedächtniszellen und Basophilen
CXCL10	durch IFN γ induziert, Chemotaxis aktivierter T-Zellen

Kolonie-stimulierende Faktoren:

CSF2	Proliferation und Differenzierung von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten
CSF3	Proliferation und Differenzierung von neutrophilen Granulozyten

Nekrotisierende Faktoren:

TNF	Promotion der TH1-prädominanten Entzündung
LTA	Promotion der TH1-prädominanten Entzündung

Das Expressionsniveau der Zytokine war im Vergleich zu dem der meisten anderen Gene dieser Studie deutlich niedriger. Die Expression von IFN α , IFN β , CSF3, IL1a und IL2 befand sich bei den meisten Patienten unterhalb des Sensitivitätslimits und war deshalb nicht auswertbar, weil eine kohortenspezifische (HBeAg-positiv, HBeAg-negativ, gesund) Verteilung der nicht detektierbaren Werte nicht zu beobachten war, die semiquantitative Aussagen zugelassen hätte.

Als Sensitivitätslimit wurde nach Empfehlung des Herstellers ein Ct-Wert von 35 gewählt und alle Werte über 35 gleich 35 gesetzt. Der daraus errechnete Expressionswert stellt daher einen Maximalwert dar. Die Ct-Werte von IL6 waren bei 7, jedoch infizierten, Biopsien nicht messbar, sodass der Vergleich von CHB-Biopsien versus nicht infizierten Kontrollen qualitative Aussagen zulässt, quantitativ jedoch der Unterschied der Mediane möglicherweise unterschätzt wird. IFN γ , IL12a, IL1b, IL10, IL8, CSF2 sowie LTA waren vereinzelt in Patientenbiopsien nicht messbar und wurden mit in die Analyse miteinbezogen.

Die Expression der Gene IL1b, IL8, IL12a, CCL2 und CSF2 unterschied sich nicht signifikant zwischen den 3 Gruppen HBeAg-positive Patienten, HBeAg-negative Patienten und gesunde Kontrollen.

Des weiteren ergaben sich keine signifikanten Expressionsunterschiede der Gene IFN γ , CXCL10, TNF α , LTA, IL6 und IL10 zwischen den HBeAg-

negativen und -positiven Gruppen, jedoch signifikante Unterschiede zwischen CHB-Patienten und gesunden Kontrollen: Dabei war die intrahepatische Expression der Zytokine IFN γ ($p=0,016$), CXCL10 ($p=0,0048$), TNF α ($p=0,039$) und LTA ($p=0,025$) höher in den infizierten Lebergeweben als in den nichtinfizierten und im Gegensatz dazu die Expression von IL6 ($p=0,039$) und 10 ($p=0,016$) niedriger in CHB-Leberbiopsien im Vergleich zu den Kontrollen.

