

**Monoklonalität Hepatitis B surface Antigen-positiver  
Leberzellareale bei chronischer  
Hepatitis-B-Virus-Infektion**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität  
Bonn

**Verena Theresia Otto**

aus Rottweil a. N.

2017

Angefertigt mit der Genehmigung  
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Reinhard Büttner
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Ulrich Spengler

Tag der Mündlichen Prüfung: 16.05.2017

Aus dem Institut für Pathologie  
Ehemaliger Direktor: Prof. Dr. med. R. Büttner  
Amtierender Direktor: Prof. Dr. med. G. Kristiansen

## Inhaltsverzeichnis

	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>6</b>
<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>8</b>
1.1	<u>Epidemiologie</u>	8
1.2	<u>Infektion, Infektionsverlauf und Immunpathogenese</u>	8
1.3	<u>Leberregeneration</u>	9
1.3.1	Immunreaktion und Leberzellschädigung	9
1.3.2	Hepatische Stammzellen	10
1.3.3	Modelle der hepatischen Regeneration	11
1.3.4	Histologischer Nachweis klonaler Zellproliferate	12
1.3.4.1	Cytochrom-c-Oxidase	12
1.3.4.2	Nachweis klonaler Zellproliferate durch die Cytochrom-c-Oxidase-Färbung	12
1.4	<u>Serologische Diagnostik</u>	13
1.4.1	Anti-HBc	13
1.4.2	Anti-HBs	14
1.4.3	HBeAg	15
1.4.4	Aktivitätsmarker: Anti-HBe und HBV-DNA	15
1.4.5	Diagnostisches Vorgehen nach aktuellen Leitlinien	15
1.5	<u>Histologische Diagnostik</u>	16
1.5.1	Chronische Hepatitis	16
1.5.2	Immunhistochemie	17
1.5.2.1	HBcAg und HBsAg	18
1.5.2.2	HBeAg	18
1.5.2.3	HBXAg	18
1.5.3	Expressionstypen	18
1.5.4	Korrelation von Immunhistochemie und Lichtmikroskopie	21
1.6	Zielsetzung	21
<b>2.</b>	<b>Literaturübersicht:</b>	<b>23</b>
	Zytologische und genetische Grundlagen der HBsAg-Expression	
2.1	<u>Virusaufbau und Genomorganisation des Hepatitis-B-Virus</u>	23
2.1.1	Replikation	25

2.1.2	Formen viraler DNA	26
2.2	<u>Hepatitis-B-Virus-Mutanten</u>	27
2.2.1	S-Gen-Mutanten	27
2.2.2	P-Gen-Mutanten	28
2.2.3	PräCore/Core-Mutanten	28
2.3	<u>Zytologische und genetische Grundlagen der HBsAg-Expression</u>	28
2.3.1	Zelluläre HBsAg-Expression durch Integration	28
2.3.2	Zelluläre HBsAg-Expression durch PräS-Genmutation	30
2.3.2.1	Einfluss von LHBS auf die cccDNA-Synthese	32
<b>3.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>35</b>
3.1	Untersuchungsmaterial	35
3.1.1	Materialsuche, Auswahl der Gewebeproben und Erhebung klinischer Daten	35
3.2	Histologische Färbungen	36
3.2.1	Hämatoxilin Eosin (HE)-Färbung	36
3.2.2	Immunhistochemische Färbungen	36
3.2.2.1	Hepatitis B surface Antigen (HBsAg)-Färbung	37
3.2.2.2	Cytochrom-c-Oxidase (COX)-Färbung	37
3.3	Ergebnisdokumentation der Serienschnitte	37
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>39</b>
4.1	HBsAg-Färbung	39
4.2	COX-Färbung	40
4.3	Vergleich der Patches in HBsAg- und COX-Färbung	40
4.4	Vergleich klinischer Daten und Morphometrie der Patches	43
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>47</b>
5.1	Monoklonalität HBsAg-positiver Patches	47
5.2	HBsAg-Expressionsmuster und HBV-Infektionsverlauf	49
5.3	Morphometrie HBsAg-positiver klonaler Proliferate	50
5.3.1	Prämaligne Transformation	51
5.3.2	Leberregeneration und Immunselektion	51
5.3.3	Regenerative Kapazität und Stammzellaktivierung	52

5.4	Klonale Prolifere in Lebergewebe mit chronischer HBV-Infektion	53
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>60</b>
<b>7.</b>	<b>Anhang</b>	<b>62</b>
7.1	Abbildungsverzeichnis	62
7.2	Tabellenverzeichnis	62
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>63</b>
<b>9.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>69</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
cccDNA	covalently closed circular Desoxyribonukleinsäure
CK 19	Cytokeratin 19
COX	Cytochrom-c-Oxidase
CRP	C-reaktives Protein
CTL	Cytotoxische T-Lymphozyten
DMP	doppelt markierter Patch
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsIDNA	double stranded linear Desoxyribonukleinsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum
GGT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCV	Hepatitis-C-Virus
HBcAg	Hepatitis B core Antigen
HBeAg	Hepatitis B e Antigen
HBsAg	Hepatitis B surface Antigen
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HDV	Hepatitis-D-Virus
HE	Hämatoxilin Eosin
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
i.v.	intravenös
KAS	Klinisches Arbeitsplatz System
kb	Kilobasen
LHBs	Large Hepatitis B surface Antigen
MHBs	Middle Hepatitis B surface Antigen
MHC I	Major Histocompatibility Complex I

mRNA	messenger Ribonukleinsäure
nm	Nanometer
ORF	Open Reading Frame
PCR	Polymerasekettenreaktion
pgRNA	prägenomische Ribonukleinsäure
pdsDNA	partiell doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
RNA	Ribonukleinsäure
SHBs	Small Hepatitis B surface Antigen

## 1. Einleitung

### 1.1 Epidemiologie

Hepatitis B ist eine der weltweit häufigsten Infektionskrankheiten: etwa 350 Millionen Menschen leiden unter einer chronischen Infektion (Lavanchy, 2004), die Durchseuchungsrate wird auf ein Drittel der Weltbevölkerung geschätzt. Etwa 25 % aller chronisch Infizierten sind von chronisch aktiver Hepatitis, Leberzirrhose und hepatozellulärem Karzinom betroffen (WHO, 2002). Die chronische Hepatitis-B-Virus (HBV)-Infektion ist der wichtigste Risikofaktor für die Entstehung des hepatozellulären Karzinoms (Beasley, 1981). Jährlich sterben etwa 320.000 Menschen an den Folgen eines hepatozellulären Karzinoms, die Gesamtzahl der durch HBV verursachten Todesfälle wird auf 500.000 bis eine Million geschätzt (Lavanchy, 2004). Mit einem Anteil von 0,6 % chronisch Infizierter und 7 % durchgemachter Infektionen zählt Deutschland zu den Ländern mit niedriger Durchseuchung (RKI, 2013). Regionen mit hoher Prävalenz sind Afrika, Südamerika, Südostasien und Osteuropa (Sorrell, 2009).

### 1.2 Infektion, Infektionsverlauf und Immunpathogenese

Das Hepatitis-B-Virus wird perkutan durch Blut-zu-Blut-Kontakt, durch Sexualkontakte oder perinatal übertragen. Infektionsquelle sind chronisch HBV-infizierte Personen, insbesondere symptomarme oder -freie Infizierte mit hoher Virämie (RKI, 2013). Hochrisikogruppen sind i.v.-Drogenabhängige, Dialysepatienten, medizinisches Personal, Haushaltsangehörige und Sexualpartner HBV-infizierter Personen, homosexuelle Männer, promiskuitiv lebende Heterosexuelle und Personen mit Migrationshintergrund aus Regionen erhöhter HBV-Prävalenz (Cornberg, 2011).

Nach einer Inkubationszeit von durchschnittlich 2-4 Monaten und einem Prodromalstadium mit unspezifischen Symptomen entwickeln ca. ein Drittel der HBV-Infizierten einen Ikterus. Je ein weiteres Drittel der Infektionen verläuft anikterisch oder vollkommen asymptomatisch. Nach akuter HBV-Infektion heilen in Industrienationen ca. 90 % der Infektionen aus, 10 % nehmen einen chronischen Verlauf (RKI, 2013).

Die chronische Hepatitis B ist definiert als Fortbestehen der HBV-Infektion mit positivem Hepatitis B surface Antigen (HBsAg) für länger als 6 Monate. Der klinische Verlauf der chronischen Infektion ist hochvariabel und kann sich als histologisch nachweisbare entzündliche Leberzellschädigung mit Transaminasenerhöhung im Serum manifestieren



(Cornberg, 2011). Etwa 0,5-1 % aller Infektionen verlaufen fulminant und verursachen unbehandelt ein akutes Leberversagen (RKI, 2013).

Im Gegensatz dazu ist auch ein symptomarmer Verlauf ohne aktuelle Zeichen einer Leberzellschädigung möglich. Dieser niedrig virämische HBsAg-Trägerstatus kann im Sinne einer Reaktivierung wieder in eine aktive chronische Infektion übergehen. Auch ein vollkommen symptomfreier Verlauf ohne Leberzellschädigung bei gleichzeitig persistierend hoher Virämie ist möglich (sog. hochvirämischer Träger). Dieser tritt gehäuft bei Kindern oder Immunsupprimierten auf (Cornberg, 2011).

Das Konzept der Immunpathogenese wird für das Verständnis der variablen klinischen Verlaufsformen sowie der Ausheilung oder Chronifizierung der Infektion als wichtig erachtet. Demzufolge entsteht die Zellschädigung nicht durch eine direkt zytopathische Wirkung des Virus selbst, sondern wird durch die Immunabwehr des Infizierten vermittelt (Bianchi und Gudat, 1975; Cornberg, 2011).

Klinisch wird diese Theorie unter anderem dadurch bestätigt, dass die Reaktivierung einer chronischen Infektion durch Immunsuppression ausgelöst werden kann (Bianchi und Gudat, 1979). Sie erklärt auch den umgekehrt proportionalen Verlauf von Alter und Chronifizierungsrisiko. Während im Erwachsenenalter nur 10 % der Infizierten eine chronische, häufig klinisch manifeste Infektion entwickeln, verlaufen 90 % der Infektionen bei Kindern als chronischer symptomfreier HBsAg-Trägerstatus (RKI, 2013). Davon betroffen sind meist perinatal infizierte Säuglinge HBV-positiver Mütter. Die vertikale Übertragung des Virus spielt vor allem in Hochprävalenzländern eine Rolle und verursacht dort bis zu 20 % der chronischen HBV-Verläufe (Weber, 2005).

### 1.3 Leberregeneration

#### 1.3.1 Immunreaktion und Leberzellschädigung

Die Immunantwort zur Abwehr einer akuten HBV-Infektion umfasst sowohl humorale als auch zelluläre Komponenten: Die Bildung von Antikörpern gegen das HBsAg verhindert die Ausbreitung im Blut zirkulierender Viren (Zoulim, 2005). Eine entscheidende Rolle bei der Viruskontrolle durch Beseitigung infizierter Hepatozyten spielen die zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) (Busca, 2014). Sie erkennen infizierte Zellen anhand vonprozessierten viralen Antigenen, die durch Major Histocompatibility Complex I (MHC I)-Moleküle an der Zelloberfläche präsentiert werden (Chisari, 1995). Durch die nun folgende Einleitung eines programmierten Zelltodes und die Ausschüttung von Cytokinen sind

CTL einerseits in der Lage die Virusreplikation wirkungsvoll zu reduzieren, verursachen dabei aber einen erheblichen Leberschaden, der durch Proliferation von Leberzellen oder hepatozytärer Vorläufer kompensiert werden muss (Busca, 2014).

### 1.3.2 Hepatische Stammzellen

Der Erhalt des Lebergewebes erfordert eine ständige Zellneubildung zum Ersatz alternierender Hepatozyten. Der Zellumsatz im Lebergewebe wird durch die HBV-Infektion enorm gesteigert. Im Rahmen der physiologischen Gewebsregeneration wird täglich nur ein Bruchteil (ca. 0,01 %) der Zellen erneuert. Es wird geschätzt, dass im Rahmen der Ausheilung einer akuten Hepatitis täglich bis zu 10 % der Parenchymmenge ersetzt wird. Auch bei der chronischen Hepatitis B ist der Zellumsatz auf etwa 1-5 % pro Tag erhöht (Mason, 2008).

Hepatozyten sind hoch differenzierte Zellen, die zahlreiche Stoffwechselfunktionen übernehmen. Ihre Lebensdauer beträgt etwa ein Jahr, ohne äußere Einflüsse ist der Zellumsatz des Lebergewebes daher relativ niedrig (Alison, 2009). Erstaunlicherweise verfügen Hepatozyten dennoch über eine hohe Regenerationsfähigkeit und können einen Zellverlust durch Replikation und Mitose ersetzen. Nach Resektion von zwei Dritteln der Leber oder toxisch induzierter Schädigung kann im Tierversuch mit Ratten die fehlende Parenchymmasse innerhalb von 10 Tagen vollständig ersetzt werden (Bralet, 1994).

Wie Hepatozyten besitzen auch Stammzellen eine hohe Teilungskapazität (Alison, 2004). Im Mausmodell wurden Hepatozyten, die aufgrund eines Enzymdefektes des Wirtstieres einen selektiven Wachstumsvorteil hatten, durch Injektion transplantiert. Durch mehrfache Wiederholung des Versuches konnten Zellen selektiert werden, die sich nachweislich mindestens 69 Mal geteilt hatten. Das entspricht in etwa der Teilungskapazität hämatopoetischer Stammzellen (Overturf, 1997). Die maximale Anzahl möglicher Zellteilungen, die menschliche Leberzellen vor dem Erreichen der Seneszenz durchlaufen können, ist unbekannt. Aufgrund ihrer Eigenschaft, bei moderater Zellschädigung in die G1-Phase des Zellzyklus überzutreten, gelten Hepatozyten als funktionelle Stammzellen (Alison, 2009).

Bei erheblicher Leberzellschädigung, besonders bei chronischen Erkrankungen wie der Hepatitis B, kann ein weiteres Stammzellkompartiment der Leber aktiviert werden, das sich in der Nähe der Gallengänge befindet (Alison, 2009). In Mausmodellen lassen sich diese Zellproliferationen durch Einsatz von Karzinogenen erzeugen und wurden wegen

der Form ihres Zellkerns *oval cells* genannt (Alison, 2004). Beim Menschen entsprechen sie den sog. dukulären Reaktionen, die erstmals 1999 immunhistochemisch nachgewiesen wurden (Theise, 1999). Es handelt sich um Zellen, die aus den terminalen Aufzweigungen der Gallenwege, Hering-Kanälchen genannt, stammen. Sie sind bipotent und können sich im weiteren Verlauf zu Cholangiozyten oder Hepatozyten differenzieren (Alison, 2004). Die funktionelle Stammzellkapazität der Hepatozyten und die gleichzeitige Existenz eines Stammzellkompartiments in Gallengangsnähe stehen dabei nicht im Widerspruch zueinander. Die Hepatozyten gelten als Träger der Leberregeneration bei moderaten Schädigungen. Tritt ein schwerer Zellschaden auf oder ist die replikative Kapazität der Hepatozyten erschöpft, können die bipotenten hepatischen Progenitorzellen aktiviert werden (Alison, 2009).

### 1.3.3 Modelle der hepatischen Regeneration

Derzeit gibt es kein einheitliches Modell, das die Entstehung des Lebergewebes durch Teilung hepatischer Vorläuferzellen und anschließende Migration der Tochterzellen beschreibt. Zajicek entwickelte 1985 die Streaming-Liver-Hypothese, die von einem unidirektionalen Fluss der Hepatozyten aus der Portalregion in Richtung der Zentralvene ausgeht. Er stützt seine These auf die Markierung von Hepatozyten in Ratten durch Injektion von Tritium-Thymidin. Eine Beobachtung der markierten Zellen in Intervallen von mehreren Wochen zeigte eine Bewegung der Zellen in Richtung Portalvene mit einer Geschwindigkeit von durchschnittlich 2  $\mu\text{m}$  pro Tag (Zajicek, 1985).

Im Widerspruch dazu stehen die Ergebnisse von Bralet, die für eine Zellteilung ohne anschließende Migration der Tochterzellen sprechen. Nach partieller Hepatektomie wurden Hepatozyten durch Einbau des *Escherichia coli*- $\beta$ -Galactosidase-Gens über einen retroviralen Vektor markiert. Bei der histologischen Auswertung im Abstand von drei Tagen, fünfzehn Tagen und fünfzehn Monaten zeigten sich Gruppen markierter Hepatozyten mit einer annähernd gleichmäßigen Verteilung im Leberparenchym. Im zeitlichen Verlauf wurde eine Größenzunahme der Zellgruppen beobachtet, ihre Verteilung auf die drei Zonen des Rappaport'schen Leberazinus blieb aber konstant, was einer postmitotischen Zellwanderung im Sinne der *streaming liver* widerspricht (Bralet, 1994).

Eine entscheidende Beobachtung im Hepatektomieversuch von Bralet ist die Beschreibung der größer werdenden markierten Zellgruppen, die nach 15 Monaten bis zu 30 Hepatozyten umfassten. Ähnliche Zellgruppen wurden bereits 1976 bei Versuchen mit

genetisch markierten chimären Mäusen beschrieben. Ein markiertes Gewebsareal wurde als „Patch“ bezeichnet und ist definiert als zusammenhängende Gruppe von Zellen mit identischem Genotyp (Nesbitt, 1974; West, 1976). Die Größe und Ausdehnung eines solchen Patches wird durch den Prozess der Zellteilung und -migration bei der Bildung und Regeneration des Herkunftsgewebes bestimmt. Diese folgen dem Konzept des limitierten kohärenten klonalen Wachstums (Nesbitt, 1974).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass unterschiedliche und zum Teil widersprüchliche Theorien der Leberregeneration existieren. Es ist nicht geklärt, ob Leberzellen migrieren und in welchem Maß differenzierte Hepatozyten oder andere Vorläuferzellen zur Gewebserneuerung beitragen. Eine wichtige Gemeinsamkeit besteht jedoch in der Annahme, dass die Leber aus klonalen Gewebsarealen besteht, die auf dieselbe Vorläuferzelle zurückzuführen sind.

#### 1.3.4 Histologischer Nachweis klonaler Zellproliferate

##### 1.3.4.1 Cytochrom-c-Oxidase

Die Cytochrom-c-Oxidase (COX) ist ein in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiertes Protein der Atmungskette. Es dient dem gerichteten Membrantransport von Protonen. Der so erzeugte Gradient wird zur Produktion von Adenosintriphosphat (ATP) als Energielieferant der Zelle genutzt. Die drei größten der insgesamt 10 Untereinheiten der COX werden von der mitochondrialen Desoxyribonukleinsäure (DNA) codiert (Capaldi, 1990).