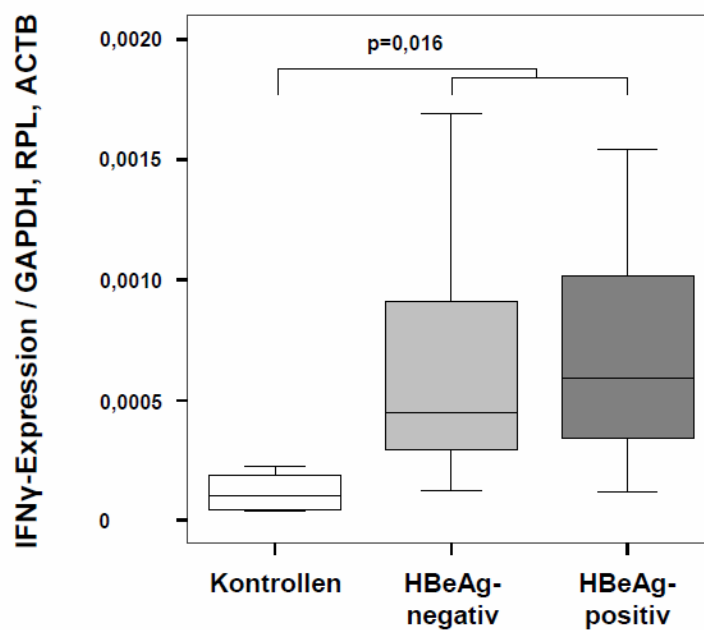


Abbildung 8a

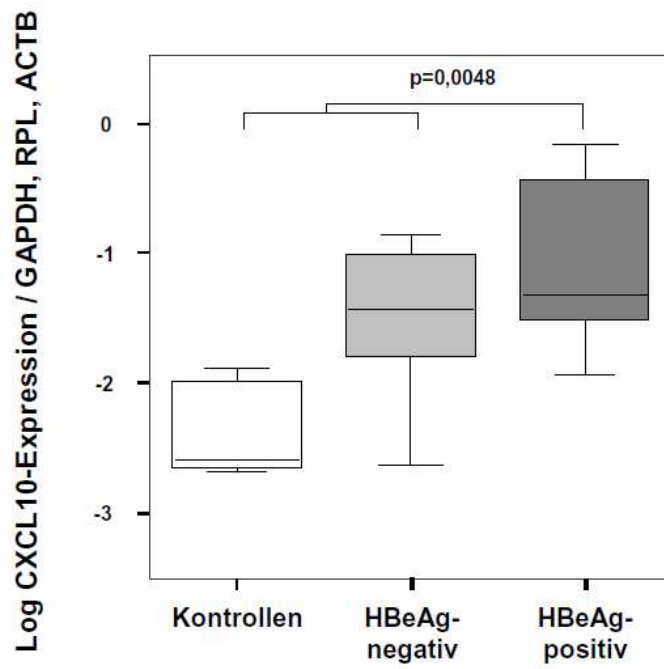


Abbildung 8b

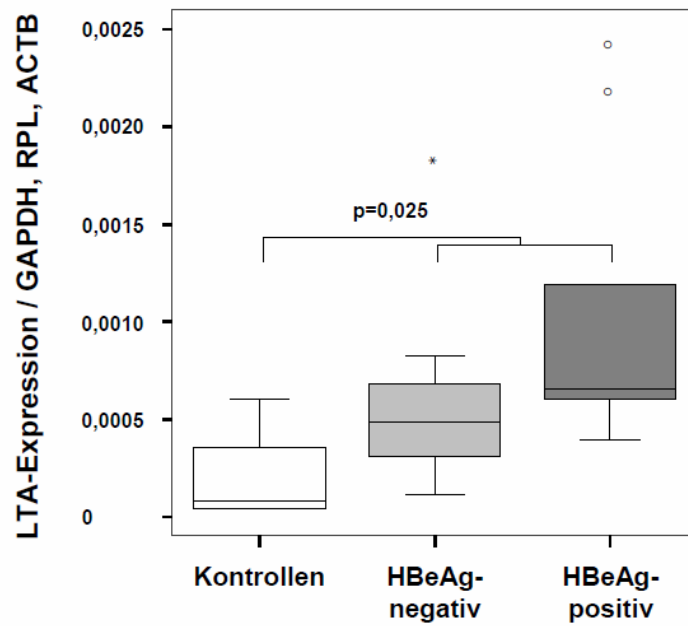


Abbildung 8c

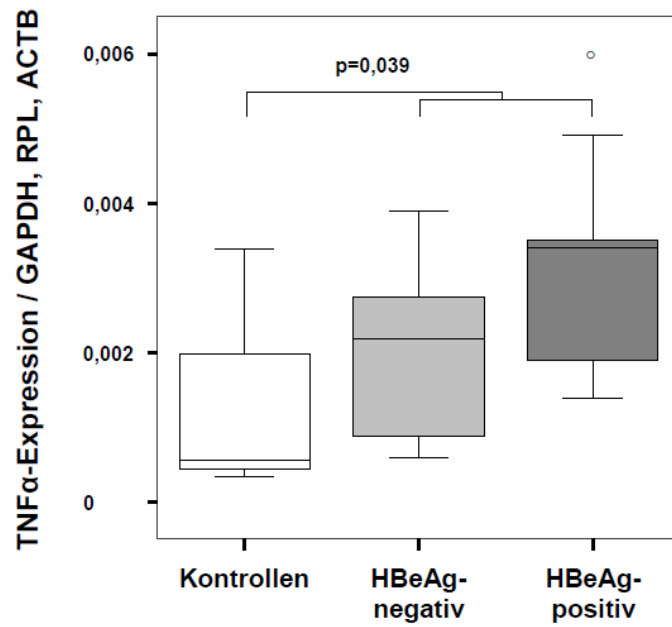


Abbildung 8d

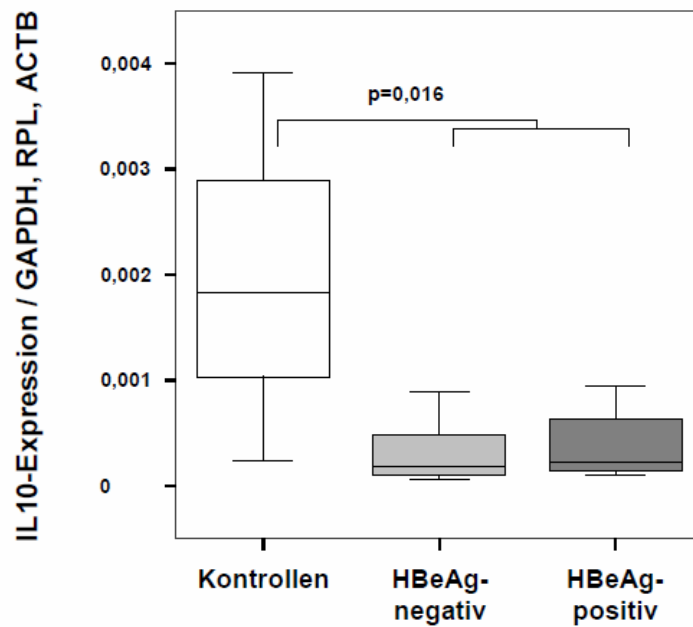


Abbildung 8e

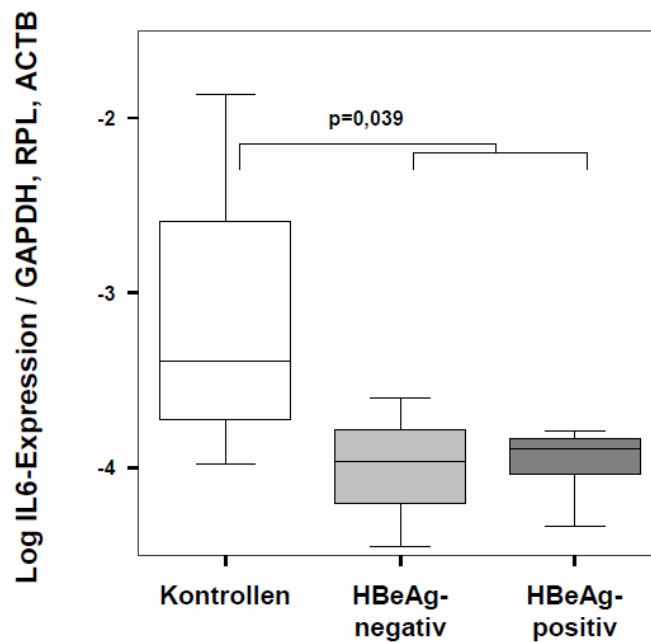


Abbildung 8f

Intrahepatische (a) IFN γ -, (b) CXCL10-, (c) LTA-, (d) TNF α -, (e) IL10- und (f) IL6- mRNA-Expression/mRNA-Expression von GAPDH, RPL und ACTB in 4 gesunden, 8 HBeAg-negativen und 9HBeAg-positiven Gewebespendern.

3.2.4 Expressionsprofil der Toll-Like Rezeptoren

3.2.4.1 Überblick der Toll-like-Rezeptoren 1 bis 10

Die Toll-like-Rezeptoren 2-4 wurden unter den TLR 1-10 am stärksten exprimiert (Abb.8). Die mRNA-Expression des TLR9 lag unterhalb des Sensitivitätslimits. Die Ct-Werte der restlichen Toll-like-Rezeptoren lagen jedoch im messbaren Bereich.

Die Toll-like Rezeptoren 1 ($p=0,039$, Faktor 3,5), 3 ($p=0,009$, Faktor 2,7), 7 ($p=0,016$, Faktor 3,3) und 10 ($p=0,003$, Faktor 3,6) zeigten in den CHB-

infizierten Gruppen eine höhere Expression gegenüber der gesunden Kontrollgruppe, während der TLR5 in der HBeAg-positiven Gruppe niedriger exprimiert wurde als in den anderen beiden Gruppen (Faktor 1,3).

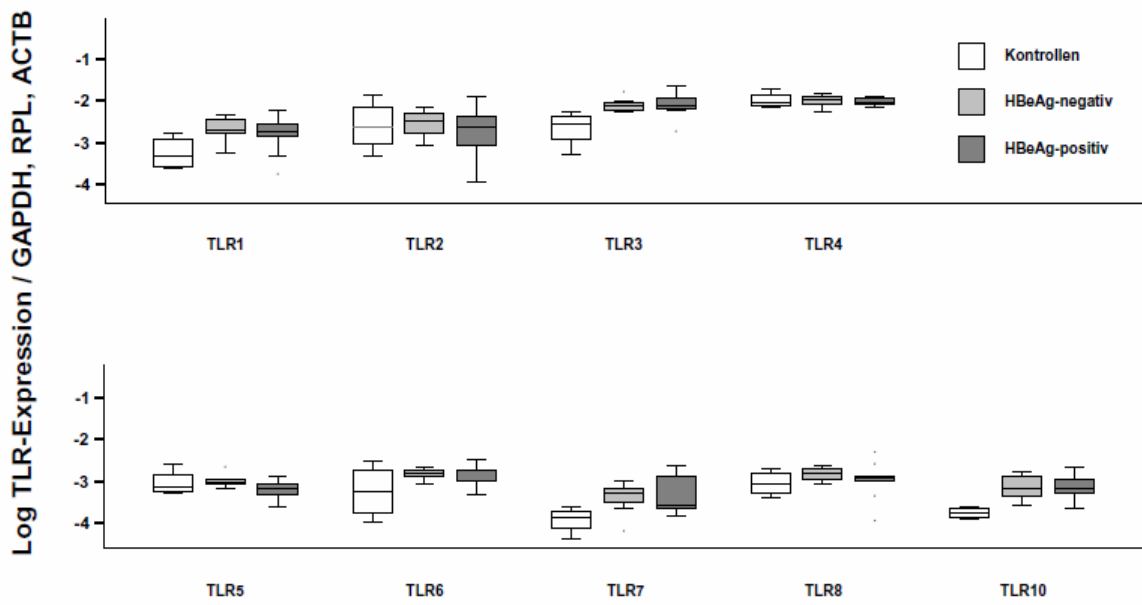


Abbildung 9: Intrahepatische TLR-mRNA-Expression/ mRNA-Expression von GAPDH, RPL und ACTB in 4 gesunden, 8 HBeAg-negativen und 9 HBeAg-positiven Gewebespendern. Die Expression des TLR9 war nicht detektierbar.

Somit war eine leicht höhere Expression einiger Toll-like-Rezeptoren in infizierten Lebergeweben zu beobachten. Die gemessenen Expressionswerte der einzelnen TLRs entsprechen hierbei der gesamten mRNA-Expression von parenchymalen (Hepatozyten) und nichtparenchymalen Zellen (Kupffer-Zellen, dendritische Zellen, Monozyten, LSECs, etc.). Die Expression dieser gesamten intrahepatischen Zellen unterschied sich nicht signifikant zwischen HBeAg-positiven und -negativen Patienten mit Ausnahme von TLR5.

3.2.4.2 TLR2

Neben der Normalisierung der TLR-Expression auf die gesamte Zellzahl wurde die mRNA-Expression auf die mRNA-Expression von CD80 als Marker für antigenpräsentierende Zellen bezogen. Die TLR2-Expression/CD80-Expression war signifikant niedriger in Leberbiopsien HBeAg-positiver Patienten gegenüber denen HBeAg-negativer Patienten ($p=0,043$; Faktor 1,8; Mann-Whitney), während die Expression der restlichen TLR/CD80 sich nicht zwischen diesen beiden Gruppen unterschied (Abb.10). Die Expression von TLR2/CD80 korrelierte zudem signifikant negativ mit dem HBV-Titer ($p=0,007$; $r=0,625$; Pearson) und der Virushalbwertszeit ($p=0,005$; $r=0,642$; Pearson) der jeweiligen Patienten (Abb. 11 und 12). Eine vergleichbare Korrelation wurde zwischen TLR2-Expression/ β -2-Mikroglobulin und Virämie ($p=0,012$; $r=0,591$; Pearson) sowie zwischen TLR2-Expression/ β -2-Mikroglobulin und Virushalbwertszeit ($p=0,008$; $r=0,619$; Pearson) beobachtet (Abb. 13 und 14). Diese Ergebnisse suggerieren, dass die TLR2-Expression in antigenpräsentierenden Zellen der Lebern hochvirämischer, HBeAg-positiver Patienten niedriger ist.

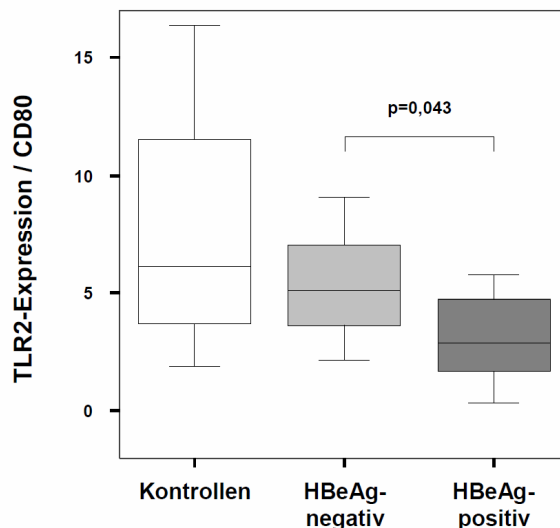


Abbildung 10: Intrahepatische TLR2-mRNA-Expression/mRNA-Expression von CD80 in 4 gesunden, 8 HBeAg-negativen und 9 HBeAg-positiven Gewebespendern.

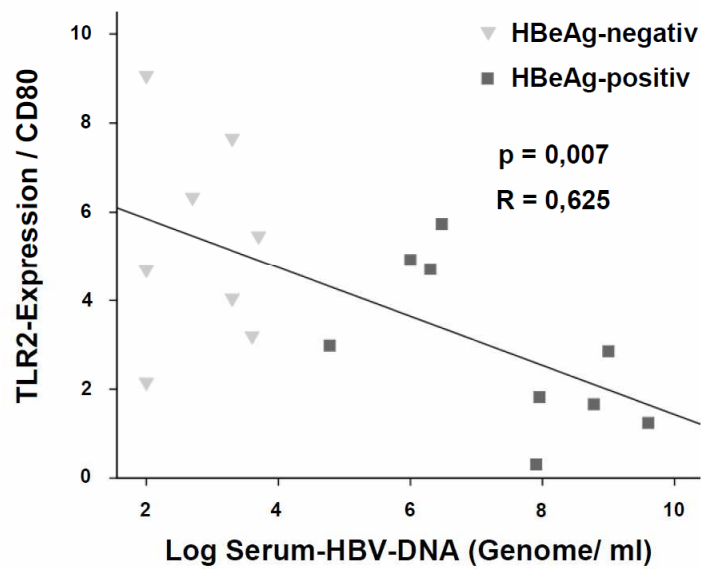


Abbildung 11: Korrelation der intrahepatischen TLR2-mRNA-Expression/mRNA-Expression von CD80 mit der Anzahl an HBV-DNA-Molekülen/ml Serum in 8 HBeAg-negativen und 9 HBeAg-positiven Patienten.

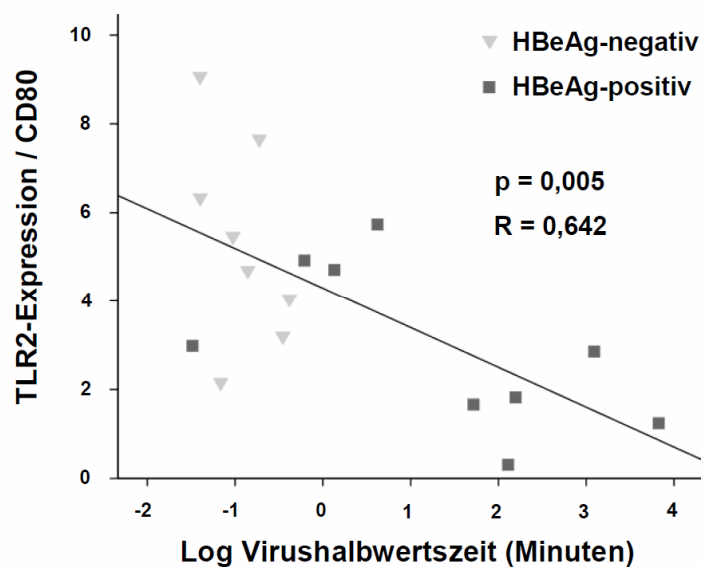


Abbildung 12: Korrelation der intrahepatischen TLR2-mRNA-Expression/mRNA-Expression von CD80 mit der HBV-Halbwertszeit in 8 HBeAg-negativen und 9 HBeAg-positiven Patienten.

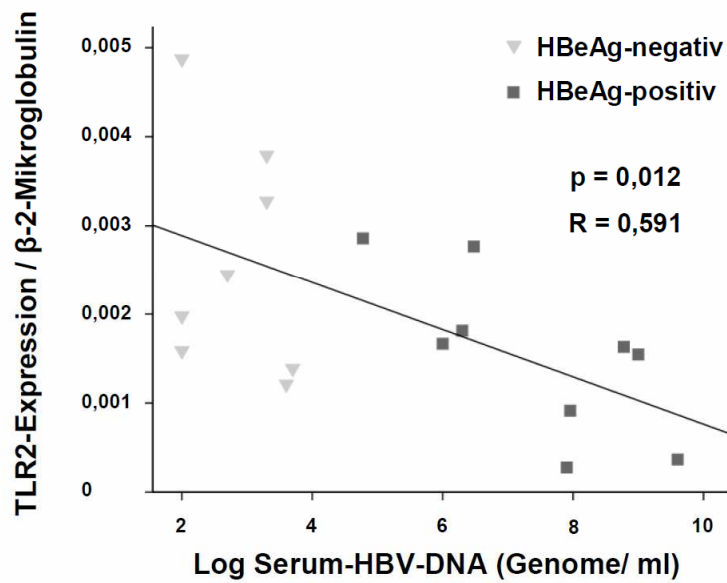


Abbildung 13: Korrelation der intrahepatischen TLR2-mRNA-Expression/mRNA-Expression von β -2-Mikroglobulin mit der Anzahl an HBV-DNA-Molekülen/ml Serum in 8 HBeAg-negativen und 9 HBeAg-positiven Patienten.

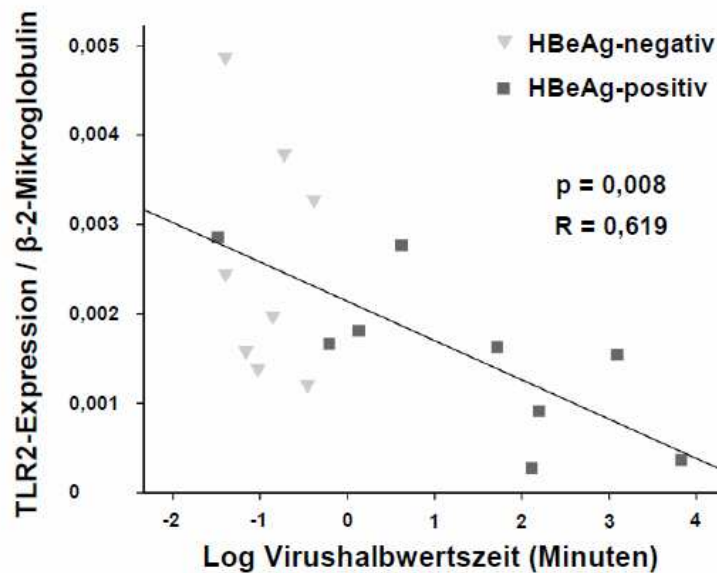


Abbildung 14: Korrelation der intrahepatischen TLR2-mRNA-Expression/mRNA-Expression von β -2-Mikroglobulin mit der HBV-Halbwertszeit in 8 HBeAg-negativen und 9 HBeAg-positiven Patienten.

3.2.4.3 TLR4

Die TLR4-Expression korrelierte nicht mit der rc-HBV-DNA/Zelle, der Virämie, der replikativen Aktivität, der Virushalbwertszeit, den Laurell-Werten oder mit Grading und Staging. Signifikant positiv korrelierte die TLR4-Expression mit der Expression des TLR4-Liganden HMGB1 ($p=0,027$; $R=0,482$; Pearson).

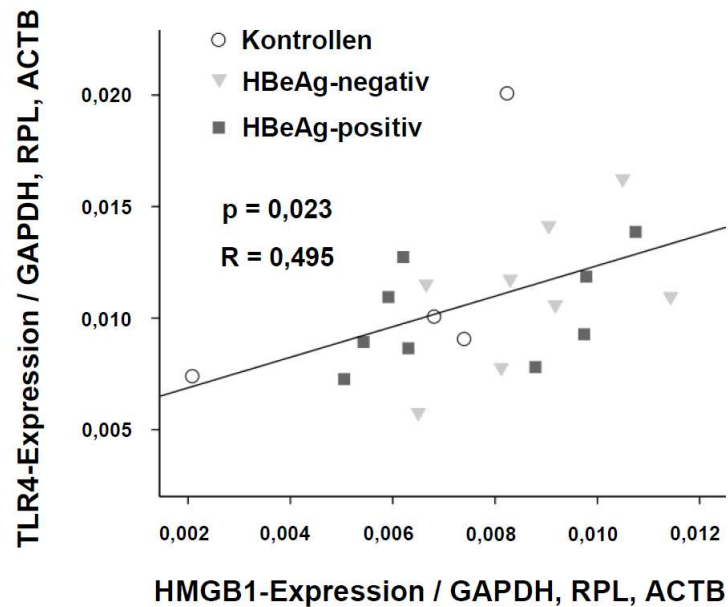


Abbildung 15: Korrelation der intrahepatischen TLR4-mRNA-Expression/mRNA-Expression von GAPDH, RPL und ACTB mit der intrahepatischen mRNA-Expression seines Liganden HMGB1/mRNA-Expression von GAPDH, RPL und ACTB in 4 gesunden, 8 HBeAg-negativen und 9 HBeAg-positiven Spendern.

3.2.5 Intrazelluläre Signalkaskade des TLR-Signaltransduktionsweges

Die mRNA-Expression der folgenden Moleküle des TLR-Signaltransduktionsweges bezogen auf die gesamte Zellzahl unterschied sich signifikant zwischen CH-B-infizierten und gesunden Lebergeweben: Die Moleküle IRAK2 ($p=0,016$; Faktor 2,4), TAK1 ($p=0,032$; Faktor 1,3), IKK α ($p=0,003$; Faktor 1,9), FOS ($p=0,003$; Faktor 22,1) und JUN ($p=0,016$; Faktor 2,8) waren signifikant niedriger in den CH-B-infizierten Lebergeweben im Vergleich zu den gesunden Kontrollen exprimiert.

Die Expression von TOLLIP ($p=0,039$; Faktor 1,7), einem Inhibitor des TLR-Signaltransduktionsweges, erwies sich als signifikant höher in den infizierten Lebergeweben gegenüber den Kontrollen.

MD1 als ein Inhibitor des TLR4-Signalweges wurde in Biopsien HBeAg-positiver Patienten signifikant höher als in den Leberbiopsien HBeAg-negativer Patienten und gesunden Lebergeweben ($p=0,027$; Faktor 2,2; Mann-Whitney-Test) exprimiert. Des weiteren korrelierte die MD1-Expression signifikant mit der rc-HBV-DNA/ Zelle ($p=0,021$; $r=0,554$; Pearson), aber nicht mit der Virämie, der replikativen Aktivität, der Virushalbwertszeit, den Laurellwerten, den ALT-Werten oder dem Grading und Staging.