Das mitochondriale Genom ist ein ca. 16,6 kb langes, zirkuläres DNA-Molekül. Verglichen mit der nukleären DNA weist es eine relativ hohe Mutationsfrequenz auf, was auf das Fehlen von Histonen und auf das weniger effiziente mitochondriale DNA-Reparatursystem zurückgeführt wird (Lin, 2010). Das mitochondriale Genom wird maternal vererbt, indem die Organellen bei jeder mitotischen Zellteilung zufällig auf beide Tochterzellen verteilt werden. Diese Eigenschaften können genutzt werden, um Zellen unterschiedlichen Gewebes auf eine gemeinsame Abstammung hin zu untersuchen (Fellous, 2009b; Greaves, 2005).

##### 1.3.4.2 Nachweis klonaler Zellproliferate durch die Cytochrom-c-Oxidase-Färbung

Jede Zelle kann bis zu mehrere 1.000 Mitochondrien enthalten und verfügt daher über unterschiedliche Mengen von mutierter und nicht-mutierter mitochondrialer DNA. Mitochondriale Mutationen können die Aktivität der COX verändern. Deshalb liegt theore-

tisch in jeder Zelle ein unterschiedlicher Aktivitätsgrad der COX vor, der sich aus der Summe der angesammelten mitochondrialen DNA-Mutationen innerhalb dieser Zelle ergibt.

Eine phänotypisch sichtbare Änderung der COX-Aktivität entsteht allerdings erst, sobald ein ausreichend großer Anteil der mitochondrialen DNA in einer Zelle mutiert ist. Sind alle Mitochondrien einer Zelle am selben Genort mutiert, bezeichnet man diese als homoplasmatisch. Im Gegensatz dazu bezeichnet Heteroplasmie das Vorliegen von mutierten und nicht-mutierten Mitochondrien in derselben Zelle. Beträgt der Heteroplasmiegrad einer Mutation mehr als 80 %, kann ein Unterschied der COX-Enzymaktivität mittels immunhistochemischer Färbung nachgewiesen werden (Lin, 2010). Dieser wird als Anfärbung eines umschriebenen Gewebsareales sichtbar. Diese Zellgruppen, „Patches“ genannt, sind scharf begrenzt und liegen häufig in unmittelbarer Nachbarschaft zu Portalfeldern. Da die Zeitspanne zur Etablierung mitochondrialer Mutationen in einer Population mehrere Jahre beträgt, werden nur Nachkommen langlebiger Vorläuferzellen oder Stammzellen detektiert (Fellous, 2009a).

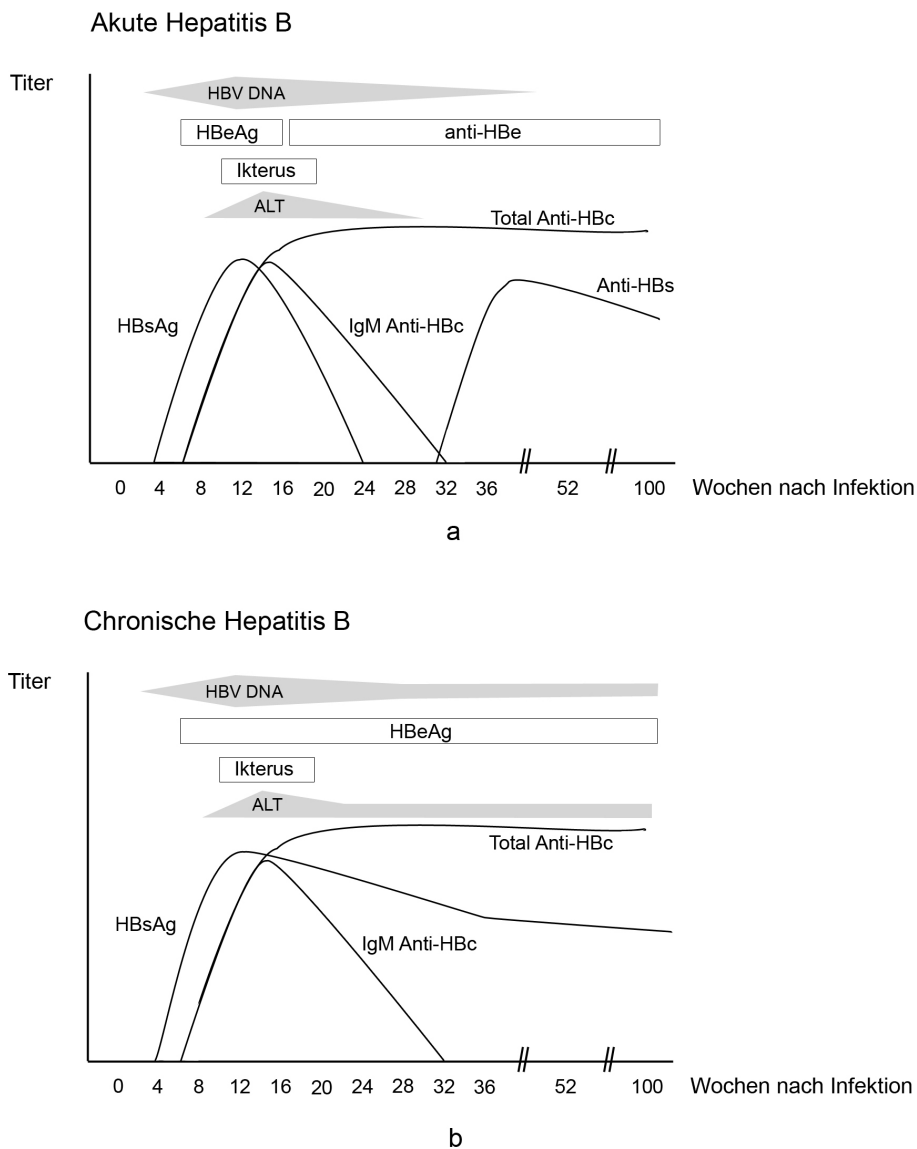
Das mitochondriale Genom verschiedener Hepatozyten desselben Patches wurde nach gezieltem Herausschneiden per Lasermikrodissektion durch Sequenzanalyse untersucht. So konnte belegt werden, dass alle Zellen einer Zellgruppe in der Leber dieselbe Markermutation der mitochondrialen DNA enthalten, und somit von einer gemeinsamen Vorläuferzelle abstammen (Adam, 2012; Fellous, 2009b). Die COX-Färbung kann also zur Darstellung klonaler Zellgruppen in verschiedenen Geweben genutzt werden.

#### 1.4 Serologische Diagnostik

Im Verlauf einer akuten, selbstlimitierenden HBV-Infektion lassen sich bestimmte virale Antigene und gegen sie gerichtete Antikörper in einer regelhaften Abfolge im Blut infizierter Personen nachweisen (s. Abb. 1). Übliche serologische Tests sind der Nachweis von HBsAg und HBeAg, sowie von Anti-HBs, Anti-HBe und Anti-HBc.

##### 1.4.1 Anti-HBc

Anti-HBc ist ein lebenslang persistierender Antikörper, der sich gegen das Hepatitis B core Antigen (HBcAg), einen Bestandteil des HBV-Partikels, richtet. Anti-HBc kann in der Regel einige Monate bis ein Jahr nach Infektionsbeginn nachgewiesen werden. Er wird auch als „immunologisches Gedächtnis“ bezeichnet und weist auf eine durchgemachte oder chronische HBV-Infektion hin (Theise, 2007).



**Abb. 1:** Serologische Marker der Hepatitis-B-Infektion.

(a) Verlauf bei akuter Hepatitis B. (b) Verlauf bei chronischer Hepatitis B mit fehlender Serokonversion zu Anti-HBs und Anti-HBe (modifiziert nach Liang, 2009).

#### 1.4.2 Anti-HBs

Anti-HBs ist gegen in der viralen Hülle enthaltenes HBsAg gerichtet und verhindert durch Komplexbildung die Ausbreitung infektiöser Partikel über das Blut. Anti-HBs ist daher Träger der schützenden Immunantwort (Modrow, 2003). Die Antikörperbildung kann durch Impfung induziert werden.

HBsAg tritt als erstes im Blut nachweisbares Antigen durchschnittlich 1-6 Monate nach Infektion auf. Da im Fall einer wirksamen humoralen Immunantwort der Zeitraum zwischen dem Verschwinden von HBsAg und dem möglichen Nachweis von Anti-HBs meh-

rere Wochen betragen kann, entsteht ein diagnostisches Fenster. Währenddessen ist Anti-HBc der einzige serologische Marker zur Diagnose einer HBV-Infektion (Theise, 2007).

#### 1.4.3 HBeAg

Hepatitis B e Antigen (HBeAg) ist kein struktureller Bestandteil des HBV und für dessen Lebenszyklus nicht essentiell (Modrow, 2003). Es kann kurz nach Erscheinen von HBsAg nachgewiesen werden. Hohe HBeAg-Spiegel sind Hinweis auf eine hohe Virämie. Eine mögliche Erklärung könnte die Koregulation der precoreRNA und der pgRNA sein (Block, 2007). Außerdem wird dem HBeAg eine Immuntoleranz induzierende Wirkung zugeschrieben, die möglicherweise auf Unterdrückung der cytotoxischen T-Zell-Antwort gegen gemeinsame Epitope von HBeAg und HBcAg beruht (Mason, 2008). Die Infektion mit HBeAg-negativen Virusmutanten hat eine erheblich schlechtere Prognose als beim HBeAg produzierenden Wildtyp (Carman, 1989). Auch die Immuntoleranz infizierter Neugeborener im Fall einer perinatalen Virusübertragung durch HBV-infizierte Mütter wird mit dem HBeAg in Zusammenhang gebracht. Aufgrund seiner Plazentagängigkeit ist HBeAg vermutlich mitverantwortlich für eine pränatale Induktion der Immuntoleranz (Modrow, 2003).

#### 1.4.4 Aktivitätsmarker: Anti-HBe und HBV-DNA

Da mit Serokonversion zu Anti-HBe oft eine fallende Viruslast einhergeht, gilt sie als Zeichen einer partiellen Immunkontrolle mit günstiger Prognose (Block, 2007). Die Bedeutung der HBeAg-Bestimmung nimmt in der Praxis ab: Trotz Anti-HBe-Serokonversion bei kann chronisch Infizierten oft ein Fortbestehen der Virusreplikation mit im Verlauf auftretender Leberschädigung beobachtet werden (Hadziyannis, 1983; Su, 1986). Ein Grund dafür ist die zunehmende Zahl hochvirämischer Verläufe bei HBeAg-negativen Patienten im Rahmen einer PräCore/Core-Mutation (Block, 2007).

Die HBeAg-Bestimmung wird zunehmend durch die Quantifizierung der HBV-DNA ersetzt. Es existieren sehr sensitive Verfahren, die durch Amplifikation der DNA per Polymerasekettenreaktion (PCR) einen Nachweis bereits in der Frühphase der Infektion mehrere Wochen vor Auftreten des HBsAg ermöglichen (RKI, 2013).

#### 1.4.5 Diagnostisches Vorgehen nach aktuellen Leitlinien

Bei Verdacht auf Vorliegen einer HBV-Infektion sollten zunächst HBsAg und Anti-HBc

bestimmt werden. Bei isoliert positivem Anti-HBc dient die Differenzierung von Anti-HBc-IgM und -IgG der Unterscheidung von akuter und durchgemachter Infektion. Die Ausheilung der Hepatitis ist definiert als Anti-HBs-Serokonversion (Titer > 10U/l), weshalb bei erstmals aufgefallenem Anti-HBc-IgG eine Anti-HBs-Titerkontrolle erfolgen sollte.

Eine Bestimmung der o.g. Aktivitätsmarker ist in der Regel nur bei chronischer Hepatitis zur Beurteilung des Therapieerfolges oder zur posttherapeutischen Verlaufskontrolle erforderlich (Cornberg, 2011).

### 1.5 Histologische Diagnostik

Derzeit wird die Durchführung einer Leberbiopsie bei Vorliegen einer chronischen HBV-Infektion empfohlen. Ziel ist die Einschätzung des Erkrankungsverlaufes und der Prognose sowie der Notwendigkeit einer antiviralen Therapie. Jeder Biopsiebefund soll eine Beantwortung folgender Fragen ermöglichen:

1. Bestimmung der entzündlichen Aktivität (Grading)
2. Bestimmung des Fibroseausmaßes (Staging)
3. Aussagen zur Ätiologie (insbes. Komorbidität) (Cornberg, 2011).

#### 1.5.1 Chronische Hepatitis

Obligates Kriterium einer chronischen Hepatitis im histopathologischen Sinn ist das Vorliegen eines entzündlichen Infiltrates mit portaler Prädominanz (Schirmacher, 2004). Dieses ist wesentlich dichter als bei akuter Hepatitis und kann sich auf einige oder auch alle Portalfelder erstrecken (Theise, 2007). Je nach Ausdehnung des entzündlichen Infiltrates wird die HBV-Infektion in unterschiedliche Aktivitätsgrade eingeteilt. Bleibt dieses auf das Portalfeld beschränkt, spricht man vom Bild einer chronisch persistierenden Hepatitis. Eine Ausdehnung der Entzündung auf die periportal gelegenen Hepatozyten wird als Grenzzonenhepatitis bezeichnet und gilt als Zeichen einer chronisch aktiven Hepatitis. Wegen des Auftretens punktueller Nekrosen in diesem Bereich wurde das Phänomen ursprünglich als Mottenfraßnekrosen bezeichnet (Theise, 2007).

Anstelle der früher üblichen Bezeichnungen chronisch persistierende bzw. -aktive Hepatitis wird der Aktivitätsgrad heute gemäß einem Gradingsscore, z. B. dem Score nach Desmet, angegeben (s. Abb. 2) (Schirmacher, 2004).

Die chronische Entzündung bildet die Grundlage für eine vom portalen Stroma ausgehende Fibrosierung des Lebergewebes. Der Fibrosierungsgrad (Staging) ist der



Grading (Desmet, 1994):

Grad	verbal	analoger HAI-Score	histologische Merkmale*
1	minimal	1-3	geringe portale Entzündungszellinfiltration, keine oder minimale azinäre Parenchymzelluntergänge oder Entzündungszellinfiltrate, keine Grenzzonenhepatitis
2	mild/ geringgradig	4-8	geringe oder mäßige portale Entzündungszellinfiltration, geringe, fokale Grenzzonenhepatitis, einzelne parenchymatöse Einzellnekrosen, keine Gruppennekrose
3	mäßig/ mittelgradig	9-12	erhebliche (mäßige bis schwere) portale Entzündungszellinfiltration, erhebliche Grenzzonenhepatitis, zahlreiche azinäre Einzellnekrosen, evtl. einzelne Gruppennekrosen, keine Brücken oder panlobulären Nekrosen
4	schwer/ hochgradig	13-18	schwere portale Entzündungszellinfiltration und Grenzzonenhepatitis, schwere azinäre Entzündung mit Gruppennekrosen und evtl. Brücken- und panlobulären Nekrosen

Staging (Desmet, 1994):

0	keine Fibrose	keine Faservermehrung
1	milde/geringgradige Fibrose	portale Faservermehrung, keine Septen
2	mäßige/mittelgradige Fibrose	inkomplette oder komplette portoportale Fasersepten*, erhaltene Architektur
3	schwere/hochgradige Fibrose	septenbildende Faservermehrung mit Architekturstörung**, kein Anhalt für komplette zirrhotischen Umbau
4	Zirrhose	wahrscheinlicher*** oder definitiver zirrhotischer Umbau

**Abb. 2:** Grading (entzündliche Aktivität) und Staging (Fibrosierung) bei chronischer Hepatitis B nach Desmet-Score (modifiziert nach Schirmacher, 2004).

wichtigste histologische Prognosefaktor (Mani, 2009). Bei lang andauernder parenchymatöser Entzündung kommt es zur sekundären Beteiligung der Gefäße mit Thrombosierung und Ausbildung sog. Brückennekrosen. Dabei handelt es sich um ausgedehnte Parenchymatrophien zwischen zwei Portalvenen oder einer Portalvene und einem Portalfeld. Auf dieser Grundlage entsteht die Leberzirrhose als Endstadium des fibrotischen Parenchymumbaus. Im Gegensatz zur Fibrosierung wird die Zirrhose bis auf wenige Ausnahmen als irreversibel betrachtet (Theise, 2007).

### 1.5.2 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie ermöglicht die mikroskopische Darstellung von Antigenen in Geweben durch eine spezifische Antigen-Antikörperreaktion, die mit Hilfe einer direkten oder indirekten Farbreaktion sichtbar gemacht wird.

Erfolgt aufgrund der klinischen Diagnose einer chronischen Hepatitis B eine Leberbiopsie, so dient die immunhistochemische Anfärbung von HBc- und HBsAg zunächst

der Bestätigung der HBV-Infektion als Entzündungsursache (Theise, 2007). Außerdem kann durch das Färbeverhalten der viralen Antigene ein Rückschluss auf die Virusreplikation und damit zusammenhängend auf den Infektionsverlauf erfolgen.

#### 1.5.2.1 HBcAg und HBsAg

Charakteristischerweise stellt sich HBcAg immunhistochemisch im Zellkern und in geringen Mengen auch im Cytoplasma dar. HBsAg wird im Cytoplasma oder entlang der Plasmamembran angefärbt. Werden beide Antigene gleichzeitig gefärbt, so fällt auf, dass sie selten gemeinsam in derselben Zelle zur Darstellung kommen, also eine bestimmte Leberzelle in der Regel entweder positiv für HBcAg oder für HBsAg ist (Dissoziation) (Bianchi und Gudat, 1975).

Die Anzahl HBcAg-positiver Zellen korreliert mit der Höhe von HBV-DNA- und DNA-Polymerase-Spiegeln im Serum und im Lebergewebe (Chu, 1997). Daher gilt HBcAg-Positivität als Hinweis auf aktive virale Replikation. In HBcAg-positiven, virusproduzierenden Zellen kann gelegentlich auch eine membranöse Anfärbung von HBsAg beobachtet werden. Davon zu unterscheiden ist die dissoziiert auftretende, cytoplasmatische HBsAg-Positivität im Rahmen der chronischen Hepatitis (Theise, 2007).

#### 1.5.2.2 HBeAg

HBeAg ist wie HBcAg ein immunhistochemischer Marker für die virale Replikation. Es wird in der Regel nur in Zellen nachgewiesen, die auch HBcAg exprimieren (Theise, 2007).

#### 1.5.2.3 HBXAg

Bei chronischer Hepatitis sind in der Regel mehr Zellen HBXAg-positiv als in der HBcAg- oder HBsAg-Färbung. Auch Zellen ohne HBc- oder HBsAg-Positivität können HBXAg exprimieren, was als Hinweis für eine HBX-Genexpression unabhängig von der viralen Replikation gewertet wird (Theise, 2007).

#### 1.5.3 Expressionstypen

Die Menge und die Verteilung immunhistochemisch positiver Zellen variiert in Zusammenhang mit den unterschiedlichen Verlaufsformen der HBV-Infektion.