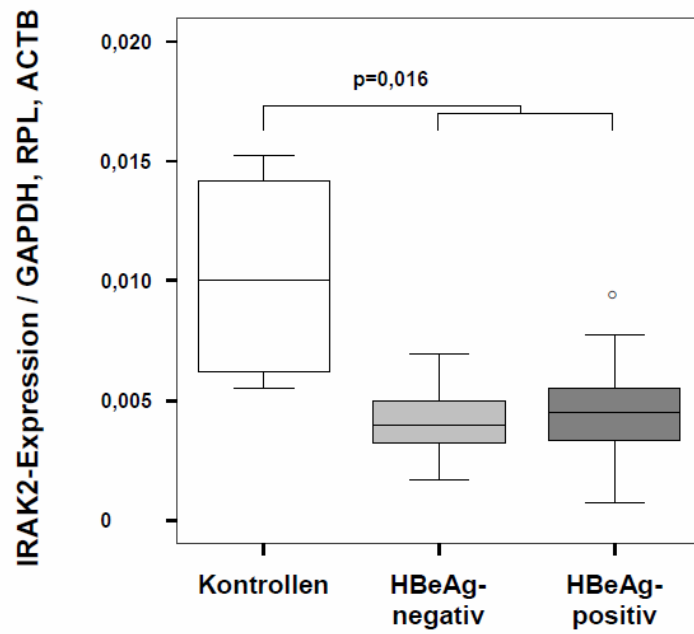


Abbildung 16a

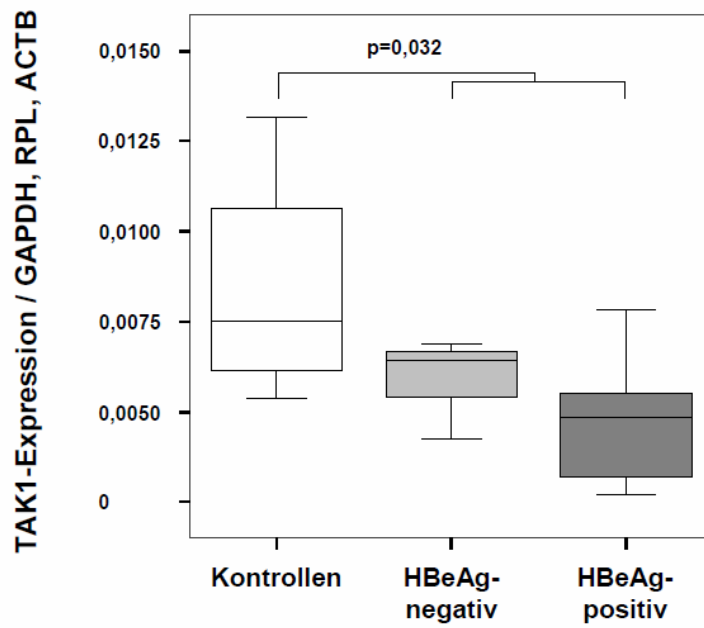


Abbildung 16b

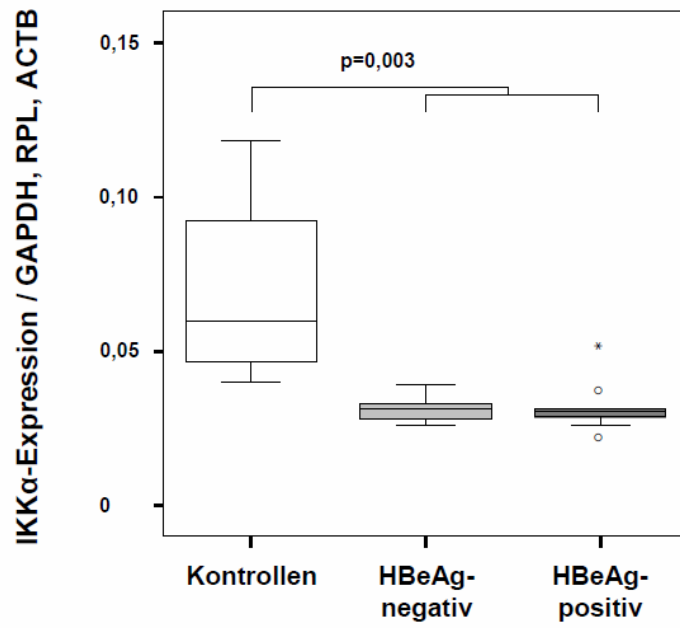


Abbildung 16c

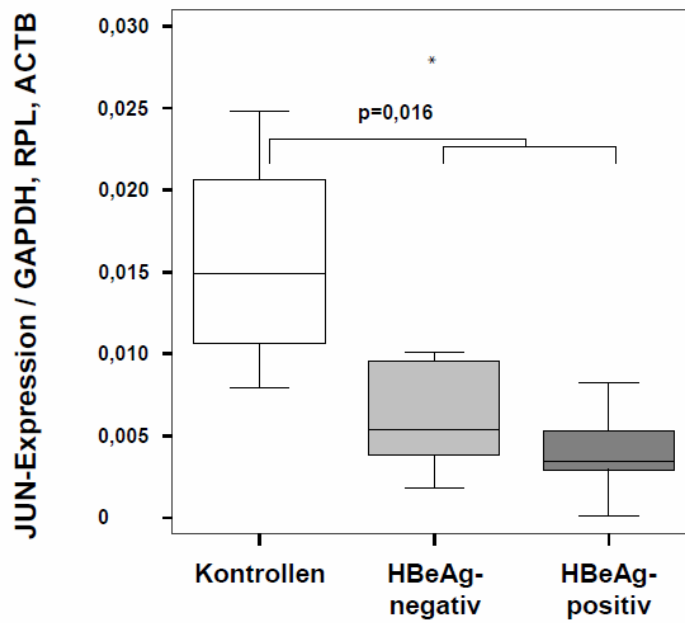


Abbildung 16d

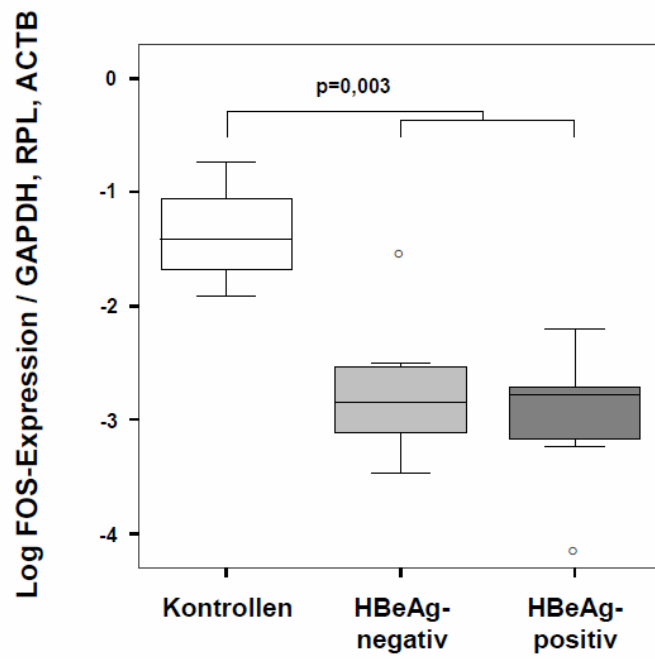


Abbildung 16e

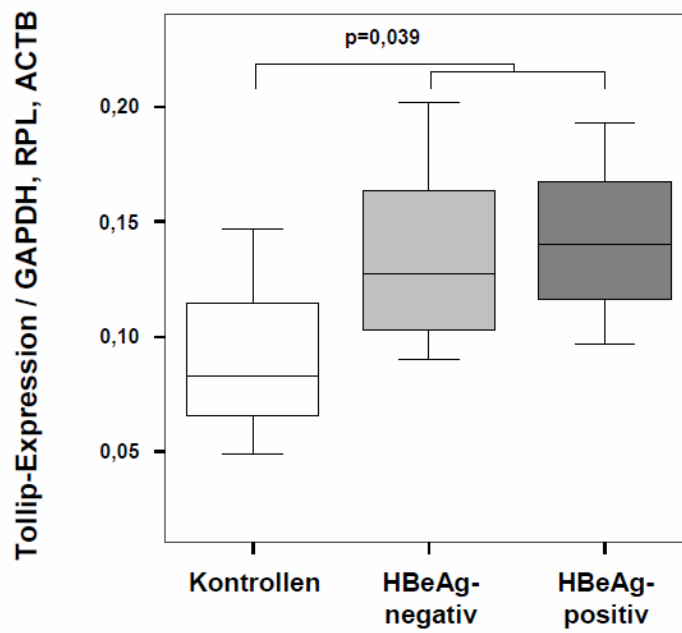


Abbildung 16f

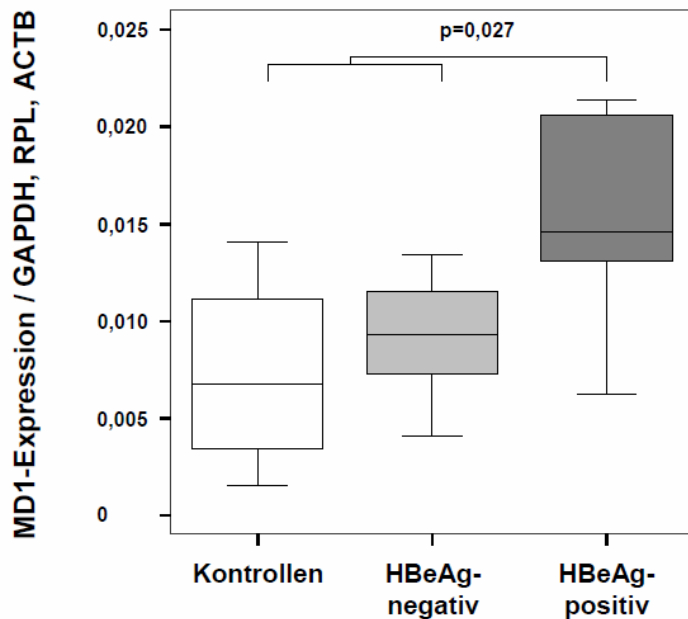


Abbildung 16g: Intrahepatische (a) IRAK2-, (b) TAK1-, (c) IKK α -, (d) JUN-, (e) FOS-, (f) Tollip- und (g) MD1- mRNA-Expression/mRNA-Expression von GAPDH, RPL und ACTB in 4 gesunden, 8 HBeAg-negativen und 9 HBeAg-positiven Gewebespendern.

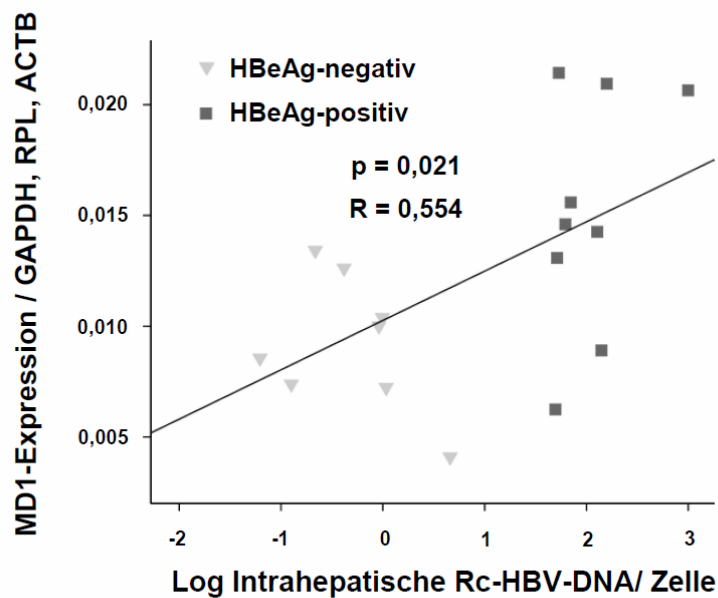


Abbildung 17: Korrelation der intrahepatischen MD1-mRNA-Expression/mRNA-Expression von GAPDH, RPL und ACTB mit der intrahepatischen rc-HBV-DNA/Zelle in 8 HBeAg-negativen und 9 HBeAg-positiven Patienten.

3.3 Das uPA-Mausmodell

3.3.1 Stimulation der TLR-Signalkaskade in uPA-Mäusen

Es wurden je 2 Mäusen PBS als Negativkontrolle, Pam3Cys (TLR2-Ligand) und LPS (TLR4-Ligand) intraperitoneal injiziert. Die Mittelwerte der mRNA-Expression nach einer Stunde zeigen, dass die Expression von TNF α bei TLR4-Stimulation um den Faktor 26 und bei TLR2-Stimulation um den Faktor 79 erhöht ist. Die IL6-Expression ist bei TLR4-Stimulation 32-mal höher und bei TLR2-Stimulation 20-mal höher als bei den Negativkontrollen.

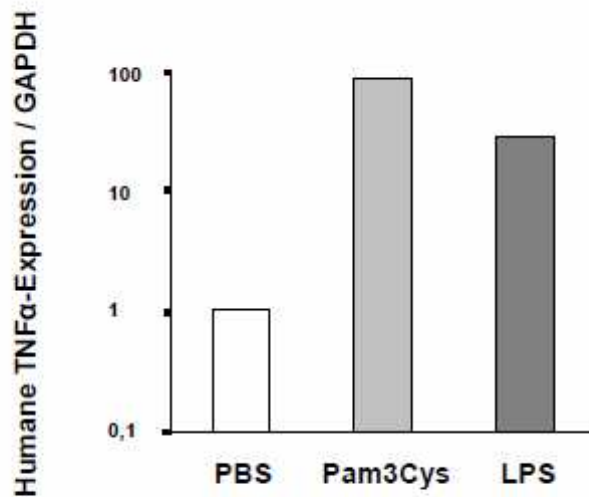


Abbildung 18: TNF α -mRNA-Expression in humanen Hepatozyten nach TLR2- bzw. TLR4-Stimulation gegenüber Kontrollen.

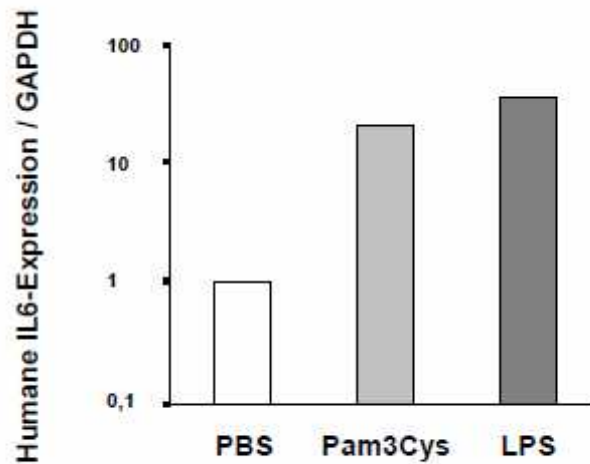


Abbildung 19: IL6-mRNA-Expression in humanen Hepatozyten nach TLR2- bzw. TLR4-Stimulation gegenüber Kontrollen.

3.3.2 Messung der TLR2- und TLR4-Expression in den humanen Hepatozyten chimärer Mäuse

Es wurden 6 infizierte Mäuse mit 5 nichtinfizierten chimären Mäusen verglichen. Die Expression des humanen TLR2 in den humanen Hepatozyten unterschied sich nicht signifikant zwischen den beiden Gruppen ($p=0,465$). Die mRNA-Expression des TLR4 war in den humanen Hepatozyten infizierter Mäuse signifikant um den Faktor 4 höher als in denen nicht infizierter Mäuse ($p=0,011$).

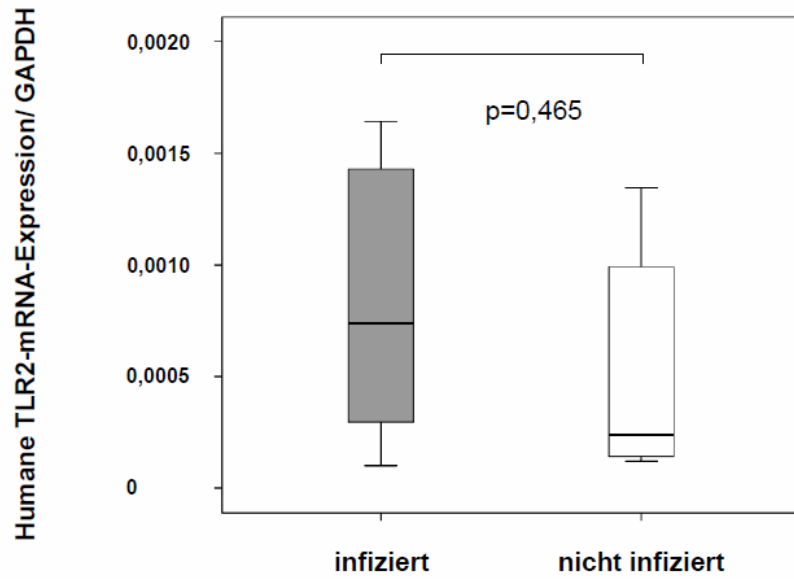


Abbildung 20: TLR2-mRNA-Expression in humanen Hepatozyten infizierter und nichtinfizierter chimärer uPA-Mäuse.

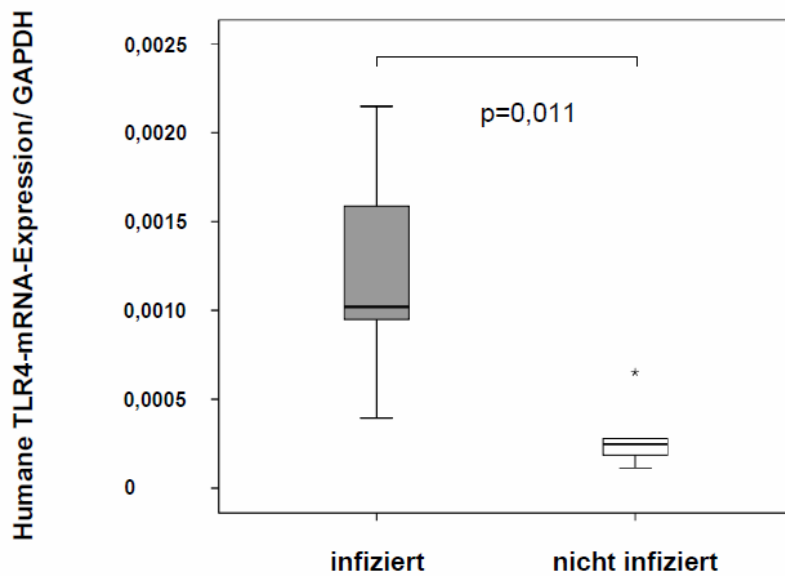


Abbildung 21: TLR4-mRNA-Expression in humanen Hepatozyten infizierter und nichtinfizierter chimärer uPA-Mäuse.

4. Diskussion

Die chronische HBV-Infektion ist die Folge einer defizienten Antwort des adaptiven Immunsystems auf das Virus. Das angeborene Immunsystem verstärkt und unterstützt die adaptive Immunantwort unter anderem durch die Schaffung bestimmter Zytokinmilieus. Die Phasen im natürlichen Verlauf der HBV-Infektion sind charakterisiert durch eine unterschiedliche replikative Aktivität, in HBeAg-serokonvertierten Patienten ist diese niedriger als in HBeAg-positiven. Die Mechanismen, die für die Kontrolle der replikativen Aktivität im Zusammenhang mit der HBeAg-Serokonversion verantwortlich sind, sind bisher unbekannt.

In der jüngeren Literatur ist die Hypothese einer Suppression des angeborenen Immunsystems durch das HBV aufgestellt worden, die v.a. aus in-vitro Versuchen mit PBMCs aus Patientenseren und mit Tumorzelllinien hervorgeht.

Ziel dieser Studie war es, die Expression der gesamten TLR-Signalkaskade in HBV-infizierten Lebergeweben in-vivo zu untersuchen. Hierzu wurden Lebergewebe aus verschiedenen Stadien der HBV-Infektion herangezogen, um die mRNA-Expression der einzelnen TLR-Signalwegkomponenten mit viralen Parametern zu korrelieren und dadurch Hinweise auf eine mögliche Inhibition von Signalwegmolekülen durch das HBV zu erhalten. Deckungsgleich mit den vorherigen Beobachtungen von Volz et al. (Volz et al, 2007) werden in dieser Studie einer gesunden Kontrollgruppe eine niedrigreplikative, niedrigvirämische, HBeAg-negative und eine hochreplikative, hochvirämische, HBeAg-positive Gruppe entgegengestellt.