Insbesondere die Färbungen von HBcAg und HBsAg liefern in der histologischen Diagnostik wichtige Zusatzinformationen bezüglich Ausmaß der Virusreplikation und mögli-

cher Prognose (Theise, 2007).

Zur besseren Verdeutlichung der Interpretation immunohistochemischer Färbungen soll hier das 1975 von Bianchi und Gudat entworfene Schema dienen. Es unterscheidet insgesamt vier Expressionstypen:

- 1.) HBc-Prädominanz-Typ (Immunsuppressionstyp)
- 2.) Eliminationstyp
- 3.) HBc+s-Äquivalenztyp (Aggressionstyp)
- 4.) HBs-Prädominanztyp

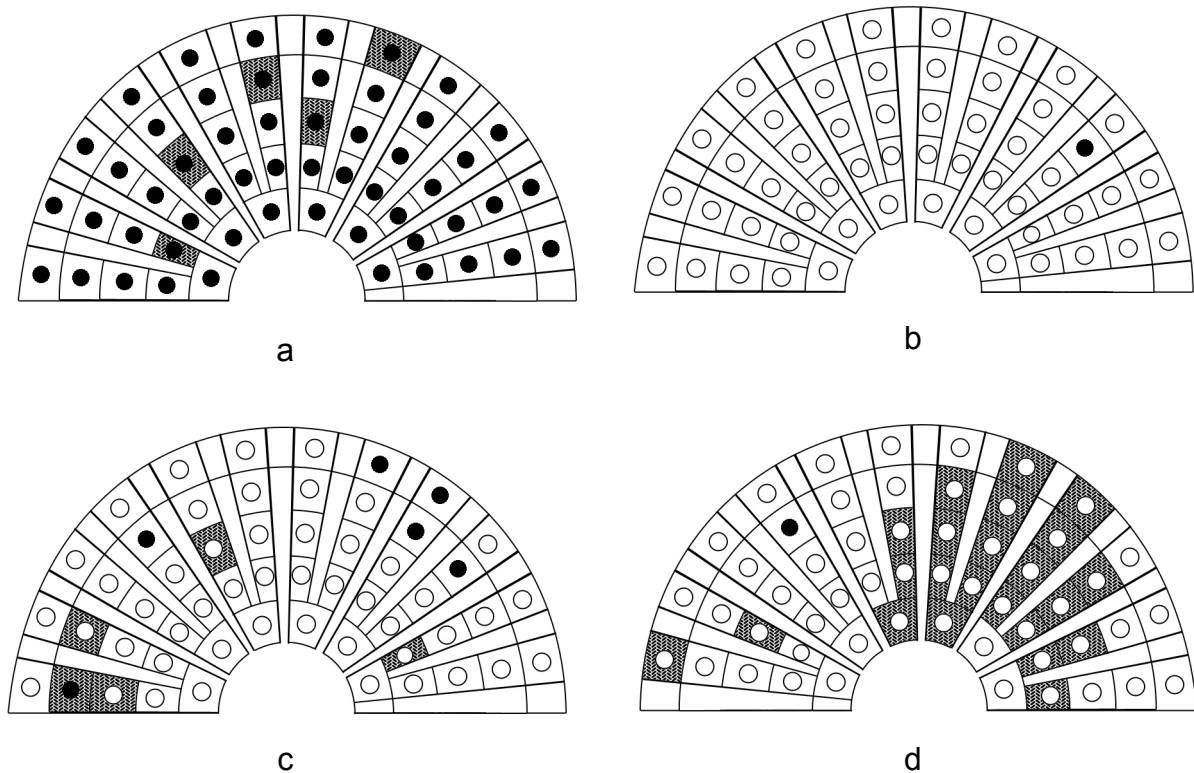
Wie bereits erwähnt, korreliert die HBcAg-Menge mit dem Grad der Virusreplikation.

Die höchsten Replikationsraten finden sich bei hoch virämischen HBV-Trägern, die im Kindesalter infiziert wurden. Chronisch HBV-infizierte Patienten, die aufgrund einer Nierentransplantation unter therapeutischer Immunsuppression stehen, sind bezüglich Virämie und Antigenexpression mit perinatal infizierten Trägern vergleichbar.

Die systematische Auswertung von Leberbiopsien dieser immunsupprimierten HBV-Träger zeigte als hervorstechendes Merkmal eine intensive, HBcAg-positive Färbung sämtlicher Zellkerne. Eine Entzündungsreaktion war nicht nachweisbar. Das histologische Bild unter Immunsuppression wurde dementsprechend als HBc-Prädominanz-Typ bezeichnet (Bianchi und Gudat, 1975).

Dem wird der Eliminationstyp (Typ 2) gegenübergestellt: Bei akuter Hepatitis sind keine oder nur wenige Zellen HBs- oder HBcAg-positiv gefärbt. In der Hämatoxylin Eosin (HE)-Färbung zeigt sich meistens eine akute Entzündung mit Einzelzellnekrosen (Ray, 1976). Dieser Befund kann im Sinne einer effektiven Immunantwort, die zur Elimination viraler Antigene führt, gedeutet werden. Dadurch wird die Virusreplikation unterbunden, klinisch kommt es zur Ausheilung der Infektion nach einer Phase akuter Hepatitis.

Zwischen dem HBc-Prädominanz-Typ und dem Eliminationstyp steht der HBc+s-Äquivalenztyp oder Aggressionstyp (Typ 3). HBcAg und HBsAg werden in einzelnen Zellen oder kleinen Zellgruppen nachgewiesen. Das Leberparenchym zeigt Zeichen einer aktiven Entzündung. Klinisch handelt es sich um einen stark protrahierten oder chronischen Verlauf mit ungünstiger Prognose. In einigen Fällen akuter Hepatitis konnte bei Vorliegen des Typ 3 durch Verlaufsbiopsien ein Übergang in eine chronisch aktive Infektionsform belegt werden (Bianchi und Gudat, 1975). Dementsprechend wird ein positiver Einzelzellnachweis von HBcAg beim Eliminationstyp als Hinweis für einen möglichen



**Abb. 3:** HBs-/ HBc-Expressionsmuster. Gezeigt ist die schematische Darstellung eines Zentralvenenläppchens mit HBcAg-positiv gefärbten Zellkernen (schwarze Punkte) und HBsAg-positiv gefärbtem Zytoplasma (schraffierte Felder). (a) HBc-Prädominanz-Typ (Immunsuppressionstyp). (b) Eliminationstyp. (c) HBc+s-Äquivalenztyp (Aggressionstyp). (d) HBs-Prädominanztyp (modifiziert nach Bianchi und Gudat, 1975).

Übergang zur Chronizität interpretiert, hat jedoch aufgrund der geringen Gewebsmenge bei der Biopsiegewinnung klinisch keinen prognostischen Wert. Diagnostisch wichtig ist hingegen eine fehlende Expression von HBcAg bei Vorliegen einer chronischen HBV-Infektion, da hier differentialdiagnostisch an eine Koinfektion mit Hepatitis-C-Virus (HCV) oder Hepatitis-D-Virus (HDV) gedacht werden sollte (Theise, 2007).

Der HBs-Prädominanztyp (Typ 4) ist gekennzeichnet durch eine intensive Anfärbung von HBsAg in ausgedehnten Parenchymarealen und vereinzeltem Nachweis von HBcAg. Klinisch handelt es sich häufig um symptomfreie Träger. Lichtmikroskopisch besteht keine oder eine gering ausgeprägte Entzündung, außerdem zeigen sich häufig sog. Milchglashepatozyten.

Eine Erklärung für das regelhafte Auftreten der beschriebenen Expressionstypen ist das Konzept der „abgestuften Immuninsuffizienz“. Demzufolge liegt allen persistierenden Formen der HBV-Infektion eine partielle, wahrscheinlich fein abgestimmte Immuntoleranz

ranz gegenüber dem Virus vor, die verantwortlich für den histologischen Nachweis einer Entzündung und die zelluläre Expression bestimmter viraler Antigene ist (Bianchi und Gudat, 1975).

#### 1.5.4 Korrelation von Immunhistochemie und Lichtmikroskopie

Zellen mit stark positivem Nachweis von HBsAg stellen sich in der HE-Färbung als sog. Milchglashepatozyten dar. Dieser für die chronische Hepatitis B charakteristische Befund wurde erstmals 1973 beschrieben (Hadziyannis, 1973) und erhielt seinen Namen aufgrund einer feingranulären cytoplasmatischen Struktur, die dem Zellkörper einen milchglasartigen Aspekt verleiht und den Zellkern oft in die Peripherie verdrängt. Milchglashepatozyten lassen sich auch mittels Ocreinfärbung (Shikata) oder Viktoriablauaufärbung darstellen. Sie treten meist diffus im Lebergewebe verteilt auf (Theise, 2007).

Elektronenmikroskopisch konnte in den entsprechenden Zellen ein stark proliferiertes glattes ER identifiziert werden, dessen Lumen mit HBsAg-Partikeln gefüllt ist (Gerber, 1974).

Der dem HBcAg entsprechende lichtmikroskopische Befund ist der sog. Milchglaskern, ein feingranuläres Einschlusskörperchen innerhalb des Zellkerns das im Elektronenmikroskop dem HBcAg entspricht (Bianchi und Gudat, 1976).

#### 1.6 Zielsetzung

Die Persistenz HBsAg-exprimierender Zellen im Lebergewebe ist ein charakteristischer Befund der chronischen Hepatitis, der anhand immunhistochemischer Färbungen präzise dargestellt werden kann. HBsAg-positive Zellen treten häufig als zusammenhängende Gruppen im Lebergewebe auf. Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Entstehung und der Bedeutung solcher HBsAg-positiver Zellverbände im Rahmen der chronischen HBV-Infektion.

Erstens stellt sich die Frage, ob ein Zusammenhang zwischen dem histologischen Nachweis HBsAg-positiver Felder und dem Verlauf der HBV-Infektion besteht. So besteht die Möglichkeit, dass sich Patienten mit HBsAg-positiven Zellgruppen klinisch von solchen Patienten unterscheiden, die HBsAg in einzelnen Zellen exprimieren. Daher wurden retrospektiv alle vorhandenen Daten der untersuchten Fälle bezüglich Serostatus, Infektionsdauer, Viruslast und laborchemischer sowie histologischer Entzündungsaktivität zusammengetragen und miteinander verglichen.

Zweitens besteht die Möglichkeit, dass HBsAg-positive Zellgruppen durch Weitergabe der HBV-DNA bei der Mitose entstehen. Die Hypothese eines klonalen Ursprungs HBsAg-positiver Areale wurde bereits mehrfach aufgestellt (Hsu, 1988; Naoumov, 1990; Su, 1986). Zugrunde gelegt wurde die Annahme, dass integrierte HBV-DNA bei der Zellteilung der Hepatozyten vererbt wird (Hsu, 1988; Tur-Kaspa, 1986).

In vorangehenden Arbeiten wurde zur Überprüfung dieser Annahme nicht-tumortragendes Lebergewebe durch Restriktionsverdau und Southern-Blot-Analyse auf das Vorliegen integrierter HBV-DNA untersucht: Virale Genombestandteile können mit Hilfe einer Sonde detektiert werden. Genfragmente werden elektrophoretisch nach ihrer Größe aufgetrennt. Abhängig vom verwendeten Restriktionsenzym entstehen spezifische Banden, anhand derer man Rückschlüsse auf den Integrationsort im Wirtsgenom ziehen kann. Ein Nachweis vieler, am selben Locus integrierter viraler Genome weist auf deren Vermehrung durch klonale Expansion ihrer Wirtszellen hin (Esumi, 1989; Shafritz, 1981). Tatsächlich gelang im Lebergewebe chronisch infizierter Patienten mit HBsAg-positiven Parenchymarealen der Nachweis integrierter viraler DNA in Zellklonen. Es wurde angenommen, dass diese Klone den histologisch nachgewiesenen HBsAg-positiven Arealen entsprechen.

Der Nachweis integrierter, klonal proliferierter DNA kann als wichtiges Argument für die Entstehung eines HBsAg-positiven Gewebsareals aus derselben Vorläuferzelle gewertet werden. Dennoch ist er kein Beleg im histologischen Sinne.

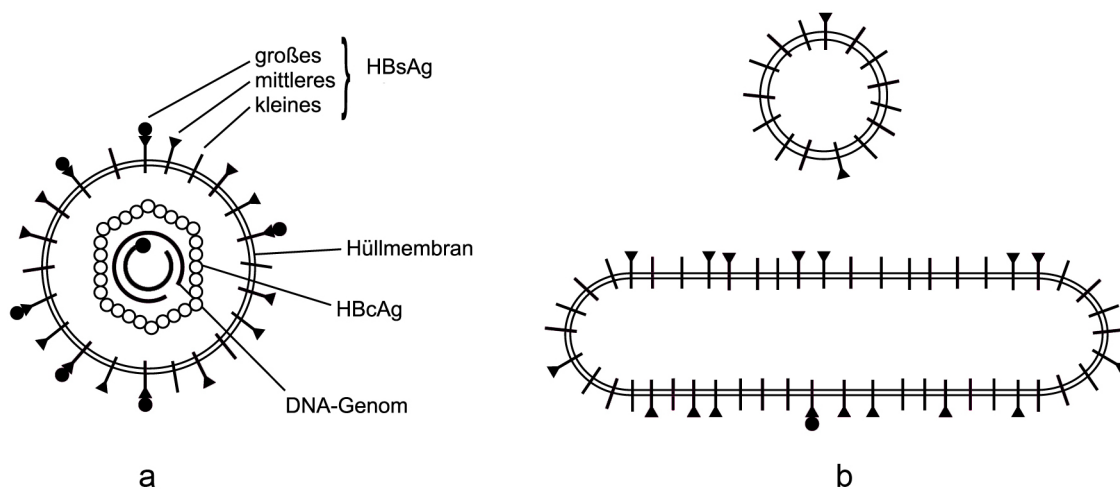
Die COX-Färbung ermöglicht die Darstellung genetisch identischer Zellen. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung HBsAg-positiver Parenchymareale auf Klonalität durch einen Vergleich mit der COX-Färbung anhand von Serienschnitten.

## 2. Literaturübersicht: Zytologische und genetische Grundlagen der HBsAg-Expression

In der vorliegenden Arbeit soll die Entstehung HBsAg-positiver Zellareale anhand histologischer Methoden untersucht werden. Die Hypothese, dass solche Areale durch Teilung einer hepatischen Vorläuferzelle entstehen, setzt einen genetischen Mechanismus voraus, der die Weitergabe der HBV-DNA bei der Mitose ermöglicht. Obwohl genetische Untersuchungen nicht Teil der vorliegenden Arbeit sind, ist der aktuelle Kenntnisstand über die Genetik des HBV Voraussetzung für das Verständnis und die Interpretation der Ergebnisse. Daher werden im folgenden Abschnitt zunächst genetische Veränderungen der HBV-DNA beschrieben, die eine intrazelluläre HBsAg-Ansammlung verursachen können. Außerdem wird die Frage erörtert, inwiefern eine Vererbung des Merkmals „HBsAg-positiv“ über integrierte bzw. extrachromosomal vorliegende DNA möglich erscheint.

### 2.1 Virusaufbau und Genomorganisation des Hepatitis-B-Virus

Das infektiöse HBV-Partikel (Dane-Partikel) hat einen Durchmesser von 42 nm. Es besteht aus einer ikosaedrischen Anordnung von 240 Hepatitis B core Antigen (HBcAg)-Molekülen, Nukleokapsid genannt, die von einer HBsAg enthaltenden Lipidmembran umhüllt wird (Modrow, 2003).



**Abb. 4:** Aufbau des Hepatitis-B-Virus und der nichtinfektiösen Partikel. (a) infektiöses Partikel (Dane-Partikel). (b) nichtinfektiöse Partikel: sphärisches Partikel (Australia-Antigen, oben) und filamentöses Partikel (unten) (modifiziert nach Modrow, 2010).

Die HBsAg-Proteine werden an der Membran des endoplasmatischen Retikulums synthetisiert. Es existieren drei Formen: *small HBs* (SHBs), *medium HBs* (MHBs) und *large HBs* (LHBs). Diese unterscheiden sich lediglich durch zusätzliche, N-terminal gelegene Aminosäuren (Pollicino, 2014). Die Hülle des Dane-Partikels enthält pro 100 SHBs etwa 5 MHBs-Moleküle und 1 LHBs-Molekül (Block, 2007).

Die Menge an synthetisiertem HBsAg ist weitaus größer als für die Virusproduktion nötig wäre. HBsAg ist ein Lipoprotein mit starker Tendenz zur Bildung von Oligomeren. Das im Überschuss gebildete HBsAg polymerisiert im Endoplasmatischen Retikulum (ER) zu sphärischen und filamentösen, nicht-infektiösen Partikeln (Pollicino, 2014). Das sphärische, 22 nm durchmessende Partikel (Australia-Antigen) besteht fast ausschließlich aus SHBs. Das filamentöse Partikel setzt sich aus S-, M- und einer geringen Menge LHBs zusammen (Modrow, 2003). Beide Partikel können 100–1.000 Mal häufiger als infektiöse Viren im Blut infizierter Personen nachgewiesen werden. Das LHBs-Protein ermöglicht durch Bindung eines zellulären Rezeptors den Viruseintritt in die Wirtszelle (Block, 2007).

Das HBcAg spielt wegen seiner Eigenschaft der spontanen Zusammenlagerung zu Partikeln eine wichtige Rolle bei der viralen *self-assembly*. Eine sekretorische Form des Core-Proteins, das Hepatitis B e Antigen (HBeAg), ist ebenfalls im Blut Infizierter nachweisbar.