Die Komponenten IRAK2, TAK1 und IKK α stellen essentielle Kinasen des TLR-Signalweges dar und werden in den infizierten HBV-Biopsien um den Faktor 1,3-2,4 signifikant niedriger exprimiert als in den gesunden Kontrollen. Die beiden Transkriptionsfaktoren JUN und FOS werden in den infizierten Geweben ebenfalls niedriger exprimiert als in den Kontrollen, am deutlichsten FOS um

den Faktor 22,1. Die Expression von MD1 und Tollip, Inhibitoren dieses Signalweges, präsentiert sich jedoch anders: Tollip wird in den HBV-Biopsien stärker exprimiert als in den gesunden Kontrollen und MD1 in den HBeAg-positiven Proben stärker als in den anderen zwei Gruppen. Die niedrigere Expression der genannten Schlüsselkomponenten des Signalweges in infizierten Geweben steht daher in einem sinnvollen Zusammenhang mit der erhöhten Expression der Inhibitoren dieses Signalweges MD1 und Tollip. Je weiter unten die Moleküle in der Signalkaskade stehen, desto weniger sind sie ein spezifischer Bestandteil der TLR-Signalkaskade selber, da verschiedene Signaltransduktionswege im MAP-Kinase- oder NF- κ B-Weg zusammenlaufen. Die verminderte Expression von JUN oder FOS in infizierten Geweben könnte daher neben immunologischen auch metabolische Ursachen haben.

Ebenfalls in einem sinnvollen Zusammenhang mit dem Expressionsprofil der genannten Schlüsselmoleküle steht die niedrigere mRNA-Expression von IL6, welche in infizierten Geweben niedriger war als in den Kontrollen. Dieses Zytokin supprimiert in-vitro die HBV-Replikation, indem es über den IL-6-Signalweg die Transkriptionsfaktoren HNF1 α und HNF4 α herunterreguliert (Hösel et al, 2009). C-JUN ist als Bestandteil des IL-6-Signalweges ebenfalls in infizierten Geweben niedriger exprimiert, allerdings ist JUN auch Bestandteil weiterer Signalkaskaden (TLR-Liganden, TNF α , Wachstumsfaktoren, Hormone).

Die mRNA-Spiegel der Zytokine LTA, TNF und IFN γ waren signifikant in den infizierten Geweben gegenüber den gesunden Kontrollen erhöht und spiegeln nicht die Situation einer Suppression durch das HBV wieder. Allen drei Zytokinen gemein ist, dass sie im TH1-Zytokinmilieu prädominieren. In Übereinstimmung mit diesem Expressionsprofil wird das charakteristische Zytokin des TH2-Milieus IL10 in den infizierten Geweben niedriger exprimiert. Vor dem Hintergrund mehrheitlich erhöhter ALT-Werte sowie signifikanter Fibrose und Inflammation legt das gesamtintrahepatische mRNA-Expressionsniveau der Zytokine ein Überwiegen der zytotoxischen

Immunantwort in den HBV-infizierten Lebergeweben nahe. Das niedrige Expressionsniveau der Zytokine im Allgemeinen und speziell das der Typ-I-Interferone unterhalb des Detektioslimits sprechen für die Hypothese, dass sich das HBV intrahepatisch wie ein „stealth-virus“ verhält.

Die Unterschiede in der Expression der beschriebenen Komponenten der TLR-Signalkaskade ergeben sich in dieser Studie im Wesentlichen zwischen HBV-infizierten und gesunden Lebergeweben, jedoch nicht zwischen HBeAg-positiven und -negativen Gruppen, zudem korreliert ihre Expression nicht signifikant mit weiteren viralen Parametern wie z.B. der replikativen Aktivität. Lediglich die MD1-Expression korrelierte mit dem HBeAg-Status und weiteren viralen Parametern. Daher gibt das Expressionsprofil der Zytokine, TLR und Signalmoleküle mit Ausnahme von MD1 keine Anhaltspunkte für eine Erklärung der niedrigeren replikativen Aktivität des HBV in HBeAg-serokonvertierten Patienten. Ein möglicher Ansatzpunkt für eine weitere Untersuchung dieser Zusammenhänge wäre die Rolle von MD1. Der Inhibitor des TLR4-Signalweges korreliert mit dem HBeAg-Status sowie mit der Viruslast, jedoch nicht mit anderen viralen Parametern, wie z.B. der replikativen Aktivität. Ein suppressiver Effekt des HBV auf den TLR4-Signalweg wurde bereits von Wu et al. beschrieben. Die Suppression dieses Signalweges erstreckt sich auf den MAP-Kinase-, NF- κ B- und IRF-Signalweg, daher müsste ein suppressiver Effekt an einer relativ weit oben stehenden Komponente wie MD1 ansetzen, wenn er nicht an jedem Signalweg einzeln ansetzt.

Die Auswahl der Housekeeping-Gene GAPDH, RPL und ACTB wurde aufgrund der oben berechneten Genstabilität getroffen. Sie stellen eine Normalisierung auf die Gesamtzellzahl der Leber dar, die von Parenchymzellen dominiert wird. Schwankungen von Subtypen nichtparenchymaler Zellen zwischen den Leberbiopsien unterschiedlicher Stadien der chronischen Hepatitis B werden mit dieser Normalisierung nicht berücksichtigt. Daher wurde parallel zu der Normalisierung der mRNA-Expression auf die Gesamtzellzahl eine solche vorgenommen, die sich auf die ebenfalls mit diesem Array

gemessenen CD80-Werte als Marker für antigenpräsentierende Zellen bezieht. Sie führte ausschließlich zu einer niedrigeren Expression des TLR2, nicht jedoch anderer TLR, in HBeAg-positiven Proben gegenüber HBeAg-negativen und gesunden sowie zu einer negativen Korrelation zwischen TLR2 und Virämie bzw. Virushalbwertszeit. Vergleichbare Korrelationen ergaben sich, wenn die TLR2-Expression auf das Housekeeping-Gen β -2-Mikroglobulin, welches in Leukozyten höher als in der Gesamtleber exprimiert wird (Vandesompele et al, 2002), normalisiert wurde. Es ergaben sich keine signifikanten Korrelationen zwischen TLR2-Expression und intrahepatischen Parametern wie Viruslast oder replikativer Aktivität. Möglicherweise korreliert die TLR2-Expression der NPZ nur mit viralen Parametern, die nicht primär intrahepatozellulär lokalisiert sind, sondern extrazellulär in engerem Kontakt zu den NPZ.

Nach Locarnini et al. ist die TLR2-Oberflächenexpression auf jeweils isolierten PBMCs und Kupffer-Zellen HBeAg-positiver Patienten gegenüber Kontrollen erniedrigt und die Expression auf Zellen HBeAg-negativer Patienten erhöht. Die Expressionsunterschiede des TLR2 auf PBMCs HBeAg-positiver Patienten gehen zudem mit einer verminderten in-vitro-TNF- und IL6-Zytokinantwort auf TLR-Liganden einher (Visvanathan et al, 2007). Diese Beobachtungen konnten bei Normalisierung der TLR2-Expression auf die drei Housekeeping-Gene GAPDH, RPL und ACTB in dieser Studie nicht nachvollzogen werden. Zudem korrelierten die TNF- und IL6-Expression nicht mit dem HBeAg-Status oder der replikativen Aktivität. Durch die Normalisierung der TLR2-Expression auf APZ-Marker war jedoch die Korrelation mit dem HBeAg-Status zu beobachten und konkordant mit Locarninis Daten beschränkte sich diese Beobachtung nur auf den TLR2. Die Daten des uPA-Mausmodells dieser Arbeit konnte ebenfalls keine verminderte Expression des TLR2 oder TLR4 in infizierten humanen Hepatozyten zeigen und unterstreichen daher die Vermutung, dass sich die Expressionsunterschiede der Rezeptoren auf die nichtparenchymalen Zellen konzentrieren. Ein weiterer Unterschied zu dieser Studie besteht darin, dass Locarnini et al. in den isolierten Zellen der Patienten die

Oberflächenexpression und nicht die mRNA-Expression gemessen haben. Des Weiteren könnte auch die Auswahl der HBV-Genotypen einen Einfluss auf die TLR2-Expressionsunterschiede haben (Chen et al, 2008).

Der TLR4 korreliert bei Normalisierung auf die 3 Housekeeper oder auf NPZ-Marker nicht mit viralen Parametern. Jedoch korreliert die TLR4-Expression positiv mit der Expression seines Liganden HMGB1. Die Expression des TLR4 könnte somit durch die Aktivierung des Rezeptors mit seinem Liganden induziert werden.

In dieser Studie wurde die Anwesenheit des HBeAg im Patientenserum analysiert, jedoch wurde das Antigen nicht quantifiziert. Die Gruppe der HBeAg-positiven Patienten konnte daher nicht auf die Konzentration des HBeAg und einen möglichen Zusammenhang mit der Expression der TLR-Sigankaskade hin untersucht werden. Für weitere Studien wäre daher eine Quantifizierung des HBeAg interessant.

Das Ziel dieser Studie war es, die Expression des TLR-Signalweges zwischen hochvirämischen, niedrigvirämischen und gesunden Lebern zu vergleichen. In diesem Zusammenhang wurden signifikante Expressionsunterschiede essentieller Signalwegkomponenten beobachtet, deren Bedeutung für die Virulenz des HBV weiter untersucht werden müssen.

Um die Ergebnisse weiter zu untersuchen, könnte in anschließenden Studien die mRNA-Expression von IRAK2, TAK1, IKK α , JUN, FOS, MD1, Tollip und IL6 in größeren Patientengruppen gemessen werden. Interessant wären v.a. die vorherige Zellseparation einzelner Subtypen sowie Messungen auf Proteinebene. Diese Ziele werfen jedoch das Problem auf, dass Leberbiopsien in der Regel nicht genügend Material für derartige Messungen liefern. Weitere Möglichkeiten wären daher die Isolierung von PBMCs aus Patientenblutproben oder das uPA-Mausmodell, welches mehr Lebermaterial zur Verfügung stellt

und komplexere Versuche zulässt. Ein weiterer Schritt wären Untersuchungen zur biologischen Relevanz des gemessenen Expressionsprofils. Hierzu könnten beispielsweise die Auswirkungen einer verminderten Expression der diskutierten Gene durch siRNA auf virale Parameter in-vitro gemessen werden oder in einem weiteren Schritt die HBV-Virulenz in knock-out-Mäusen untersucht werden.

5. Zusammenfassung

Das angeborene Immunsystem spielt eine wichtige Rolle bei der Kontrolle von Virusinfektionen und es gibt einige Viren, die Mechanismen entwickelt haben die Antwort des angeborenen Immunsystems zu unterdrücken. In der jüngeren Literatur gibt es eine zunehmende Evidenz, dass auch HBV-Komponenten TLR-Signalkaskaden supprimieren können. Das Ziel dieser Studie war es daher zu untersuchen, ob die HBV-Viruslast oder der HBeAg-Status in chronisch Hepatitis B-infizierten Patienten mit Änderungen der intrahepatischen Expression der TLR-Kaskade korrelieren. Dazu wurde die Expression der wesentlichen Signalwegkomponenten in Leberbiopsien von 17 therapienaiven CH-B-Patienten (9 HBeAg-positive und 8 HBeAg-negative) verglichen, die sich signifikant in Virämie und replikativer Aktivität unterschieden (42 versus 3 rcHBV-DNA/cccDNA in HBeAg-positiven und -negativen Patienten). Es wurden 4 gesunde Lebergewebe als Kontrollen verwendet. Die intrahepatische Expression wurde mit einer real-time-PCR gemessen. Die mRNA-Expression der Toll-like-Rezeptoren unterschied sich nicht signifikant zwischen HBeAg-positiven und -negativen Patienten bei der Normalisierung auf Housekeepinggene, bei der Normalisierung auf Marker von antigenpräsentierenden Zellen (CD80, CD86, β -2-Mikroglobulin) jedoch zeigte sich eine negative Korrelation zwischen Virämie und der intrahepatischen Expression von TLR2. Die Expression von Inhibitoren des Signalwegs (MD1 und Tollip) war signifikant höher in HBeAg-positiven Lebern und MD1 korrelierte mit der intrahepatischen Viruslast. Damit übereinstimmend wurde eine niedrigere Expression von den Signalwegmolekülen IRAK2, IKK α , JUN und FOS in HBV-infizierten Lebern gegenüber gesunden Kontrollen beobachtet. Die niedrigere Expression des TLR-Signalweges in HBV-infizierten Lebern könnte somit ein Hinweis auf eine Suppression des angeborenen Immunsystems durch das HBV sein.

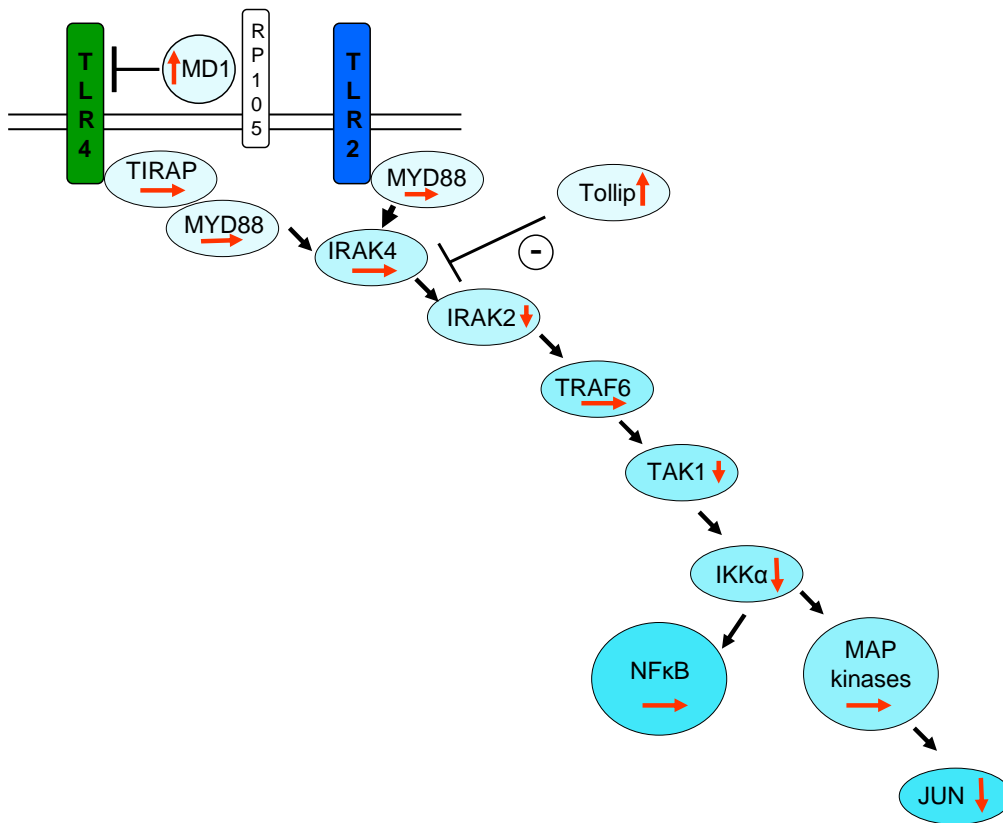


Abbildung 22: Zusammenfassung der intrahepatischen Expressionsunterschiede zwischen infizierten und gesunden Geweben (→ = kein Expressionsunterschied, ↓ = niedrigere Expression in infizierten Geweben, ↑ = höhere Expression in infizierten Geweben bzw. höhere Expression in hochvirämischen Patienten im Fall von MD1).

6. Abkürzungsverzeichnis

ACTB	β-Aktin
ALT	Alanin-Aminotransferase
APZ	Antigen-präsentierende-Zelle
AP-1	Activator protein 1
ATF2	Activating Transcription Factor 2
ATP	Adenosintriphosphat
BCP	Basalcore-Promotor
β-2-m	β-2-Mikroglobulin
ccc-DNA	Covalently closed circular DNA
CCL	Chemokine (C-C motif) ligand
CD	Cluster of Differentiation
c-DNA	Complementary DNA
CHB	Chronische Hepatitis B
chSP	Chlamydiales Heat Shock Protein
CSF	Kolonie stimulierender Faktor
CTL	Zytotoxischer T-Lymphozyt
C _t	Cycle threshold
CXCL	Chemokine (C-X-C motif) ligand
DNA	Deoxyribonucleic acid
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
HBcAg	Hepatitis-B-c-Antigen
HBeAg	Hepatitis-B-e-Antigen
HBsAg	Hepatitis-B-s-Antigen
HBxAg	Hepatitis-B-x-Antigen
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCC	Hepatozellulärs Karzinom
HCV	Hepatitis-C-Virus
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HMGB1	High-Mobility-Group-Protein B1
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
HTLV	Humanes T-lymphotropes Virus
IFN	Interferon
IL	Interleukin

IκB	Inhibitor of kappa B
IKK	IκB kinase
IRAK	IL-1 receptor-associated kinase
IRF	Interferon regulatory factor
KC	Kupffer-Zellen
LBP	LPS-binding protein
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	Leucine-rich repeats
LSEC	Sinusoidale Leberendothelzellen
LTA	Lymphotoxin alpha
MAL	MYD88-adaptor-like
MALP	Macrophage-activating lipopeptide
MAP	Mitogen-activated protein
MD-1/2	Myeloid differentiation factor 1/2
MMTV	Maus-Mammatumovirus
mRNA	Messenger RNA
MYD88	Myeloid differentiation primary response gene 88
μl	Mikroliter
NF-κB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
ng	Nanogramm
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NPZ	Nichtparenchymale Zellen
NS1	Non-structural protein 1
PAMP	Pathogen-associated molecular patterns
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PCR	Polymerase chain reaction
pDC	Plasmazytoide dendritische Zellen
pg	Pikogramm
pg-HBV-RNA	Prägenomische HBV-RNA
PRR	Pattern-recognition receptors
Rc-DNA	Relaxed circular DNA
RelA	V-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A
RIG-I-like receptor	Retinoic-acid-inducible-gene-I-like receptor
RIP	Receptor interacting protein
RNA	Ribonucleic acid
RPL13a	Ribosomales Protein L13a
Rpm	Revolutions per minute
RP105	Radioprotective 105
RSV	Respiratory syncytial virus
RT-PCR	Real-time PCR

siRNA	Small interfering RNA
ssRNA	Einzelstrang-RNA
TAB	TAK1-binding protein
TAK	TGF- β -activated kinase
TGF- β	Transforming growth factor β
T-H-Zellen	T-Helfer-Zellen
TIR	Toll/IL-1 receptor
TLR	Toll-like receptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TOLLIP	Toll interacting protein
TRAF6	TNF receptor associated factor 6
TRAM	TRIF-related adaptor molecule
TRIF	TIR-domain-containing adaptor inducing IFN β
ULN	Upper limit of normal
UPA	Urokinase-type plasminogen activator
VACV	Vaccinia-Virus
WHcAg	WHV core antigen
WHV	Woodchuck hepatitis virus
WNV	West Nile virus

7. Literaturverzeichnis

Abe T, Kaname Y, Hamamoto I, Tsuda Y, Wen X, Taguwa S, Moriishi K, et al. Hepatitis C virus nonstructural protein 5A modulates the toll-like receptor-MyD88-dependent signaling pathway in macrophage cell lines. *J Virol* 2007;81:8953-8966.

Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006;124:783-801.

Bowie AG, Unterholzner L. Viral evasion and subversion of pattern-recognition receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2008;8:911-922.

Charo IF, Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med* 2006;354:610-621.

Chen Z, Cheng Y, Xu Y, Liao J, Zhang X, Hu Y, Zhang Q, et al. Expression profiles and function of Toll-like receptors 2 and 4 in peripheral blood mononuclear cells of chronic hepatitis B patients. *Clin Immunol* 2008;128:400-408.

Dandri M, Murray JM, Lutgehetmann M, Volz T, Lohse AW, Petersen J. Virion half-life in chronic hepatitis B infection is strongly correlated with levels of viremia. *Hepatology* 2008;48:1079-1086.

Datta A, Sinha-Datta U, Dhillon NK, Buch S, Nicot C. The HTLV-I p30 interferes with TLR4 signaling and modulates the release of pro- and anti-inflammatory cytokines from human macrophages. *J Biol Chem* 2006;281:23414-23424.