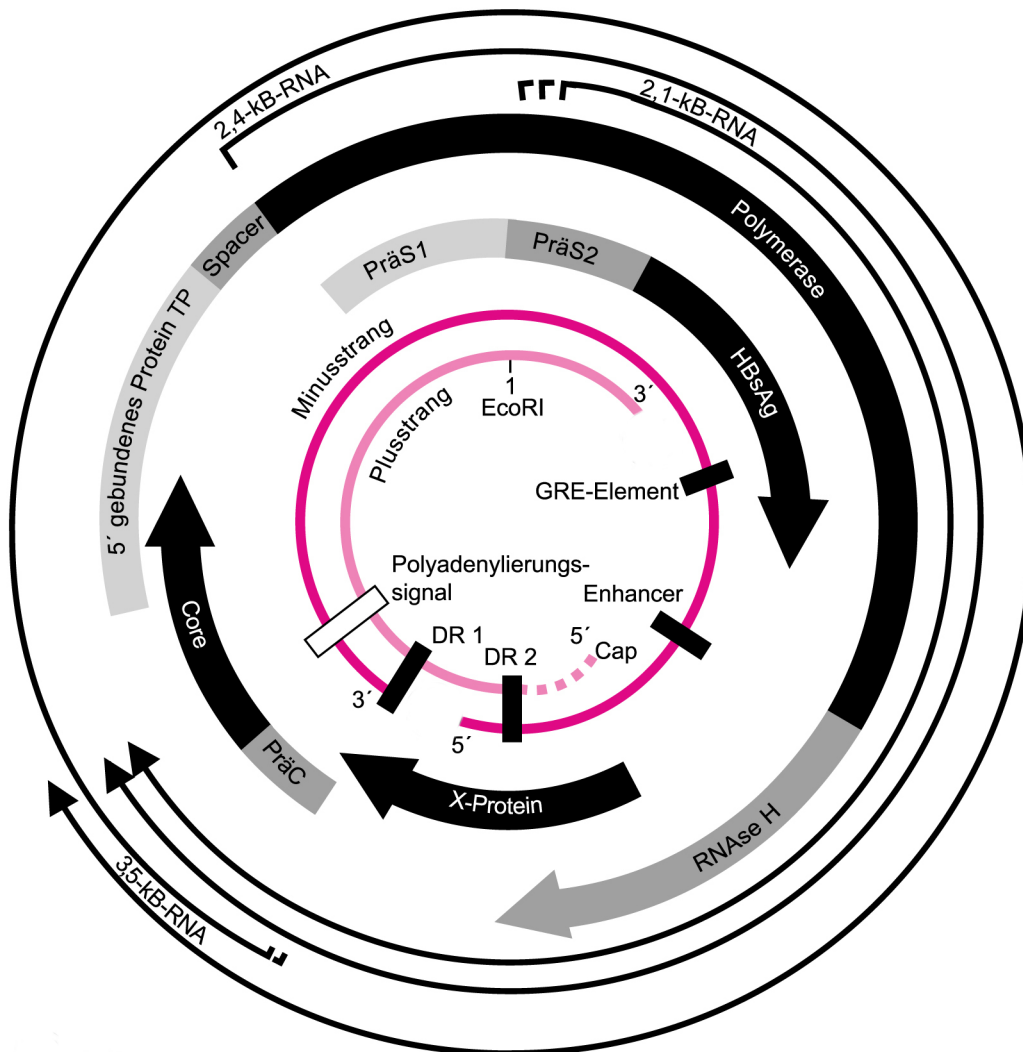
Das HBV-Genom besteht aus einer partiell doppelsträngigen DNA (pdsDNA) mit einem codierenden, etwa 3200 bp langen Minusstrang und einem unvollständigen Plusstrang variabler Länge. Es existieren vier einander überlappende Leserahmen (ORF), S, C, P und X genannt (Modrow, 2003).

Der ORF S codiert zwei unterschiedlich lange messenger Ribonukleinsäuren (mRNAs). Die 2,4 kb lange RNA codiert das LHBs-Protein, die 2,1 kb-RNA besitzt zwei unterschiedliche Startpunkte für die Synthese von M- und SHBs.

Das HBc- und HBeAg werden von derselben 3,3 kb langen mRNA codiert. Ein 29 Aminosäuren langer, precore genannter Bereich der mRNA ist ein Signalpeptid für die Synthese von HBeAg in das ER, wo es anschließend posttranslational modifiziert und sezerniert wird.

Virale Nichtstrukturproteine sind die Polymerase und das X-Protein, das von einer 0,7 kb mRNA codiert wird. Dem X-Protein wird eine wichtige Rolle bei der Genese HBV-assoziiierter Karzinome zugeschrieben (Block, 2007).





**Abb. 5:** Genomorganisation des Hepatitis-B-Virus. Gezeigt ist im Zentrum die partiell doppelsträngige DNA und im äußeren Kreis die verschiedenen mRNA-Moleküle. Die unterschiedlichen Genprodukte sind als Pfeile dargestellt (modifiziert nach Modrow, 2010).

### 2.1.1 Replikation

Nach Eintritt in die Zelle und Freisetzung der Nukleinsäure wird das Genom in den Kern transportiert. Nach Vervollständigung des Plusstranges durch die virale Polymerase liegt es dort als covalently closed circular DNA (cccDNA) vor. Diese wird von der zellulären Polymerase zu einer etwa 3,3 kb langen mRNA transkribiert, die das HBcAg-Protein und die virale Polymerase codiert. Weiterhin dient sie bei der nun folgenden reversen Transkription als Matrix für die Synthese des codierenden Minusstranges durch die virale Polymerase und wird daher auch als prägenomische RNA (pgRNA) bezeichnet.

Die reverse Transkription ist gleichzeitig der Beginn der viralen *self-assembly*. Der als Primer dienende Initiationskomplex zwischen pgRNA und Polymerase ist auch Erkennungsstruktur für die Anlagerung von HBcAg-Molekülen und wird im weiteren Verlauf ins Cytoplasma transportiert.

Die HBsAg-Moleküle werden an der Membran des ER, die HBcAg-Moleküle im Cytoplasma synthetisiert. Im Cytoplasma erfolgt die Vervollständigung des Capsids, dessen Umhüllung mit HBsAg an intrazellulären Membranen, und die anschließende Virussekretion über den Golgi-Apparat (Modrow, 2003). Zeitgleich synthetisiert die DNA-Polymerase den komplementären Strang des Virusgenoms. Die variable Länge des Plusstranges der pdsDNA hängt von der Anzahl der Nukleotide ab, die sich nach Abschluss der viralen Morphogenese im Kapsid befindet.

### 2.1.2 Formen viraler DNA

Neben der pdsDNA, die während der Virussynthese in großer Menge im Cytoplasma infizierter Zellen zu finden ist, liegt die virale DNA im Zellkern als geschlossenes doppelsträngiges Molekül vor. Die cccDNA entsteht durch Komplettierung des Plusstranges der pdsDNA, Primerentfernung und anschließende Ligation der komplementären Stränge (Zoulim, 2005). Sie ist an Histonproteine gebunden (Newbold, 1995). Die cccDNA wird unabhängig von der prämitotischen zellulären Replikation synthetisiert, indem pdsDNA zunächst zu pgRNA transkribiert wird und im Anschluss eine von der viralen Polymerase katalysierte reverse Transkription durchläuft (Tuttleman, 1986). Der größte Teil der so entstehenden viralen Genome wird sezerniert, während ein kleiner Teil der pdsDNA-Moleküle in den Zellkern zurücktransportiert und zu cccDNA umgewandelt wird. Die Rezirkulation der pdsDNA-Moleküle ermöglicht die Aufrechterhaltung eines stabilen cccDNA-Pools im Zellkern (Wu, 1990). Die cccDNA-Moleküle sind das Ausgangsprodukt für die virale Genomsynthese und somit essentiell für die Viruspersistenz (Tuttleman, 1986). Ihr wird außerdem eine zentrale Rolle bei der Chronifizierung der HBV-Infektion zugeschrieben, insbesondere da ihre Synthese nicht durch Einsatz von Nukleosidanaloga gehemmt werden kann (Levrero, 2009; Zoulim, 2005).

Welche Faktoren die Anzahl der cccDNA-Moleküle pro Zelle im Infektionsverlauf beeinflussen, ist noch unbekannt. Theoretisch kann cccDNA für die Dauer des hepatozytären Lebenszyklus in der Zelle persistieren ohne den Zellstoffwechsel zu beeinträchtigen. Während bei akuter Hepatitis nahezu alle Hepatozyten von HBV befallen sein können

und bis zu 50 cccDNA-Moleküle pro Zelle enthalten (Levrero, 2009), liegt im späteren Infektionsverlauf in 90 % der Hepatozyten cccDNA in einer wesentlich geringeren Anzahl von 1-17 Molekülen pro Zelle vor. Diese Beobachtung führte zu der Annahme, dass durch Verlust von cccDNA bei der Zellteilung und Mitose über längere Zeiträume eine Population ccc-DNA-freier Zellen entsteht (Zhang, 2003). Diese „Verdünnungs-Hypothese“ erscheint insbesondere unter der Voraussetzung des durch die HBV-Infektion gesteigerten Leberzellumsatzes möglich. Andere Hypothesen gehen von einer Persistenz der cccDNA bei der Zellteilung aus und führen die HBV-Elimination entweder auf CTL-vermittelte Zytolyse oder den Einfluss von Zytokinen zurück (Levrero, 2009). Neben der pdsDNA und der cccDNA existieren mehrere Formen linearer DNA-Moleküle, die durch Ausbleiben der Zirkularisierung bei der viralen DNA-Synthese entstehen. Sie gelten als Ausgangsprodukt für die Integration von HBV in das Genom der Wirtszelle (Yang, 1999).

## 2.2 Hepatitis-B-Virus-Mutanten

Das Hepatitis-B-Virus hat eine etwa 10 Mal höhere Mutationsrate als andere DNA-Viren, was hauptsächlich auf die fehlende Proofreading-Funktion der viralen Polymerase zurückgeführt wird. Mutationen, die verglichen mit dem Wildtyp vorteilhaft sind, werden über lange Zeiträume selektioniert. Dadurch entstehen Virusvarianten mit gesteigerter Pathogenität. Selektionsdruck entsteht sowohl durch die Immunreaktion des Wirts als auch durch exogene Faktoren wie medikamentöse Therapie (Pollicino, 2014).

### 2.2.1 S-Gen-Mutanten

Unter den S-Gen-Mutanten befindet sich die sog. Vaccine Escape-Mutante, die am häufigsten auf einer Aminosäuresubstitution an der Position 145 beruht. Es entsteht eine Veränderung der Determinante a des HBsAg, deren Epitope entscheidend für die schützende Wirkung des Anti-HBs sind. Trotz Impfung und vorhandener schützender Antikörper kommt es daher zu chronischen Infektionen mit hoher Viruslast (Pawlotsky, 2005). Die Häufigkeit von S-Gen-Mutanten wird auf 6-12 % geschätzt (Echevarria, 2006). Antigenveränderungen im S-Gen verringern die diagnostische Sensitivität von HBsAg-Immunoassays. Deshalb sind S-Gen-Mutationen die Ursache einiger okkulten HBV-Infektionen mit hohen Replikationsraten (Pollicino, 2014). Außerdem konnten Mutationen in den PräS-Genen identifiziert werden. Deren Auswirkungen und klinische Bedeutung sind noch weitgehend unbekannt.

### 2.2.2 P-Gen-Mutanten

P-Gen-Mutanten entstehen hauptsächlich unter Selektionsdruck bei der Therapie mit Polymeraseinhibitoren. Es handelt sich meistens um Punktmutationen im sog. YMDD-Motiv des Polymerasegens. Bisher sind Resistenzen gegen Lamivudin und Famiclovir bekannt (Echevarria, 2006).

### 2.2.3 PräCore/Core-Mutanten

Die häufigste Mutation des C-Gens liegt im PräCore-Bereich. An der Position 1896 entsteht durch Aminosäuresubstitution ein Stopcodon, das zu einem Ausfall der HBeAg-Synthese führt (Pawlotsky, 2005). Die HBeAg-negative Hepatitis verursacht chronische Verläufe mit hoher Viruslast und persistierender Leberschädigung (Carman, 1989).

## 2.3 Zytologische und genetische Grundlagen der HBsAg-Expression

Die zelluläre HBsAg-Expression bei der chronischen HBV-Infektion steht im Gegensatz zur akuten Hepatitis, bei der HBsAg nicht im Lebergewebe, sondern in großen Mengen in Form viraler Partikel im Serum nachweisbar ist. Die immunhistochemisch darstellbare HBsAg-Expression beruht auf einer Einlagerung von HBsAg-Filamenten im glatten ER der Zellen (Gerber, 1974), die lichtmikroskopisch als Milchglashepatozyten imponieren. Welche Veränderung im Zellstoffwechsel die HBsAg-Expression im Infektionsverlauf bewirkt, ist nicht genau bekannt. Die gegensätzlichen Mengenverhältnisse von HBsAg in der Leber und im Serum führen zu der Hypothese, dass bei der chronischen Infektion der Export von HBsAg als virales Partikel über den Golgi-Apparat nicht effizient ablaufen kann (Hsu, 1988; Lau, 1991). Außerdem wird vermutet, dass die Integration der viralen DNA in das Wirtsgenom die HBsAg-Retention auslöst (Chu, 1987; Lau, 1991) und im Anschluss durch mitotische Weitergabe zur Entstehung klonaler, HBsAg-exprimierender Zellgruppen führt (Hsu, 1988; Tur-Kaspa, 1986).

### 2.3.1 Zelluläre HBsAg-Expression durch Integration

Die Integration des viralen Genoms ist kein Bestandteil des viralen Lebenszyklus des HBV und somit für die Produktion infektiöser Viren nicht essentiell. Dennoch ist sie im Infektionsverlauf ein häufig auftretendes Ereignis (Block, 2007). Das virale Erbmateriale liegt dabei in den meisten Fällen als double stranded linear DNA (dsIDNA) vor und wird an zufälligen Orten in das Wirtsgenom eingebaut. Die dsIDNA entsteht durch irreguläres

Priming bei der Replikation und endet in der Regel in dem viralen DNA-Abschnitt zwischen 1 700 und 1 830 bp (Mason, 2010). Daher kann die 3,3 bp lange RNA nicht transkribiert werden, die virale Replikation und die Synthese von core-Proteinen sind nicht möglich. Das HBs-Gen bleibt intakt, die Synthese von HBsAg ist also theoretisch möglich (Freitas, 2014). Da durch das Fehlen des core-Proteins die virale *self-assembly* und damit die HBsAg-Sekretion in Form viraler Hüllproteine unmöglich ist, kann die Genomintegration eine Ansammlung von HBsAg im ER bewirken (Chu, 1987; Lau, 1991).

Aufgrund der inkompletten Expression der HBV-Proteine bei der Transkription integrierter DNA erscheint das Integrationsereignis als Auslöser der zellulären HBsAg-Expression trotz fehlender experimenteller Nachweise plausibel. Voraussetzung dafür wäre eine unbeeinträchtigte HBsAg-Synthese. Dass die Produktion voll funktionsfähiger SHBs- und LHBs-Moleküle auch nach Integration möglich ist, konnte in Zellkulturversuchen mit Hepatitis D-Virus (HDV) demonstriert werden. HDV ist ein Viroid ohne eigene Hülle. Der virale Lebenszyklus ist daher abhängig von der HBsAg-Synthese. HBsAg-exprimierende Zellkulturen mit integrierten HBV-Genomen wurden mit HDV-Virionen infiziert. Die Produktion voll funktionsfähiger HDV-Partikel ist ein Beleg für die Synthese von SHBs und LHBs mit erhaltener Rezeptorfunktion (Freitas, 2014).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Integration des HBV-Genoms ein möglicher Auslöser der zellulären HBsAg-Retention in chronisch infizierten Hepatozyten ist. Allerdings bleibt zu bedenken, dass anders als bei Retroviren das integrierte Virusgenom nicht essentiell für die Virusproduktion ist und somit nicht in jeder infizierten Zelle vorkommt (Block, 2007). Diese Funktion übernimmt beim Hepatitis-B-Virus die cccDNA. Es handelt sich um ein sehr stabiles zirkuläres Molekül, das auch bei chronischer Infektion intrazellulär nachweisbar ist (Zhang, 2003) und theoretisch für die Dauer des hepatozellulären Lebenszyklus persistieren kann (Levrero, 2009). Im Gegensatz dazu ist die integrierte DNA relativ anfällig für Mutationen, die über längere Zeiträume zu einer eingeschränkten Funktionalität oder sogar zum vollständigen Erliegen der HBsAg-Synthese führen können (Freitas, 2014; Robinson, 1990). In welchem Ausmaß integrierte HBV-DNA-Moleküle immunhistochemisch darstellbares HBsAg produzieren, ist nicht ausreichend geklärt. Denkbar wäre eine HBsAg-Expression unmittelbar nach dem Integrationsereignis, die im Verlauf durch Mutationen des integrierten HBs-Gens abnimmt oder sogar ganz verloren geht.

Alternativ zur Integration könnte die zelluläre HBsAg-Expression auch durch eine Veränderung auf Ebene der cccDNA ausgelöst werden.

### 2.3.2 Zelluläre HBsAg-Expression durch PräS-Genmutation

Die HBsAg-Retention bei chronischer Hepatitis kann durch das Modell der inkompletten Genexpression nach Integration des Virusgenoms erklärt werden. Eine alternative Hypothese sieht als Grund für die zelluläre HBsAg-Retention eine Veränderung im Mengenverhältnis der drei unterschiedlichen HBsAg-Moleküle: Die Hüllen infektiöser Viren und die nichtinfektiösen Partikel bestehen zu jeweils unterschiedlichen Anteilen aus SHBs, MHBs und LHBs. Die beiden kleineren HBsAg-Moleküle kommen sowohl in Viren als auch in den nichtinfektiösen Partikeln vor. LHBs ist als einziges Protein ungleichmäßig auf die drei sezernierten Moleküle verteilt: es kommt wesentlich häufiger in der Virushülle als in den nichtinfektiösen Partikeln vor (Modrow, 2003; Block, 2007).

Zur Untersuchung der Eigenschaften von LHBs-Molekülen wurde ein Tiermodell entwickelt. Das Lebergewebe transgener Mäuse, die ausschließlich LHBs exprimierten, wurde mikroskopisch untersucht. Es zeigte sich eine Ansammlung etwa 800 nm langer LHBs-Filamente im ER. Diese waren wesentlich länger als die filamentösen Partikel im Serum, die maximal 200 nm messen.

Es wurde daher angenommen, dass LHBs die Eigenschaft zur Bildung langer Filamente besitzt, die nicht sezerniert werden können und sich im ER ansammeln. Ein LHBs-Überschuss hat also eine hemmende Wirkung auf den HBsAg-Export (Chisari, 1996).

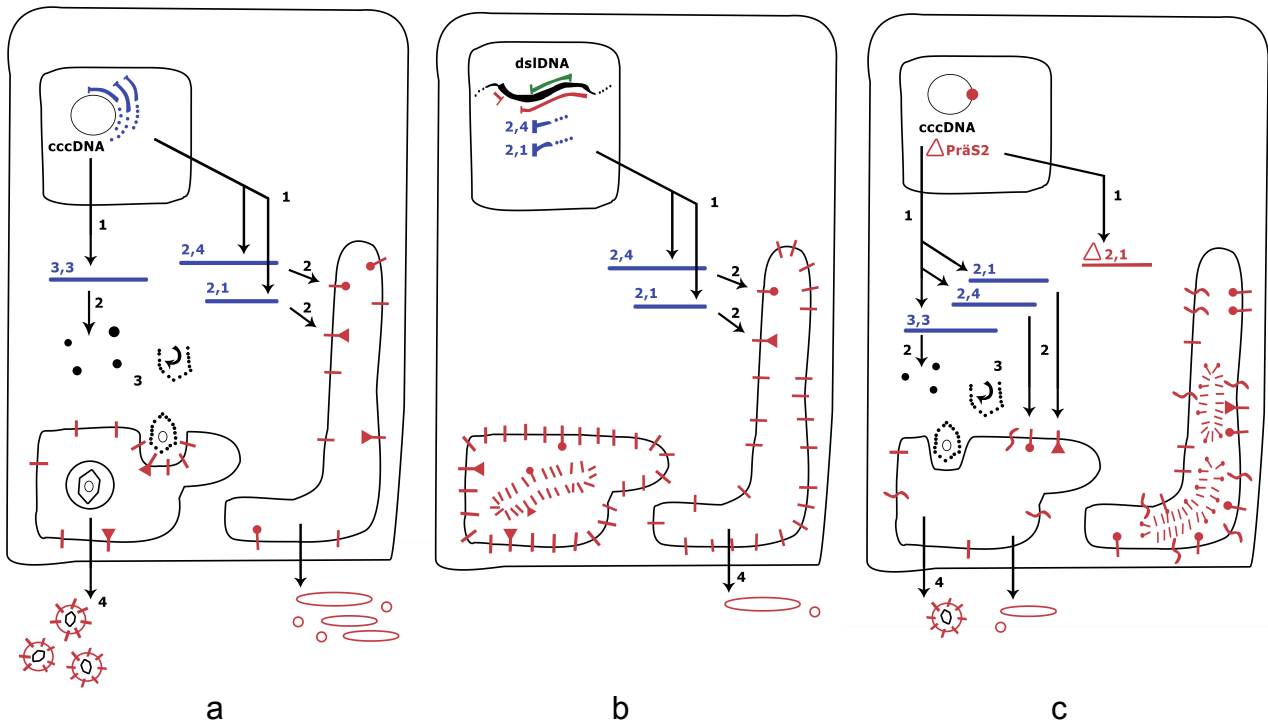
Die PräS1- und PräS2-Regionen des S-Gens enthalten den Promotor für die HBsAg-Synthese, und kodieren die N-terminalen Aminosäuren von LHBs (PräS1) und MHBs (PräS2) (Fan, 2000). In der PräS1- und PräS2-Region wurden unterschiedliche Deletionen, Insertionen und Punktmutationen nachgewiesen (Pollicino, 2014). Da Mutationen der PräS-Gene eine qualitative oder quantitative Veränderung der LHBs- und MHBs-Synthese bewirken können, die sich, wie zuvor beschrieben, nachteilig auf die HBsAg-Sekretion auswirken, sind sie eine mögliche Ursache für die HBsAg-Retention bei chronischer Hepatitis B.

Basierend auf dieser Annahme wurden Sequenzanalysen der PräS-Gene HBsAg-exprimierender humaner Leberzellen durchgeführt, bei der Gewebeproben mit HBsAg-positiven Einzelzellen und mit HBsAg-positiven Zellgruppen verglichen wurden (Fan, 2000, 2001; Wang, 2003). Sowohl in einzelnen als auch in gruppierten Zellen wurden unter-

schiedliche Mutationen des PräS1- und der PräS2-Region identifiziert (Fan, 2000, 2001; Wang, 2003).

In Zellkulturen mit PräS-Gen-Mutation war das Verhältnis von intrazellulärem zu extrazellulärem HBsAg in Zellen mit PräS-Mutation doppelt so hoch wie beim Wildtyp (Fan, 2000). Die insgesamt erhöhte intrazelluläre Antigenkonzentration war sowohl bei PräS1- als auch bei PräS2-Mutation auf eine Steigerung des LHBs-Anteils zurückzuführen (Wang, 2003). Diese Ergebnisse bestätigen die Theorie einer HBsAg-Retention durch Mutation der PräS-Gene.

Über die klinische Bedeutung und Verbreitung der PräS-Mutanten ist im Gegensatz zu den meisten anderen bekannten HBV-Mutanten bisher nur wenig bekannt. Die Persistenz der Prä-S-Mutanten wird vermutlich durch immunologische Selektion möglich: Erstens codieren die aminoterminalen Sequenzen von LHBs und MHBs für T-Zell-Epitope, die durch MHC I-Moleküle präsentiert werden und die Zerstörung infizierter Zellen durch cytotoxische T-Zellen auslösen (Modrow, 2003). Zellen mit Mutationen dieser Gensequenzen besäßen einen Selektionsvorteil (Wang, 2006). Zweitens ermöglicht die Organisation des HBV-Genoms in einander überlappenden offenen Leserahmen eine Koselektion der PräS-Mutationen mit Polymerase-Gen-Mutanten, die unter antiviraler Therapie entstehen: Da das S-Gen durch das Polymerase-Gen vollständig überlappt wird, verändern viele Mutationen im Polymerasegen, die einen Selektionsvorteil der Mutante durch medikamentöse Resistenz verursachen, automatisch die Frequenz des S-Gens (Pollicino, 2014). Unter Therapie mit Lamivudin, einem in Deutschland seit 1995 zugelassenen Nukleosidanalogon, beträgt die Resistenzquote im ersten Jahr 14-32 % und nach weiteren zwei Jahren 53-76 % (Lai, 2003).



**Abb. 6:** Immunhistochemische HBsAg-Expression in unterschiedlichen Infektionsphasen. Dargestellt ist die Transkription viraler mRNA-Moleküle (blau) und deren Translation in virale Proteine. Das rot abgebildete HBsAg lässt sich durch immunhistochemische Färbung darstellen. (a) fehlende oder membranöse HBsAg-Expression bei akuter Infektion: Transkription (1) und Translation (2) zur Synthese aller Virusbestandteile, Morphogenese im Zytoplasma (3) und anschließende Sekretion in Form infektiöser und nichtinfektiöser Partikel (4). (b) HBsAg-Ansammlung im ER nach HBV-DNA-Integration: von der dsDNA kann die 3,3 kB RNA nicht transkribiert werden. Infolgedessen kommt es zum Ausfall der HBcAg-Transkription sowie der Morphogenese und Sekretion infektiöser Partikel. Die drei HBsAg-Proteine werden im ER angereichert. (c) HBsAg-Ansammlung im ER nach PräS-Genmutation: mutationsbedingt kommt es zu einer qualitativen oder quantitativen Veränderung bei der Synthese der verschiedenen HBsAg-Proteine (hier Beispiel einer Mutation im PräS2-Gen, rot) Folge ist die Bildung langer, vermehrt LHBs-enthaltender Filamente, eine weniger effektive HBsAg-Sekretion und HBsAg-Retention im ER.

### 2.3.2.1 Einfluss von LHBs auf die cccDNA-Synthese

Neben der bekannten Funktion der HBsAg-Moleküle als Strukturproteine der Virushülle und der Rezeptorfunktion von LHBs bei der Adsorption an die Wirtszelle weisen Ergebnisse von Zellkulturversuchen auf eine weitere Funktion von LHBs bei der Kontrolle der cccDNA-Synthese hin (Lenhoff, 1994; Summers, 1990, 1991). Die Erzeugung und Aufrechterhaltung einer stabilen Anzahl von cccDNA-Molekülen ist essentiell für die Persistenz der HBV-Infektion. Die cccDNA-Moleküle werden noch vor der Entstehung infekti-



öser Viren synthetisiert und während der frühen Infektionsphase im Zellkern angereichert (Tuttleman, 1986). Ihre durchschnittliche Anzahl wird auf 6-60 Moleküle pro Zelle beziffert (Zhang, 2003) und bleibt nach einer initialen Amplifikationsphase normalerweise zunächst konstant (Summers, 1990). Demgegenüber kommt es bei einer Mutation der LHBs-Gene zu einer kontinuierlichen Synthese und Akkumulation von ccc-DNA-Molekülen in der Zelle (Summers, 1990, 1991).

Diese Beobachtungen deuten auf eine Regulation der cccDNA-Synthese im Sinne einer Endprodukthemmung durch LHBs hin: Während der frühen Infektionsphase kommt es bei niedrigen LHBs-Spiegeln durch Rezirkulation viraler Genome in den Zellkern zunächst zum Auffüllen des cccDNA-Pools. Im späteren Verlauf steigt durch zunehmende Translation viraler Proteine die LHBs-Konzentration, und senkt durch einen negativen Feedback-Mechanismus eine überschießende cccDNA-Synthese zugunsten der Produktion von Viruspartikeln. Anstatt eines Rücktransportes in den Zellkern erfolgt die Umhüllung der DNA-Kapsid-Komplexe am ER und deren Sekretion als Viruspartikel über den Golgi-Apparat (Lenhoff, 1994; Summers, 1990, 1991; Zhang, 2003).

Strukturelle Untersuchungen des LHBs-Moleküls weisen darauf hin, dass die unterschiedlichen Funktionen des Proteins mit einer posttranslationalen Konformationsänderung bei der Synthese am ER zusammenhängen. Bei etwa 50 % der Proteine weist die N-terminal gelegene PräS-Sequenz zur Seite des ER-Lumens (ePräS-Konformation), erscheint nach der Virussekretion auf der Außenseite der Hüllmembran und erfüllt die Funktion eines Rezeptors bei der Adsorption an die Wirtszelle. Die entgegengesetzte Konformation mit der PräS-Sequenz auf der Seite des Zytosols (iPräS-Konformation) ist hingegen essentiell für die Morphogenese der Viruspartikel, und bewirkt die Umhüllung der Kapside am ER und deren Sekretion über den Golgi-Apparat. Vermutlich bindet LHBs dabei in der iPräS-Konformation an Proteine des Nukleokapsids (Bruss, 2004). Sinkt die Konzentration des iPräS-LHBs unter einen bestimmten Schwellenwert oder verliert LHBs durch Mutation seine Funktion, kommt es zu einem Erliegen der Virussekretion, kompensatorischer Erhöhung der Genomrezirkulation in den Zellkern und infolgedessen ansteigender cccDNA-Synthese. Die für diese Funktion kodierende Gensequenz liegt wahrscheinlich im Bereich der Nukleotide 117-136 des HBs-Gens (Lenhoff, 1994).

In dieser Arbeit soll die Hypothese, dass HBsAg-positive Zellgruppen durch Zellteilung HBV-infizierter Hepatozyten entstehen, durch histologische Methoden überprüft werden.

Die regulatorische Funktion der LHBs-Proteine bei der Synthese und Persistenz der HBV-DNA ist eine mögliche Grundlage für die Entstehung monoklonaler, HBsAg-positiver Zellgruppen auf Genomebene: In LHBs-exprimierenden Zellgruppen wurden Mutationen der PräS-Gene nachgewiesen, die eine verminderte HBsAg-Sekretion und Ansammlung von LHBs im Zytoplasma verursachen (Fan, 2000; Wang, 2003). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine PräS-Genmutation eine Erhöhung der cccDNA-Spiegel verursachen kann (Summers, 1990, 1991). Der zu Grunde liegende Mechanismus ist nicht genau bekannt: Denkbar wäre ein durch Mutation des PräS1-Gens verursachter Funktionsverlust des regulatorisch wichtigen iPräS-LHBs-Proteins. Möglich wäre auch ein indirekter Einfluss von Mutationen der PräS-Gene durch eine herabgesetzte Effektivität der HBsAg-Sekretion: Die zuvor beschriebene Akkumulation von LHBs im ER könnte beispielsweise durch Senkung der cytoplasmatisch wirksamen iPräS-LHBs-Konzentration eine Anreicherung von cccDNA durch Ausschaltung des negativen Feedbacks bewirken.

Besonders in Zellen mit Mutationen der PräS-Gene erscheint somit die klonale Weitergabe des HBV-Genoms an die Nachkommen derselben Vorläuferzelle über cccDNA möglich. Selbst wenn gemäß der Verdünnungs-Hypothese cccDNA-Moleküle bei der Mitose verloren gehen, wäre in HBsAg-exprimierenden Zellen bei der Zellteilung die Wahrscheinlichkeit einer symmetrischen Verteilung des HBV-Genoms an beide Tochterzellen erhöht. Die immunhistochemische HBsAg-Positivität gruppierter Zellareale beruht also möglicherweise auf der Weitergabe von cccDNA-Molekülen einer hepatischen Vorläuferzelle an ihre Nachkommen.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Untersuchungsmaterial

Als Untersuchungsmaterial dienten archivierte Gewebeproben aus dem Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Bonn. Sämtliche Daten wurden in anonymisierter Form erhoben und bearbeitet.

Alle Untersuchungen wurden in Übereinstimmung mit der ethischen Standarte der zuständigen Ethikkommission und auf der Grundlage der revidierten Deklaration von Helsinki des Weltärztebundes (1983) sowie den entsprechenden gesetzlichen Grundlagen durchgeführt.

##### 3.1.1 Materialsuche, Auswahl der Gewebeproben und Erhebung klinischer Daten

Bei den untersuchten Gewebeproben handelt es sich um Lebergewebe chronisch HBV-infizierter Patienten, das in einem Zeitraum von 1993–2008 am Institut für Pathologie der Universität Bonn untersucht wurde.

Die Materialsuche wurde mit Hilfe der Programme PathoPro und FileMaker durchgeführt, als Suchbegriff wurde „Hepatitis B“ eingesetzt. Um über ein für die Anfertigung von vergleichenden Serienschnitten ausreichend großes Gewebsareal zu verfügen, wurden unter den positiven Ergebnissen *large tissue sections* ausgewählt, die z. B. im Rahmen einer Leberteileresektion oder einer Lebertransplantation gewonnen wurden.

Die Auswahl der Gewebeproben erfolgte durch Mikroskopie. Wenn nicht vorhanden, wurde zusätzlich eine HBsAg-Färbung angefertigt. Es wurden folgende Kriterien vorausgesetzt:

- HBsAg-Positivität
- tumorfreies Lebergewebe in ausreichender Größe

Unter den 35 ausgewerteten Präparaten waren 22 HBsAg-positive Proben.

Diese wurden in folgende Kategorien eingeteilt:

- 1.) HBsAg-Expression in einzelnen Leberzellen
- 2.) HBsAg-Expression in umschriebenen Parenchymarealen

Für beide Gruppen wurden retrospektiv mit Hilfe des Klinischen Arbeitsplatz Systems (KAS) der Universitätskliniken Bonn folgende Daten erhoben:

- Serostatus (HBsAg, Anti-HBs, Anti-HBc, HBeAg, Anti-HBe)

- Infektionsdauer
- HBV-DNA-Level
- laborchemische Diagnostik (GOT, GPT, GGT, Bilirubin, CRP)
- histologische Diagnostik (Grading, Staging)

Die insgesamt 14 Proben der Kategorie 2 wurden zur Anfertigung der Serienschnitte verwendet, um die HBsAg-positiven Areale mit der COX-Färbung vergleichen zu können.

### 3.2 Histologische Färbungen

Aus den vorhandenen Paraffinblöcken wurden jeweils mehrere, 4 µm dicke, serielle Schnitte angefertigt, auf Objektträger gezogen und getrocknet. Die Schnitte wurden in Xylol entparaffiniert und durch eine absteigende Alkoholreihe in wässriges Milieu überführt. Danach konnten die Standard- und Immunfärbungen erfolgen.

#### 3.2.1 Hämatoxilin Eosin (HE)-Färbung

Die Anfertigung der HE-Färbung erfolgte nach den üblichen Arbeitsschritten:

- Färben in Hämalaun: 5 min
- Spülen in destilliertem Wasser
- Bläuen in warmem Leitungswasser: 5 min
- Spülen in destilliertem Wasser
- Färben in 0,1%igem wässrigem Eosin: 30 s
- Spülen in destilliertem Wasser

#### 3.2.2 Immunhistochemische Färbungen

Nach Spülen der vorbereiteten Paraffinschnitte mit Trishydroxymethylaminomethan-Puffer wurden diese zur Anfertigung der HBsAg- und der COX-Färbung nach Anweisungen der Hersteller mit den unten genannten Antikörpern bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Detektionsreaktion durch Anwendung der Streptavidin-Biotin-Methode der Firma DAKO nach folgendem Schema:

- Inkubation mit biotinyliertem sekundärem Antikörper (Dako REAL™ Biotinylated Secondary Antibodies: goat anti-mouse and anti-rabbit immunoglobulins)
- Inkubation mit Streptavidin Peroxidase (Dako REAL™ Streptavidin Peroxidase)
- Blockierung der Peroxidase durch Peroxidase-Blocking Solution

- Sichtbarmachung mit dem Chromogen AEC/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Substrate Solution (Dako REAL™ AEC/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Substrate Solution; Dako REAL™ Blocking Solution; Dako REAL™ Buffer Kit).

### 3.2.2.1 Hepatitis B surface Antigen (HBsAg)-Färbung

Zur Detektion HBsAg exprimierender Hepatozyten wurde folgender Antikörper der Firma DAKO verwendet:

DAKO-Anti-HBsAg, 3E7 monoklonaler Mausantikörper (M3506; 1:100)

Vorbehandlung: Citratpuffer (pH 6,0); 2 x 15 min Mikrowelle (600W)

### 3.2.2.2 Cytochrom-c-Oxidase (COX)-Färbung

Zur Anfärbung der Untereinheit 1 der Cytochrom-c-Oxidase wurde folgender Antikörper der Firma Invitrogen verwendet:

CCO1 / Anti-OxPhos Complex IV Subunit I, monoklonaler Mausantikörper (A6403; 1:1.000)

Vorbehandlung: keine; Invitrogen Corporation, Camarillo, CA, USA

## 3.3 Ergebnisdokumentation der Serienschritte

Nach Auswahl geeigneter Lebergewebsproben und Anfertigung der Serienschritte in den Färbungen HE, HBsAg und COX wurden die Präparate zunächst orientierend am Lichtmikroskop betrachtet, um für die Auswertung geeignete Leberparenchymareale zu identifizieren. Hierbei wurde insbesondere auf folgende Kriterien geachtet:

- Tumorfreiheit
- fehlende nekrotische Veränderungen
- möglichst geringe Architekturstörung durch Zirrhose
- ausreichende Färbeintensität der eingesetzten Antikörper

Präparate, die diesen Kriterien nicht zweifelsfrei entsprachen, wurden von einem erfahrenen Pathologen erneut begutachtet und als geeignet oder ungeeignet für die weitere Auswertung eingeordnet. Anschließend erfolgte zum Größenvergleich von HBsAg-positiven, COX-negativen und COX-positiven Parenchymarealen das Zählen und Vermessen der jeweiligen Patches. Dazu wurden die Schnitte mithilfe des XL Palm S1 051 von Zeiss und der Software AxioVision Rel. 4.7 eingescannt. Das Ausmessen erfolgte mit dem Programm AxioVision Rel. 4.7, wobei durch manuelles Ziehen eines Rahmens um die jeweiligen Felder deren Fläche ermittelt wurde (s. Abb.10). Die Umrechnung der in

Pixel angegebenen Größen in  $\mu\text{m}^2$  erfolgte durch Multiplikation mit dem Faktor 1,39, der zuvor an einer Stichprobe am Mikroskop ausgemessener Zellareale ermittelt wurde.

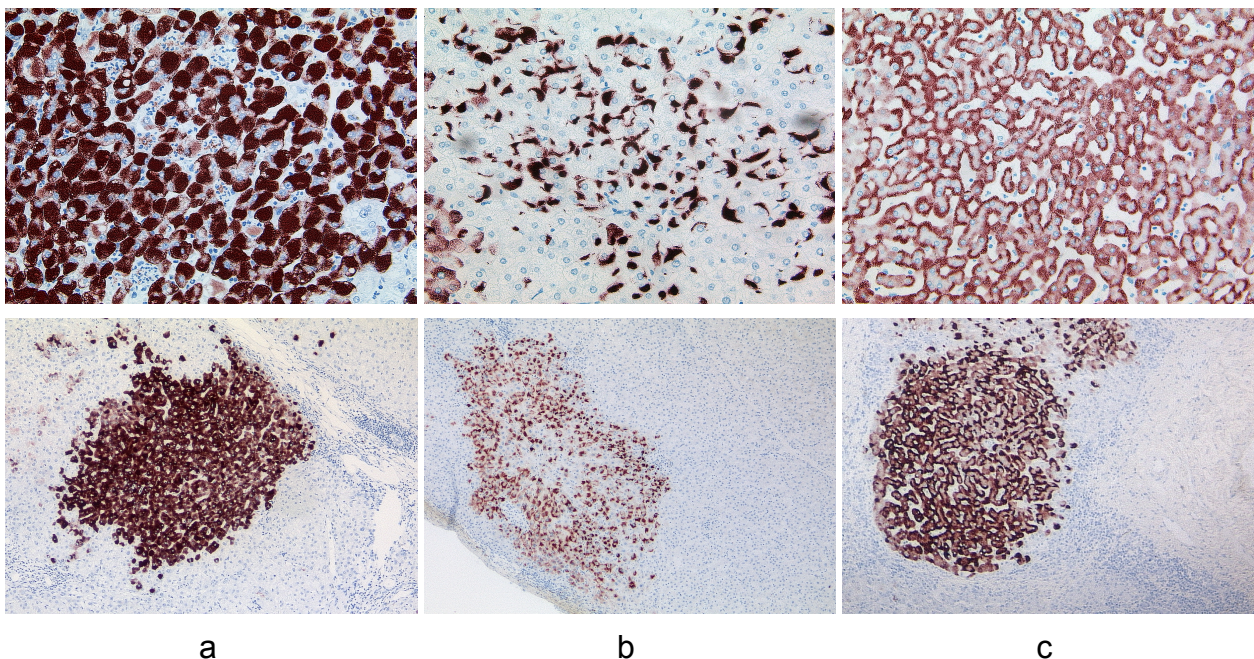
Unter Zuhilfenahme der eingescannten Schnitte wurde per Lichtmikroskopie nach Übereinstimmungen von HBsAg-positiven und COX-positiven Parenchymarealen in den Serienschnitten gesucht. Diese wurden mit Hilfe des Programms AxioVision fotografiert. Alle Datenerhebungen wurden unter den Qualitätserfordernissen der histopathologischen Diagnostik durchgeführt und durch einen Facharzt für Pathologie überprüft.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 HBsAg-Färbung

Das Zytoplasma der Zellen mit positiver HBsAg-Färbung zeigte verschiedene Färbeverhalten. Es konnten drei Färbearten unterschieden werden:

- 1.) cytoplasmatisch
- 2.) cytoplasmatisch-anteilig
- 3.) marginal



**Abb. 7:** Unterschiedliche Färbeverhalten einzelner Zellen in der HBsAg-Färbung. Nahansicht (oben) und Gesamtansicht (unten) des entsprechenden Leberzellareals. (a) cytoplasmatisch. (b) cytoplasmatisch-anteilig. (c) marginal.

Dabei konnten in einem Organ oftmals mehrere Färbemuster in unterschiedlichen Parenchymbereichen dargestellt werden. Die Zuordnung der Probe erfolgte dann anhand des am häufigsten auftretenden Musters.

Die Muster 1 und 2 traten sowohl in einzelnen Zellen als auch in Zellgruppen auf, wohingegen marginal gefärbte Hepatozyten nur in Gruppen dargestellt werden konnten.

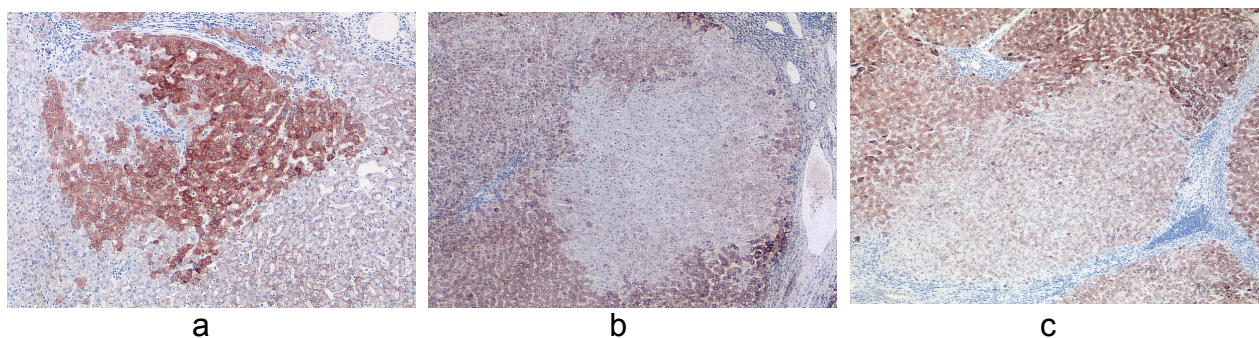
Zellen mit positiver Färbung für HBsAg traten sowohl einzeln als auch gruppiert auf. Die Gruppen färbten sich zum größten Teil homogen positiv an und hatten eindeutig definierte, frei im Parenchym liegende Begrenzungen. Solche HBsAg-positiven Zellverbände wurden als „Patches“ bezeichnet. In zwei Fällen zeigten sich positiv gefärbte Ein-

zelzellen, die zwar keinen Kontakt zueinander hatten, aber dennoch als Gruppierung von Zellen imponierten. Obwohl nicht eindeutig als Patch abgrenzbar, wurden sie dennoch mit den COX-Färbungen verglichen.

#### 4.2 COX-Färbung

Durch den für die COX-Färbung eingesetzten CCO1-Antikörper der Firma Invitrogen wird die Untereinheit 1 der Cytochrom-c-Oxidase detektiert, die sich als Membranprotein in der inneren Mitochondrienmembran befindet. Nach Gegenfärbung mit Hilfe der Streptavidin-Biotin-Methode stellt sich das Leberparenchym zum überwiegenden Teil gleichmäßig braun dar. Einzelne Zellgruppen unterscheiden sich aufgrund einer Mutation der COX und einem darauffolgenden Abbau des gesamten Enzymkomplexes vom Restparenchym. Sie erscheinen als eindeutig begrenzte Felder (Patches) unterschiedlicher Form und Größe.

Nach Anfertigung der COX-Färbung konnten im untersuchten Leberparenchym Felder mit jeweils unterschiedlicher Färbeintensität dargestellt werden. Bereiche mit einer überdurchschnittlich hohen Dichte der COX erscheinen dunkelbraun, Bereiche mit einer sehr niedrigen Dichte hellbraun bis weißlich. Die zur Darstellung kommenden Patches wurden dementsprechend als COX-positiv (hohe Dichte) und COX-negativ (sehr niedrige Dichte) klassifiziert. Felder, deren Färbeintensität sich vom Restparenchym nur geringfügig unterschied, bezeichneten wir als COX-normal (mittlere Dichte).



**Abb. 8:** Patches mit unterschiedlichen Färbeintensitäten in der COX-Färbung. (a) COX-positiver Patch. (b) COX-negativer Patch. (c) COX-normaler Patch.

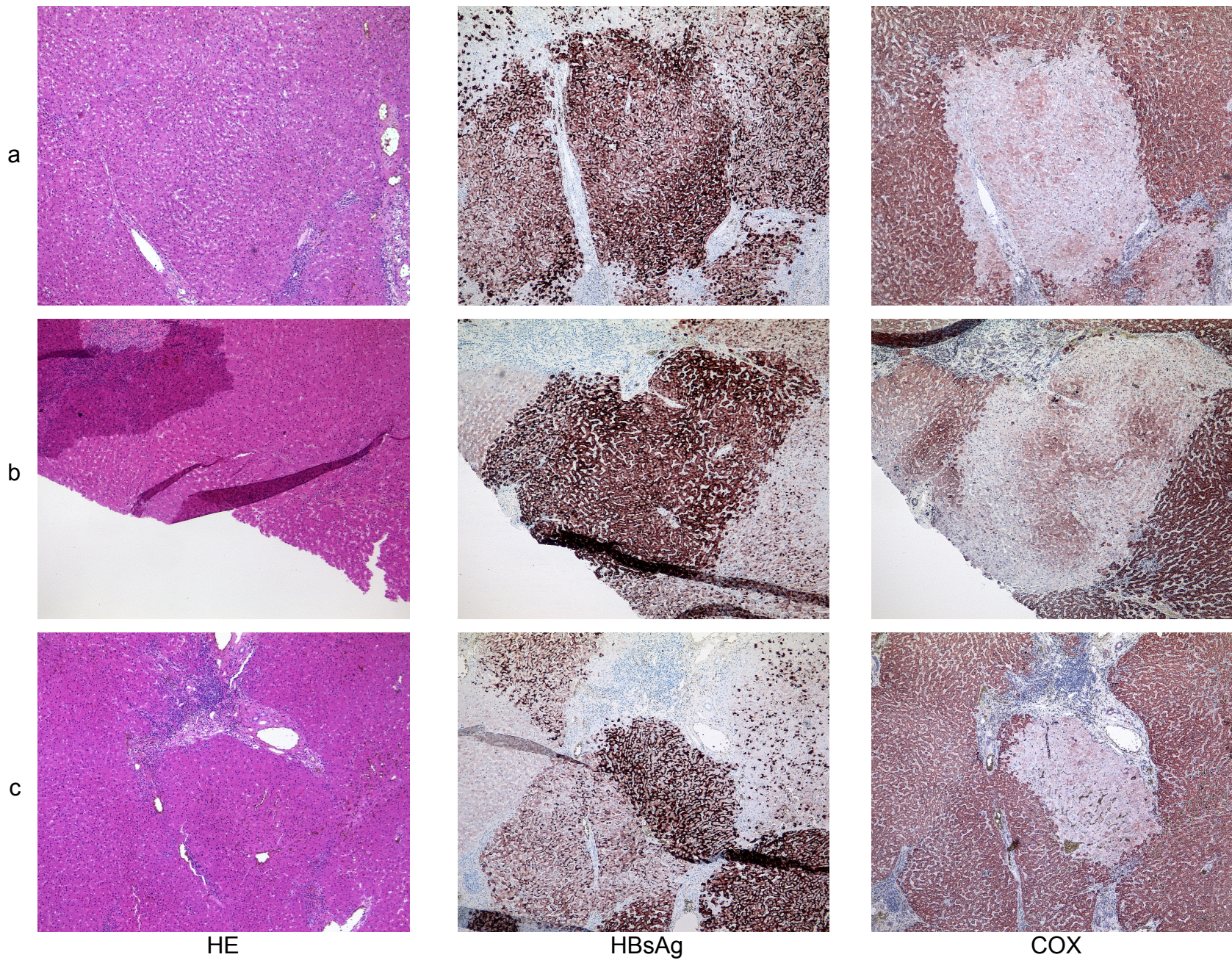
#### 4.3 Vergleich der Patches in HBsAg- und COX-Färbung

Es wurden von insgesamt 14 HBsAg-positiven Patienten Serienschnitte zum Vergleich des Färbeverhaltens von HBsAg und COX angefertigt. Alle vorhandenen Paraffinblöcke eines Falls wurden ausgewertet.



Zum Vergleich von HBsAg- und COX-gefärbten Schnitten wurden zunächst Parenchymbereiche aufgesucht, in denen sowohl ein HBsAg-Patch als auch ein COX-Patch nachgewiesen wurden. Die Begrenzungen dieser Patches wurden miteinander verglichen. Lagen exakt übereinstimmende Patchgrenzen in der HBsAg- und der COX-Färbung vor, wurden diese als doppelt markierte Patches (DMP) bezeichnet.

DMP konnten in 9 der insgesamt 14 ausgewerteten Fälle nachgewiesen werden. In vielen Fällen waren die gefärbten Patches von derselben Form und Größe, ihre Grenzen entsprachen sich zu 100 %. Andere DMP entsprachen sich in einem Teil ihrer Grenzen, sodass entweder der HBsAg-Patch oder der COX-Patch größer waren als ihr jeweiliger Partner. Es wurden sowohl kleine, etwa 20 Zellen umfassende als auch größere DMP mit mehreren 100 Zellen nachgewiesen. DMP kamen am häufigsten bei COX-negativem Färbeverhalten, in etwa 12% der Fälle aber auch bei Vorliegen einer COX-positiven oder COX-normalen Anfärbung vor. Das Färbeverhalten der HBsAg-positiven Zellen hatte keinen Einfluss auf das Vorliegen von DMP: Sowohl bei cytoplasmatisch als auch bei anteilig und marginal gefärbten Gewebsarealen konnten Übereinstimmungen mit der COX-Färbung nachgewiesen werden.



**Abb. 9:** Doppelt markierte Patches (DMP) in direkten Serienschritten aus Lebergewebe mit HBV-Infektion.

In den HE-Schnitten fanden sich Zeichen eines beginnenden oder bereits fortgeschrittenen Parenchyumbaues der Leber im Rahmen der chronischen Hepatitis. In einigen Fällen bestand eine bereits fortgeschrittene Zirrhose.

Beim Nachweis von DMP wurden die HBsAg- und COX-Färbungen mit den entsprechenden HE-Schnitten verglichen. So konnte gezeigt werden, dass sich weder COX- noch HBsAg-Patches an mikroanatomischen Strukturen orientierten. In einigen der HBsAg-positiven Zellen ließ sich eine milchglasartige Veränderung des Zytoplasmas darstellen. Ansonsten bestanden zwischen den Hepatozyten der jeweiligen Patches und jenen des umgebenden Gewebes keine morphologischen Unterschiede. Die Patches waren anhand der HE-Färbung nicht zu identifizieren.

DMP sind in vier Kombinationen denkbar:

- HBs-positiv, COX-negativ
- HBs-negativ, COX-negativ
- HBs-positiv, COX-positiv
- HBs-negativ, COX-positiv

In den Serienschnitten konnten alle vier Kombinationen nachgewiesen werden.

#### 4.4 Vergleich klinischer Daten und Morphometrie der Patches

Die retrospektive Erhebung klinischer Daten der insgesamt 8 Proben mit HBsAg-positiven Einzelzellen und der 14 Proben mit HBsAg-positiven Zellgruppen gestaltete sich schwierig. In den meisten Fällen waren die bei Materialeingang im Institut für Pathologie vorliegenden klinischen Daten für die retrospektive Auswertung im Rahmen dieser Arbeit nicht umfassend genug. Eine Ergänzung aus dem KAS-System war bei den Proben älteren Datums gar nicht und auch bei den übrigen Fällen nur eingeschränkt möglich, sodass auf eine vergleichende Analyse verzichtet werden musste.

Obwohl damit keine verlässliche Aussage über die Bedeutung des Vorliegens HBsAg-positiver Areale für den Krankheitsverlauf der vorliegenden HBV-Infektion gemacht werden konnte, ermöglichten die Daten eine Einordnung der vorliegenden Arbeit in den Kontext der Literatur über den Zusammenhang des Infektionsverlaufs mit den histologischen Befunden: Falls vorliegend lautete der serologische Befund HBs-Ag-positiv und Anti-HBs-negativ. Somit lassen sich die untersuchten Proben in das von Bianchi und Gudat entwickelte Schema der Expressionstypen einordnen, das dem HBsAg-Prädomi-

nanztyp die chronische Hepatitis zuordnet (s.1.5.3). Bestätigt wird dies durch laborchemische Befunde, die bei fast allen untersuchten Fällen eine über mehrere Jahre persistierende Erhöhung der Leberenzyme GOT, GPT und GGT dokumentieren. Die wenigen vorhandenen Daten bezüglich der Viruslast und des histologischen Schweregrades weisen auf ein fortgeschrittenes Entzündungsstadium hin: Die HBV-DNA-Level sind erhöht, nur in einem einzigen Fall wurde ein negativer HBV-Nachweis dokumentiert. Die histologischen Befunde dokumentieren neben der durch die chronische HBV-Infektion bedingte entzündliche Aktivität auch eine fortgeschrittene Fibrosierung: Für alle Fälle ist eine mindestens mittelgradige Fibrose dokumentiert (Desmet Stadium 2, s. Abb. 2). Dies ist zunächst widersprüchlich, denn nach Bianchi und Gudat handelt es sich bei Vorliegen des HBs-Prädominanztypes meist um symptomlose Träger. Es bleibt aber zu berücksichtigen, dass durch die Auswahl der Fälle aus dem Archiv des Pathologischen Institutes bereits ein selection bias zugunsten einer hohen Entzündungsaktivität besteht.

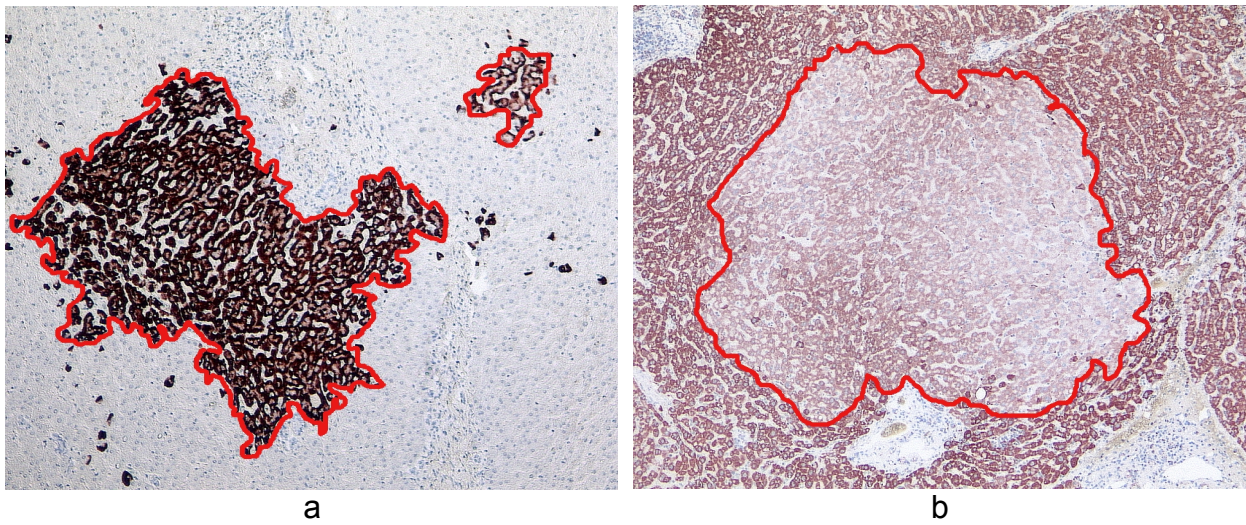
Bei der histologischen Auswertung der 14 Proben mit HBsAg-positiven Zellgruppen wurden alle angefärbten Parenchymareale (Patches) klassifiziert, gezählt und vermessen. Insgesamt wurden mehr HBsAg-Patches als COX-Patches angefärbt. Die durchschnittliche Größe der HBsAg-Patches war 3,6 Mal größer als die der COX-Patches.

**Tab. 1:** Übersicht der Proben mit HBsAg-positiven Zellgruppen, die durch Vergleich mit direkten COX-gefärbten Serienschnitten auf das Vorliegen von DMP untersucht wurden. Gezeigt ist die Gesamtzahl aller ausgewerteten Patches jeder Probe. In 9 Fällen wurden DMP nachgewiesen. HBsAg-positiv gefärbte Einzelzellen, die zwar keinen Kontakt zueinander hatten, aber dennoch als Gruppierung von Zellen imponierten, wurden in insgesamt 4 Proben nachgewiesen.

c cytoplasmatisch  
ca cytoplasmatisch-anteilig  
m marginal  
Ez Einzelzellen

COX- COX-negativer patch  
COX+ COX-positiver patch  
COX n COX-normaler patch

Fall	Anzahl ausgewerteter Patches				DMP	Anzahl DMP	Färbeverhalten	HBsAg-Patch
	HBsAg	COX-	COX+	COX n				
1	32	9	0	0	ja	16	ca	dicht
2	75	3	0	0	ja	5	m	dicht
3	35	11	24	5	ja	7	ca	dicht
4	24	6	5	0	ja	1	ca	dicht
5	49	10	0	3	ja	4	m	dicht
6	186	96	29	8	ja	20	c	dicht
7	28	2	4	0	ja	2	ca	Ez
8	20	8	4	2	ja	1	c	Ez
9	3	0	2	4	ja	1	ca	Ez
10	3	0	8	0	nein	0	m	dicht
11	2	22	4	4	nein	0	c	dicht
12	4	0	0	0	nein	0	c	dicht
13	28	5	1	0	nein	0	ca	Ez
14	2	10	5	0	nein	0	ca	dicht



**Abb. 10:** Messung aller identifizierten Zellareale durch manuelles Ziehen eines Rahmens mit Hilfe des Programms AxioVision. (a) HBsAg-positiver Patch. (b) COX-negativer Patch.

**Tab. 2:** Durchschnittliche Größe aller ausgewerteten HBsAg- und COX-Patches.

<b>Patches</b>	<b>Anzahl</b>	<b>durchschnittliche Patchgröße (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	<b>kumulative Fläche (<math>\text{mm}^2</math>)</b>
<b>HBs</b>	437	513.090,1	224,4
<b>COX -</b>	196	158.559,9	31,1
<b>COX +</b>	80	89.427,1	7,2
<b>COX n</b>	40	539.474,5	23,7
<b>Gesamt</b>	753	141.206,5	<b>286,4</b>

## 5. Diskussion

### 5.1 Monoklonalität HBsAg-positiver Patches

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Entstehung und Bedeutung HBsAg-positiver Zellgruppen (Patches) im Lebergewebe bei chronischer Hepatitis B. Da HBsAg-positive Hepatozyten in zusammenhängenden Gruppen auftreten, besteht die Möglichkeit einer monoklonalen Entstehung aller Zellen einer solchen Gruppe durch mitotische Teilung aus derselben hepatischen Vorläuferzelle.

Eine alternative Möglichkeit für die Entstehung von HBsAg-Patches wäre eine Verbreitung durch Viruspartikel auf hämatogenem Weg oder direkt von Zelle zu Zelle. Letzteres ist im Rahmen eines Immundefektes für andere Virusinfektionen beschrieben und wäre bei der Hepatitis B im Rahmen der Immuntoleranz bei hoch virämischen Trägern denkbar (Portmann, 1976). Zwar werden HBsAg-Patches in der Regel bei niedrig virämischen Trägern beschrieben (Bianchi und Gudat, 1975; Hsu, 1988), aber auch bei niedrigem Replikationsstatus können Phasen hoher Virämie im Rahmen einer Reaktivierung auftreten.

Eine viral beeinflusste Entstehung der HBsAg-Patches vorausgesetzt, richten sich Form und Größe der HBsAg exprimierenden Gewebsareale nicht nur nach der Verbreitung infektiöser Partikel, sondern auch nach der Verdrängung infizierter, HBsAg-positiver Hepatozyten durch nicht infizierte Vorläuferzellen. Ausgehend von der durch Zajicek formulierten Streaming-Liver-Hypothese erfolgt die Leberregeneration durch einen gerichteten Zellfluss vom Portalfeld aus in Richtung der Zentralvene. Infolgedessen werden HBsAg-exprimierende Zellen durch nachwachsende, nicht infizierte Hepatozyten ersetzt. Zu einem bestimmten Zeitpunkt nachweisbare HBsAg-positive Zellgruppen wären nach dieser Auffassung Residuen infizierten Leberparenchyms. Deren Ausdehnung wäre abhängig von der Proliferationsrate der Vorläuferzellen sowie von der bereits zurückliegenden Zeitspanne nach stattgehabter Virämie. Zu erwarten wäre außerdem eine dem Zellstrom folgende Ausrichtung der HBsAg-Grenzen in azinusabhängiger Art.

Im Rahmen einer chronisch persistierenden HBV-Infektion ist in Kenntnis der funktionellen Stammzellkapazität von Hepatozyten auch eine Teilung HBsAg-exprimierender Zellen möglich. Eine konstante Weitergabe des HBV-Genoms vorausgesetzt, wären in diesem Fall HBsAg-positive Zellareale monoklonalen Ursprungs. Die Entstehung der HBsAg-Areale wäre vereinbar mit dem Modell der hepatischen Regeneration durch

kohärentes klonales Wachstum, das von einer physiologischen Gewebsregeneration durch klonale, azinusunabhängige Proliferation von Hepatozyten ausgeht (Nesbitt, 1974). Eine Darstellung und Beschreibung dieser klonalen Proliferate ist mit Hilfe der COX-Färbung möglich, da sich einige Vorläuferzellen durch Anreicherung mitochondrialer Mutationen von benachbart liegenden Vorläuferzellen unterscheiden. Mitochondriale Mutationen sind für die betroffenen Zellen nicht pathogen (Fellous, 2009b) und bewirken eine immunhistochemisch darstellbare Aktivitätsänderung der COX in einem umschriebenen Parenchymareal. Dass die Hepatozyten eines solchen Patches klonal sind, wurde mit Hilfe einer Sequenzanalyse nach gezieltem Herausschneiden einzelner Zellen per Lasermikrodissektion belegt: Da in allen Zellen eines Patches dieselbe mitochondriale Mutation vorlag, sind diese nachweislich Nachkommen derselben Vorläuferzelle (Adam, 2012; Fellous, 2009b). Wenn HBsAg-positive Gewebsareale monoklonal sind, also im Rahmen der Leberregeneration durch kohärentes klonales Wachstum entstehen, wären beim Vergleich von COX-Patches und HBsAg-Patches anhand von Serienschnitten übereinstimmende Grenzen der jeweiligen Felder zu erwarten.

Demgegenüber wäre eine virale Entstehung der HBsAg-Patches auf eine zufällige Infektion räumlich nah beieinander liegender Zellen zurückzuführen. Auch benachbarte Zellen unterschiedlicher genetischer Herkunft wären HBsAg-positiv. In der COX-Färbung markieren die Patchgrenzen Zellgruppen, die sich in ihrer genetischen Herkunft unterscheiden. Eine virale Verbreitung vorausgesetzt, wären beim Vergleich mit der HBs-Färbung sich gegenseitig widersprechende Patchgrenzen zu erwarten, die sich zum Beispiel überschneiden oder aufeinander zulaufen.

Bei der Auswertung der angefertigten Serienschnitte wurden in keinem Fall widersprüchliche Grenzen der HBsAg- und COX-Patches nachgewiesen. Im Gegenteil konnte gezeigt werden, dass sich die Grenzverläufe zumindest zum Teil entsprechen. Häufig wurden auch doppelt markierte Patches (DMP) mit identischen Grenzen nachgewiesen. Für diese Patches konnte eindeutig belegt werden, dass sie nicht durch virale Verbreitung, sondern durch Weitergabe des HBV-Genoms bei der Zellteilung entstanden sind.

COX- und HBsAg-Patches entstehen zeitlich unabhängig voneinander. Außerdem ist die Entstehung eines COX-Patches Ergebnis einer Anreicherung mitochondrialer Mutationen in mehr als 80 % der Organellen einer Zelle (Lin, 2010). Da dies stochastisch relativ unwahrscheinlich ist, wird nur ein kleiner Anteil aller monoklonalen Gewebsareale des gesamten Parenchyms als COX-Patch dargestellt. Aus diesem Grund kann nur unzurei-



chend eingeschätzt werden, welcher Anteil der HBsAg-Patches monoklonal ist. Trotz der geringen Dichte der COX-Patches im Gesamtparenchym gelang der Nachweis von DMP. Es ist daher möglich, dass die Mehrzahl der HBsAg-Patches durch Weitergabe des HBV-Genoms innerhalb von klonalen Einheiten bei der Leberregeneration entsteht.

## 5.2 HBsAg-Expressionsmuster und HBV-Infektionsverlauf

Die HBsAg-Expression ist ein wichtiges histologisches Kennzeichen der chronischen Hepatitis B. Die Frage, ob ein Zusammenhang zwischen der cytoplasmatischen Anfärbung von HBsAg und dem klinischen Verlauf der HBV-Infektion besteht, ließ sich aufgrund der Unvollständigkeit der retrospektiv gewonnenen Daten nicht beantworten. In den meisten HE-Serienschnitten der Proben mit HBsAg-positiven Arealen wurde ein beginnender oder bereits fortgeschrittener Parenchymbau der Leber nachgewiesen. Diese Beobachtung spricht für das Vorliegen einer bereits länger bestehenden chronischen HBV-Infektion und steht im Einklang mit der zu Beginn erwähnten Beschreibung des HBs-Prädominanztyps von Bianchi und Gudat bei chronischen HBV-Trägern ohne histologische Entzündungszeichen.

Eine von Hsu durchgeführte Studie zur systematischen Beschreibung der HBsAg-Färbung und ihrer Interpretation kommt zu ähnlichen Ergebnissen. Anders als bei der HBcAg-Färbung, bei der bekanntermaßen ein rein quantitativer Zusammenhang zwischen Anzahl der HBcAg-positiver Zellen und der Höhe der Viruslast besteht, erfordert die Auswertung der HBsAg-Färbung zusätzlich eine Beschreibung des Färbeverhaltens einzelner Zellen und ihrer Verteilung im Gewebe. Hsu entwickelte hierfür ein Schema aus insgesamt 5 Expressionstypen. Eine wichtige Erkenntnis war dabei die Korrelation des Auftretens gruppierter, HBsAg-positiver Areale mit einem niedrigen Replikationsstatus. Patienten mit gruppiertem HBsAg hatten signifikant häufiger negative HBV-DNA-Level und waren HBeAg-negativ. Wie auch bei dem von Bianchi und Gudat beschriebenen HBsAg-Prädominanztyp war HBcAg selten oder gar nicht nachweisbar.

Bei den von Hsu untersuchten Fällen dieser Gruppe handelte es in etwa der Hälfte der Fälle um symptomfreie oder -arme Krankheitsverläufe, im Gegensatz dazu hatten 30 % ein HCC (hepatozelluläres Karzinom) oder eine Zirrhose. Patienten mit gruppiertem HBsAg waren im Durchschnitt älter als solche mit positiven Einzelzellen (Hsu, 1988).

In der eingangs erwähnten Arbeit von Fan wurde die nachgewiesene HBsAg-Expression bzw. PräS-Mutation ebenfalls in Relation zum Verlauf der HBV-Infektion gestellt. Auch

hier wurden PräS-Mutanten bei 37,5 % der Patienten im niedrig replikativen Stadium, aber nur bei 6 % der Patienten mit hoher Virämie nachgewiesen (Fan, 2001).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass der Nachweis von gruppiertem HBsAg, insbesondere in Verbindung mit marginaler Anfärbung der Einzelzellen, auf ein niedrig replikatives Stadium im späteren Verlauf der HBV-Infektion hindeutet (Hsu, 1988; Su, 1986).

### 5.3 Morphometrie HBsAg-positiver klonaler Proliferate

Die durchschnittliche Größe aller ausgewerteten HBsAg-Patches war mit  $513.000 \mu\text{m}^2$  3,6 Mal größer als diejenige der COX-Patches. Da die gemessene Patchgröße abhängig von der Teilungskapazität der hepatischen Vorläuferzellen ist, stellt sich die Frage nach dem Einfluss des Hepatitis-B-Virus auf die Regenerations- und Teilungsfähigkeit der infizierten Hepatozyten. Auch in anderen Studien an HBV-infiziertem Lebergewebe wurden ungewöhnlich große klonale Leberzellproliferate nachgewiesen (Mason, 2005, 2010). Dabei wurde integrierte virale DNA als Gensonde genutzt, um mittels PCR-basierter Verfahren die Nachkommen einer teilungsfähigen Zelle anhand der Schnittstellensequenz zwischen Virus- und Wirtsgenom zu identifizieren (Mason, 2005). Da bekannt ist, dass das HBV-Genom an zufälligen Orten im Wirtsgenom integriert wird (Block, 2007), können Zellen klonalen Ursprungs an einer für sie einzigartigen DNA-Sequenz am Integrationsort erkannt werden. Je häufiger eine bestimmte DNA-Sequenz nachgewiesen wird, desto größer ist das ihr entsprechende klonale Proliferat. Die unbekannte Sequenz am Integrationsort wird hierfür zunächst in einer inversen PCR vermehrt. Durch Verdünnung der so gewonnenen DNA-Probe und eine erneute Amplifikation als nested PCR können einzelne HBV-DNA enthaltende Zellklone quantifiziert und genauer analysiert werden (Mason, 2005, 2010). Basierend auf vorangehenden Untersuchungen an HBV-infiziertem Gewebe wurden klonale Proliferate mit einer Größe von wenigen Zellen erwartet. Tatsächlich wurden in nicht tumorösem Leberparenchym in jeder Probe klonale Zellgruppen mit einer Größe von etwa 100 bis hin zu mehreren 1.000 Zellen nachgewiesen (Mason, 2010).

Es besteht die Möglichkeit, dass die HBV-Infektion in einigen Hepatozyten Veränderungen auslöst, die im Sinne einer prämaligen Transformation eine erhöhte Teilungskapazität und letztendlich die Entartung der Zelle zum HCC bewirken. Andererseits erscheint die Entstehung großer klonaler Proliferate unter dem Einfluss des Immunsystems und des im Rahmen der HBV-Infektion erhöhten Leberzellumsatzes denkbar.

### 5.3.1 Prämaligne Transformation

Die Expression viraler Gene und die Schädigung der zellulären DNA durch Integration des HBV gelten als mögliche Auslöser einer prämaligen Transformation der Wirtszelle (Mason, 2010). Virale Genprodukte, denen karzinogenes Potential zugeschrieben wird, sind das X-Protein und das LHBs-Molekül. Deren genaue Funktion ist allerdings noch unbekannt (Block, 2007; Wang, 2006). Integrierte HBV-DNA kann sowohl in tumorösem und nicht-tumorösem Lebergewebe nachgewiesen werden (Theise, 1999), was als wichtiger Hinweis für die insertionelle Mutagenese durch HBV gedeutet wurde (Esumi, 1989; Tur-Kaspa, 1986). Möglich wäre eine durch HBV-Integration ausgelöste Schädigung zellulärer Gene, die eine regulatorische Funktion auf den Zellzyklus ausüben. Folge wäre ein unkontrolliertes Zellwachstum. Zur Überprüfung dieser Hypothese führte Mason eine Kartierung aller Genorte durch, an denen integrierte HBV-DNA nachgewiesen wurde. Sowohl bei normalgroßen als auch bei über 1.000 Zellen umfassenden Zellklonen lag der HBV-Integrationsort in intergenetischen Regionen oder in Introns (Mason, 2010). Übereinstimmend mit anderen Autoren kommt er daher zu dem Ergebnis, dass eine Integration des HBV in spezifischen Genen nicht belegt werden kann (Mason, 2010; Robinson, 1990; Summers, 2003). Daher scheint die insertionelle Mutagenese durch HBV zwar theoretisch möglich, wird bei der humanen HBV-Infektion aber eher als Ausnahme betrachtet (Block, 2007).

### 5.3.2 Leberregeneration und Immunselektion

Infolge einer chronischen HBV-Infektion kommt es zu einer immunvermittelten Beseitigung infizierter Zellen und einer kompensatorischen Steigerung des Leberzellumsatzes. Anhand computergestützter Modellrechnungen wurde überprüft, ob die Entstehung großer klonaler Proliferate durch diese Faktoren erklärt werden kann. Zur Entstehung eines Proliferates mit einer Größe von 1.000 Zellen wäre demnach ein ca. 124-facher Ersatz des kompletten Leberparenchyms durch Zellteilung nötig. Dass die nachgewiesenen Proliferate allein unter dem Einfluss der gesteigerten Gewebeproliferation entstehen, gilt daher als unwahrscheinlich (Mason, 2005).

Eine alternative Erklärung wäre eine Größenzunahme bestimmter klonaler Proliferate durch einen selektiven Vorteil bei der Beseitigung infizierter Zellen durch das Immunsystem. Ein solcher Vorteil würde bewirken, dass die betroffenen Zellen wesentlich schneller proliferieren als Zellen ohne dieses Merkmal. Die eingangs beschriebene Verände-

rung der MHC I-Epitope des HBV durch Mutation der PräS-Gene wäre eine Veränderung, die einen solchen Selektionsvorteil HBsAg-exprimierender Zellen bewirken könnte. Je größer der Selektionsvorteil, desto kleiner ist der benötigte Leberzellumsatz, der zur Entstehung eines großen klonalen Proliferates führt. Das bedeutet übertragen auf die o.g. Modellrechnung, dass für eine Zelle, die durch Immunselektion doppelt so schnell wächst wie die Zellen ihrer Umgebung, nur noch ein ca. 9-facher Ersatz des kompletten Lebergewebes zur Entstehung eines Zellproliferates derselben Größe nötig wäre (Mason, 2005).

### 5.3.3 Regenerative Kapazität und Stammzellaktivierung

Eine weitere Hypothese zur Erklärung der Entstehung großer Leberzellproliferate ist die Erschöpfung der regenerativen Kapazität des Parenchyms in Folge der HBV-Infektion. Hepatozyten gelten als funktionelle Stammzellen, verlieren aber nach einer unbekannt Anzahl von durchlaufenen Zellzyklen ihre Teilungskapazität. Je geringer die Anzahl replikativ aktiver Vorläuferzellen, desto größer ist die benötigte Teilungskapazität einer einzelnen Vorläuferzelle zum Erhalt des gesamten Parenchyms. Infolgedessen steigt die Anzahl der genetisch identischen Tochterzellen einzelner Vorläuferzellen und somit die Größe der klonalen Leberzellproliferate/ Patches.

Im Rahmen eines Vergleiches COX-gefärbter klonaler Zellproliferate in HCC-freiem und HCC-tragendem Lebergewebe wurde ein signifikanter Unterschied der Patchgrößen beobachtet: In HCC-tragendem Gewebe waren die COX-Patches im Durchschnitt dreimal größer als in HCC-freien Proben. Die Zunahme der Patchgröße wird dabei nicht durch Mutation der mitochondrial kodierten COX-Gene verursacht, sondern als Zeichen einer nachlassenden regenerativen Kapazität hepatischer Vorläuferzellen interpretiert, die bekanntermaßen auch in alterndem Gewebe auftritt (Adam, 2012).

Ist die funktionelle Stammzellkapazität des Lebergewebes aufgrund einer erheblichen Leberzellschädigung, z. B. im Rahmen einer chronischen Hepatitis B, erschöpft, kann ein in Gallengangsnähe gelegenes Stammzellkompartiment aktiviert werden (Alison, 2009). Folge wäre eine Parenchymregeneration, die von einer im Vergleich zum Gesamtgewebe kleinen Zahl von Stammzellen getragen wird. Eine solche Stammzellaktivierung könnte eine Größenzunahme klonaler Proliferate in HBV-infiziertem Parenchym erklären, ist aber bisher kaum experimentell belegt (Mason, 2010). Es ist bekannt, dass duktiläre Reaktionen als histologisches Korrelat der Stammzellaktivierung auch in

HBV-infiziertem Lebergewebe nachgewiesen werden können (Falkowski, 2003; Fotiadu, 2004; Hsia, 1992; Sun, 2006). Bipotente Vorläuferzellen werden dabei an der gleichzeitigen Expression hepatischer, biliärer und embryonaler Oberflächenmoleküle erkannt (Fotiadu, 2004). Bezüglich einer eventuellen Aktivierung und Proliferation hepatischer Stammzellen gelangt Lin in einer Analyse von zirrhotischem Leberparenchym zu beachtenswerten Ergebnissen: Durch COX-Färbung und Sequenzanalyse des mitochondrialen Genoms konnte belegt werden, dass die untersuchten Zirrhoseknoten monoklonalen Ursprungs sind. In denselben Gewebeproben wurden duktiläre Reaktionen durch Färbung des biliären Oberflächenmoleküls Cytokeratin 19 (CK19) identifiziert. Bei der Sequenzierung des mitochondrialen Genoms dieser hepatischen Stammzellen wurde eine Mutation nachgewiesen, die identisch mit den Mutationen des benachbart liegenden COX-Patches war. Somit konnte erstmals experimentell belegt werden, dass monoklonale Leberzellareale und Hepatozyten des Stammzellkompartimentes denselben genetischen Ursprung haben (Lin, 2010).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass der Grund für die Entstehung außergewöhnlich großer klonaler Zellgruppen noch unklar ist. Zwar existieren Hinweise für eine prämaligene Transformation HBV-infizierter Zellen, andererseits können die physiologische Leberregeneration und immunvermittelter Selektionsdruck eine Vergrößerung der klonalen Parenchymeinheiten bewirken. Bisher existieren für keine der genannten Theorien eindeutige experimentelle Belege.

#### 5.4 Klonale Proliferate in Lebergewebe mit chronischer HBV-Infektion

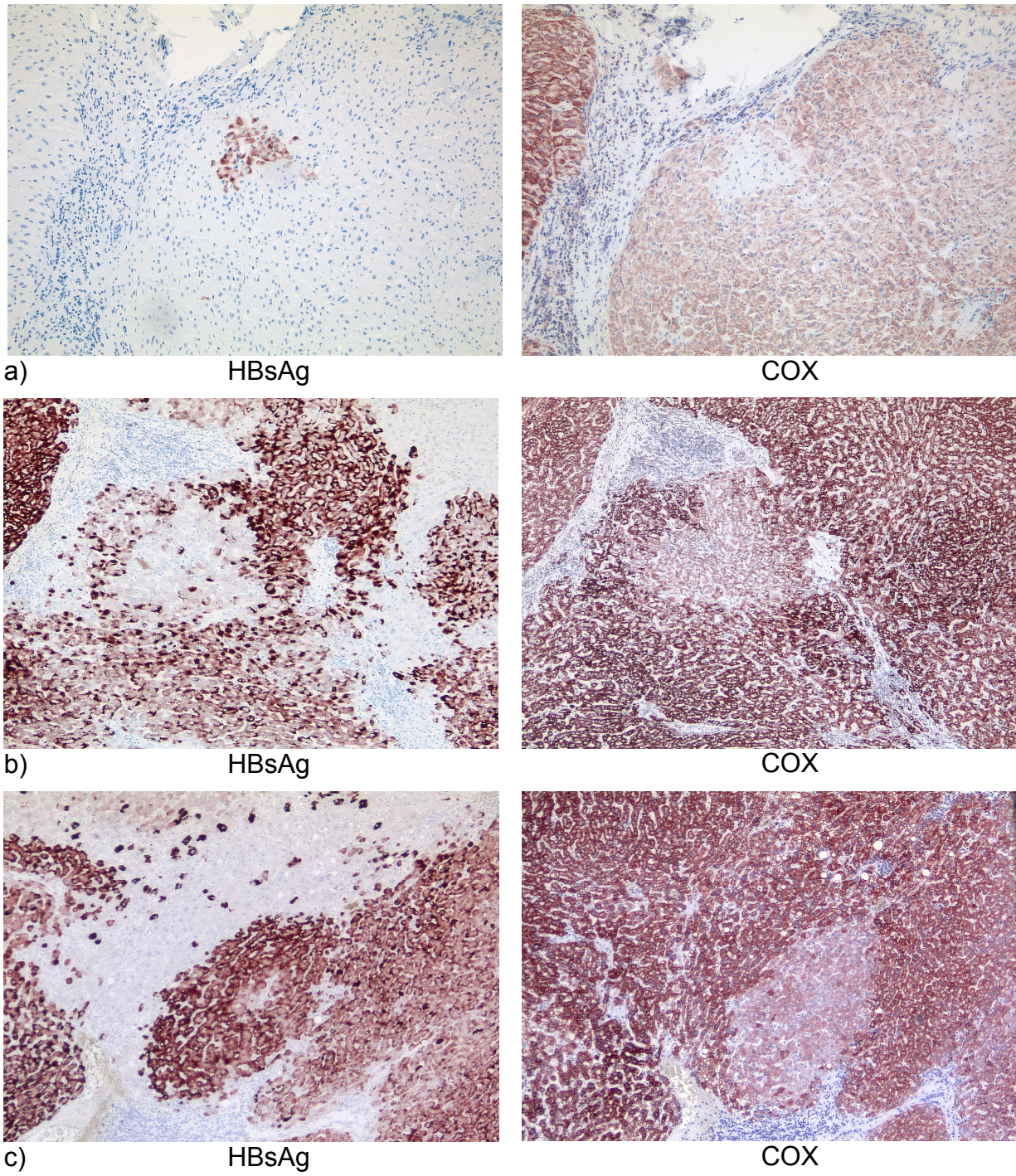
Nesbitt entwickelte anhand von Untersuchungen an chimären Mäusen die Theorie der Leberproliferation durch Wachstum klonaler Felder, die durch Zellteilung von Vorläufer- oder Stammzellen entstehen (Nesbitt, 1974). Der experimentelle Nachweis solcher Leberzellklone setzt ein genetisches Markerereignis voraus, infolgedessen sich eine teilungsfähige Vorläuferzelle von den sie umgebenden Zellen unterscheidet. Mitochondriale Marker Mutationen, die sich über lange Zeiträume hinweg durch genetischen Drift in Zelllinien anreichern, bilden die Grundlage des histologischen Nachweises klonaler Gewebsareale mit Hilfe der COX-Färbung. In HBV-infiziertem Parenchym lassen sich einige Hepatozyten durch viral induzierte Markerereignisse unterscheiden:

Wie zuvor beschrieben kann integrierte virale DNA als Gensonde genutzt werden, um mittels PCR-basierter Verfahren die Nachkommen einer teilungsfähigen Zelle anhand

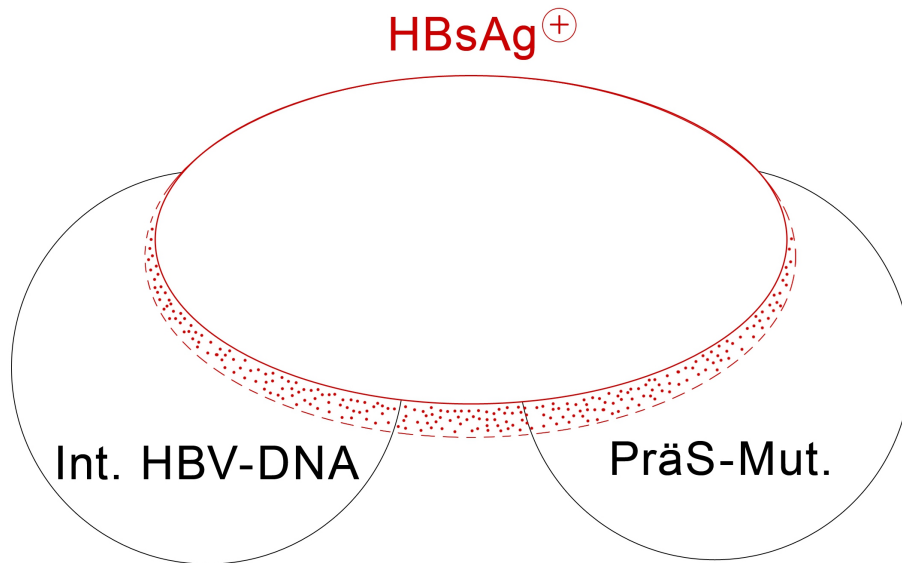
der Schnittstellensequenz zwischen Virus- und Wirtsgenom zu identifizieren (Mason, 2005). Mason gelang mit dieser Methode der Nachweis klonaler Zellproliferate in humanem HBV-infiziertem Leberparenchym. Dieses Ergebnis bestätigt das Vorhandensein klonaler Proliferate in HBV-infiziertem Lebergewebe unabhängig von der HBsAg- oder COX-Expression bestimmter Parenchymanteile.

In der vorliegenden Arbeit konnte durch Vergleich mit dem bereits etablierten Verfahren der COX-Färbung gezeigt werden, dass auch das Merkmal der HBsAg-Expression zur Darstellung monoklonaler Zellgruppen genutzt werden kann. Voraussetzung für die Ausbildung des Merkmals „HBsAg-positiv“ ist zunächst eine chronische HBV-Infektion und daran anschließend eine Veränderung im Zellstoffwechsel, die eine Ansammlung von HBsAg im Cytoplasma bewirkt. Mögliche auslösende Ereignisse sind wie oben beschrieben die Integration des Virusgenoms oder eine Mutation der PräS-Gene.

Die Notwendigkeit eines spezifischen Markereignisses bedingt die relativ niedrige Sensitivität aller beschriebenen Verfahren zur Markierung von Zellarealen klonaler Herkunft. Ausgehend von der Annahme, dass sich das gesamte Leberparenchym aus Zellgruppen zusammensetzt, die durch Teilung von Progenitorzellen entstehen, lässt sich jeweils nur ein sehr kleiner Teil aller klonalen Proliferate darstellen. Hinzu kommt eine verfahrensbedingt reduzierte Sensitivität. Beispielsweise ermöglicht die von Mason eingesetzte Methode zum Nachweis integrierter HBV-DNA lediglich den Nachweis von Genomfragmenten mit einer maximalen Entfernung von 1.000 bp von der Schnittstelle des eingesetzten Restriktionsenzym. Zusätzlich wird die Zahl nachgewiesener Klone durch fehlende Primerbindung, z. B. in Folge von Mutationen viraler Genomsequenzen, reduziert. Andererseits wird die Größe der nachgewiesenen Klone durch den technisch nötigen Verdünnungsschritt vor Ansetzen der PCR überschätzt, kleine Proliferate mit einer Größe von weniger als 100 Zellen können nicht nachgewiesen werden (Mason, 2010). Mit Hilfe der HBsAg-Färbung war auch der Nachweis sehr kleiner Patches möglich, die beim Vergleich mit der COX-Färbung nachweislich klonal waren (s. Abb. 11). An diesem Beispiel wird deutlich, dass die Anwendung und der Vergleich verschiedener Nachweismethoden zur Untersuchung der Leberregeneration bei chronischer HBV-Infektion Aspekte beleuchten, die beim Einsatz eines einzelnen Verfahrens nicht erkannt würden (s. Abb. 12).



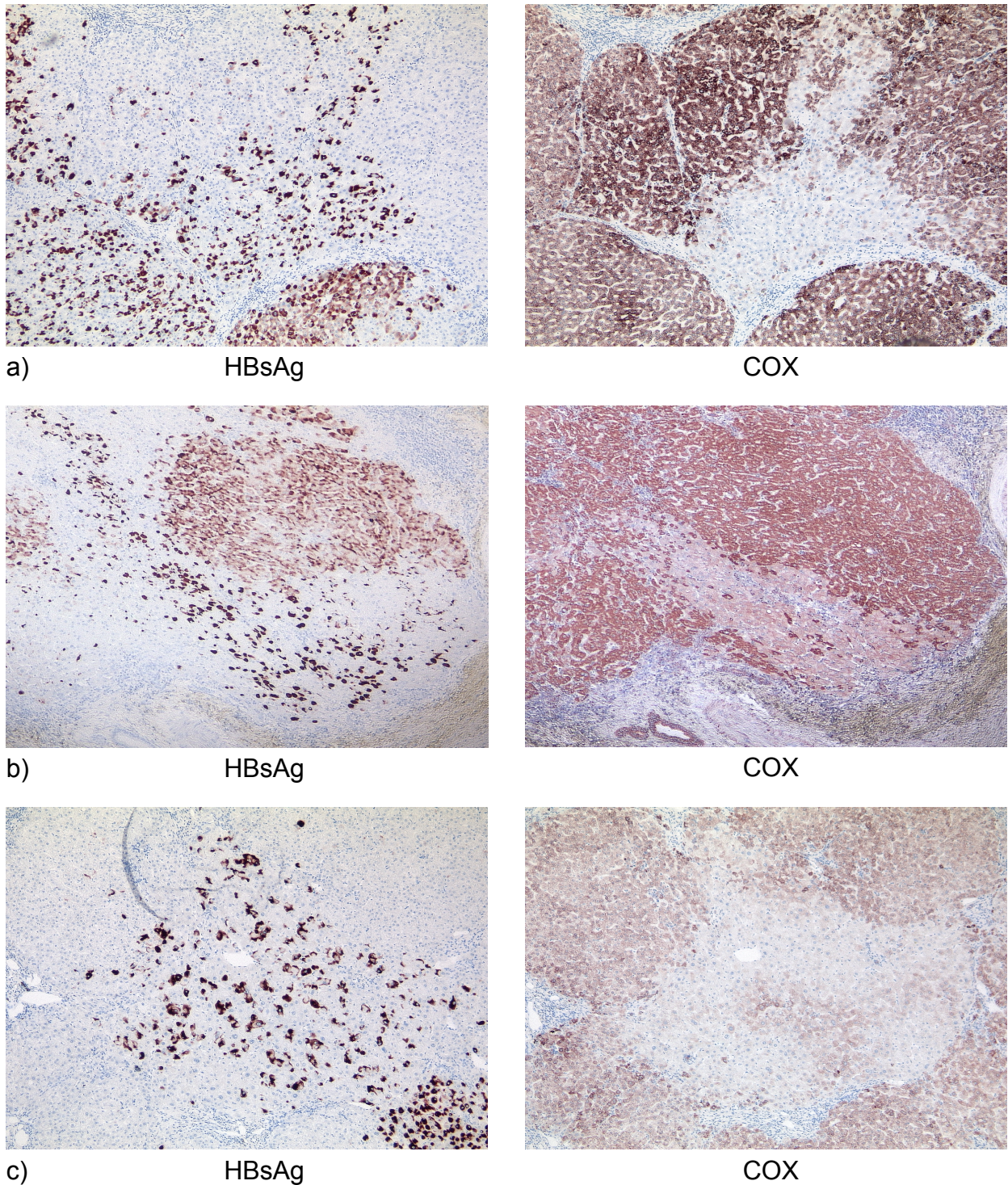
**Abb. 11 a-c** : Kleine HBsAg-Patches mit einer Größe von etwa 100 Zellen.



**Abb. 12:** Darstellung klonaler Proliferate in chronisch HBV-infiziertem Lebergewebe mit Hilfe unterschiedlicher Marker. HBsAg<sup>+</sup>: HBsAg exprimierende Zellen. Int. HBV-DNA: Integration HBV-DNA. PräS-Mut.: PräS-Mutation. Abhängig von der verwendeten Methode lassen sich klonale Zellgruppen in Geweben nachweisen. Die Gesamtmenge aller durch die in dieser Arbeit verwendeten HBsAg-Färbung darstellbaren klonalen Proliferate ist rot eingezeichnet. Durch genetische Methoden wie Analyse integrierter DNA-Fragmente (Mason, 2010) oder PräS-Mutationsnachweis (Fan, 2001; Wang, 2003) erkennbare klonale Proliferate sind als schwarze Kreise dargestellt. Im zeitlichen Verlauf kann es zum Verlust der HBsAg-Positivität kommen (rot schraffierte Fläche). Die davon betroffenen Zellgruppen wären mittels anderer Methoden ggfs. noch als klonal zu identifizieren.

Die Grenzen der HBsAg-Färbung zum Nachweis klonaler Proliferate werden deutlich, wenn man die HBsAg-Expression im zeitlichen Verlauf betrachtet. Wie zuvor beschrieben kann das Merkmal der HBsAg-Expression im Laufe der Zeit verlorengehen, zum Beispiel durch mutationsbedingten Verlust des S-Gens integrierter DNA-Abschnitte (Freitas, 2014), oder durch Verlust der cccDNA im Laufe mehrerer Zellteilungen (Zhang, 2003). Interessant ist in diesem Zusammenhang der Nachweis von DMP, die in der HBsAg-Färbung als Gruppierung positiver Einzelzellen imponieren, sich in der COX-Färbung aber eindeutig als scharf begrenzter, klonaler Patch darstellen (s. Abb. 13). Möglicherweise handelt es sich hier um ehemals vollständig HBsAg-positive Gewebsareale, die im Laufe der Zeit die Fähigkeit zur HBsAg-Synthese verlieren.