Delves PJ, Roitt IM. The immune system. First of two parts. *N Engl J Med* 2000;343:37-49.

Delves PJ, Roitt IM. The immune system. Second of two parts. *N Engl J Med* 2000;343:108-117.

Divanovic S, Trompette A, Atabani SF, Madan R, Golenbock DT, Visintin A, Finberg RW, et al. Negative regulation of Toll-like receptor 4 signaling by the Toll-like receptor homolog RP105. *Nat Immunol* 2005;6:571-578.

Dufour JH, Dziejman M, Liu MT, Leung JH, Lane TE, Luster AD. IFN-gamma-inducible protein 10 (IP-10; CXCL10)-deficient mice reveal a role for IP-10 in effector T cell generation and trafficking. *J Immunol* 2002;168:3195-3204.

EASL Clinical Practice Guidelines: Management of chronic hepatitis B. *Journal of Hepatology* 50 (2009) 227–242.

Harte MT, Haga IR, Maloney G, Gray P, Reading PC, Bartlett NW, Smith GL, et al. The poxvirus protein A52R targets Toll-like receptor signaling complexes to suppress host defense. *J Exp Med* 2003;197:343-351.

Hibbs ML, Quilici C, Kountouri N, Seymour JF, Armes JE, Burgess AW, Dunn AR. Mice lacking three myeloid colony-stimulating factors (G-CSF, GM-CSF, and M-CSF) still produce macrophages and granulocytes and mount an inflammatory response in a sterile model of peritonitis. *J Immunol* 2007;178:6435-6443.

Hosel M, Quasdorff M, Wiegmann K, Webb D, Zedler U, Broxtermann M, Tedjokusumo R, et al. Not interferon, but interleukin-6 controls early gene expression in hepatitis B virus infection. *Hepatology* 2009;50:1773-1782.

Isogawa M, Robek MD, Furuichi Y, Chisari FV. Toll-like receptor signaling inhibits hepatitis B virus replication in vivo. *J Virol* 2005;79:7269-7272.

Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Semin Immunol* 2007;19:24-32.

Kawai T, Akira S. Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling. *Ann N Y Acad Sci* 2008;1143:1-20.

Kimura K, Kakimi K, Wieland S, Guidotti LG, Chisari FV. Activated intrahepatic antigen-presenting cells inhibit hepatitis B virus replication in the liver of transgenic mice. *J Immunol* 2002;169:5188-5195.

Kimura K, Kakimi K, Wieland S, Guidotti LG, Chisari FV. Interleukin-18 inhibits hepatitis B virus replication in the livers of transgenic mice. *J Virol* 2002;76:10702-10707.

Li K, Foy E, Ferreon JC, Nakamura M, Ferreon AC, Ikeda M, Ray SC, et al. Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:2992-2997.

Lütgehetmann M, Bornscheuer T, Volz T, Allweiss L, Bockmann JH, Pollok JM, Lohse AW, et al. Hepatitis B virus limits response of human hepatocytes to interferon-alpha in chimeric mice. *Gastroenterology* 2011;140:2074-2083, 2083 e2071-2072.

Maloney G, Schroder M, Bowie AG. Vaccinia virus protein A52R activates p38 mitogen-activated protein kinase and potentiates lipopolysaccharide-induced interleukin-10. *J Biol Chem* 2005;280:30838-30844.

McMahon BJ. The natural history of chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology* 2009;49:S45-55.

Menne S, Cote PJ. The woodchuck as an animal model for pathogenesis and therapy of chronic hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol* 2007;13:104-124.

Miyake K. Endotoxin recognition molecules, Toll-like receptor 4-MD-2. *Semin Immunol* 2004;16:11-16.

Petersen J, Dandri M, Mier W, Lutgehetmann M, Volz T, von Weizsacker F, Haberkorn U, et al. Prevention of hepatitis B virus infection in vivo by entry inhibitors derived from the large envelope protein. *Nat Biotechnol* 2008;26:335-341.

Seeger C, Mason WS. Hepatitis B virus biology. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000;64:51-68.

Shaulian E, Karin M. AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol* 2002;4:E131-136.

Shepard CW, Simard EP, Finelli L, Fiore AE, Bell BP. Hepatitis B virus infection: epidemiology and vaccination. *Epidemiol Rev* 2006;28:112-125.

Stack J, Haga IR, Schroder M, Bartlett NW, Maloney G, Reading PC, Fitzgerald KA, et al. Vaccinia virus protein A46R targets multiple Toll-like-interleukin-1 receptor adaptors and contributes to virulence. *J Exp Med* 2005;201:1007-1018.

Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 2003;21:335-376.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002;3:RESEARCH0034.

Vierling JM. The immunology of hepatitis B. *Clin Liver Dis* 2007;11:727-759, vii-viii.

Visvanathan K, Skinner NA, Thompson AJ, Riordan SM, Sozzi V, Edwards R, Rodgers S, et al. Regulation of Toll-like receptor-2 expression in chronic hepatitis B by the precore protein. *Hepatology* 2007;45:102-110.

Volz T, Lutgehetmann M, Wachtler P, Jacob A, Quaas A, Murray JM, Dandri M, et al. Impaired intrahepatic hepatitis B virus productivity contributes to low viremia in most HBeAg-negative patients. *Gastroenterology* 2007;133:843-852.

Wang T, Town T, Alexopoulou L, Anderson JF, Fikrig E, Flavell RA. Toll-like receptor 3 mediates West Nile virus entry into the brain causing lethal encephalitis. *Nat Med* 2004;10:1366-1373.

Webster GJ, Reignat S, Maini MK, Whalley SA, Ogg GS, King A, Brown D, et al. Incubation phase of acute hepatitis B in man: dynamic of cellular immune mechanisms. *Hepatology* 2000;32:1117-1124.

Wieland S, Thimme R, Purcell RH, Chisari FV. Genomic analysis of the host response to hepatitis B virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:6669-6674.

Wieland SF, Chisari FV. Stealth and cunning: hepatitis B and hepatitis C viruses. *J Virol* 2005;79:9369-9380.

Wilson JR, de Sessions PF, Leon MA, Scholle F. West Nile virus nonstructural protein 1 inhibits TLR3 signal transduction. *J Virol* 2008;82:8262-8271.

Wu J, Lu M, Meng Z, Trippler M, Broering R, Szczeponek A, Krux F, et al. Toll-like receptor-mediated control of HBV replication by nonparenchymal liver cells in mice. *Hepatology* 2007;46:1769-1778.

Wu J, Meng Z, Jiang M, Pei R, Trippler M, Broering R, Bucchi A, et al. Hepatitis B virus suppresses toll-like receptor-mediated innate immune responses in murine parenchymal and nonparenchymal liver cells. *Hepatology* 2009;49:1132-1140.

8. Danksagung

Nach einem Jahr Laborarbeit habe ich allen Grund, mich sehr herzlich bei allen der AG Petersen zu bedanken, die mich in diesem Jahr unterstützt haben.

Vor allem danke ich Prof. Jörg Petersen und PD Maura Dandri, die mir neben einem interessanten Thema die eigene Präsentation der Daten auf Kongressen und eine ausführliche fachliche Betreuung ermöglicht haben. Außerdem bedanke ich mich bei Dr. Tassilo Volz und Dr. Marc Lütgehetmann, die mir täglich in der Laborpraxis weitergeholfen haben. Insgesamt hat die Arbeit in der netten Atmosphäre der AG sehr viel Spaß gemacht und mich in Vielem bereichert.

Des weiteren bedanke ich mich bei PD Johannes Herkel und Prof. A.W. Lohse für das Stipendium des Graduiertenkollegs „Entzündung und Regeneration“.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Eltern, die mich finanziell und moralisch während meines ganzen Studiums gestützt haben und denen ich diese Arbeit widme.

9. Lebenslauf

Geboren: 11.09.1983

Vater: Dr. Hans Wilhelm Bockmann (Arzt)

Mutter: Dr. Heike Bockmann (Juristin)

Geschwister: Frederik Bockmann (Student)
Benjamin Bockmann (Student)

Schulische Laufbahn: Hermann-Ehlers-Grundschule 1990-1994
Orientierungsstufe Osternburg in Oldenburg
1994-1996
Altes Gymnasium Oldenburg 1996-2003

Pflegepraktika: 1. Bundeswehrkrankenhaus Bad Zwischenahn
2003: Orthopädische Station
2. Orthopädische Klinik König-Ludwig-Haus
Würzburg 2003: Orthopädische Station

Studium: Gaststudierender an der Universität Würzburg
im Sommersemester 2004: Chemie und Physik
Medizinstudium seit 10/04 an der Universität
Hamburg
Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung: 09/06
Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung: 05/11
Endnote: 1,8

Famulaturen:

1. Klinikum Oldenburg 2007: Internistische Station
2. Asklepiosklinik Harburg 2009: Anästhesie
3. Asklepiosklinik Altona 2009: Radiologie
4. Ifi-Institut Hamburg 2010: Gastroenterologie, Infektiologie

Praktisches Jahr:

1. Asklepiosklinik Wandsbek 2010: Chirurgie
2. Royal Northshore Hospital Sydney/Asklepiosklinik Harburg 2010: Radiologie
3. UKE Hamburg 2010: Innere Medizin

Stipendium:

Graduiertenkolleg „Entzündung und Regeneration“ 2007-08

Beruf:

seit 01.12.11 Assistenzarzt der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik des Zentrums für Innere Medizin des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf

Veröffentlichungen:

Lütgehetmann M, Bornscheuer T, Volz T, Allweiss L, Bockmann JH, Pollok JM, Lohse AW, Petersen J, Dandri M. Hepatitis B virus limits response of human hepatocytes to interferon- α in chimeric mice. *Gastroenterology* 2011; 140:2074-83.

Vorträge:

International HBV Meeting San Diego 08/08

EASL Kopenhagen 04/09

Auslandsaufenthalte:

07/10-09/10 in Sydney, AUS (Zweiter Teil des Praktischen Jahres am Royal North Shore Hospital)

10. Eidesstattliche Erklärung

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: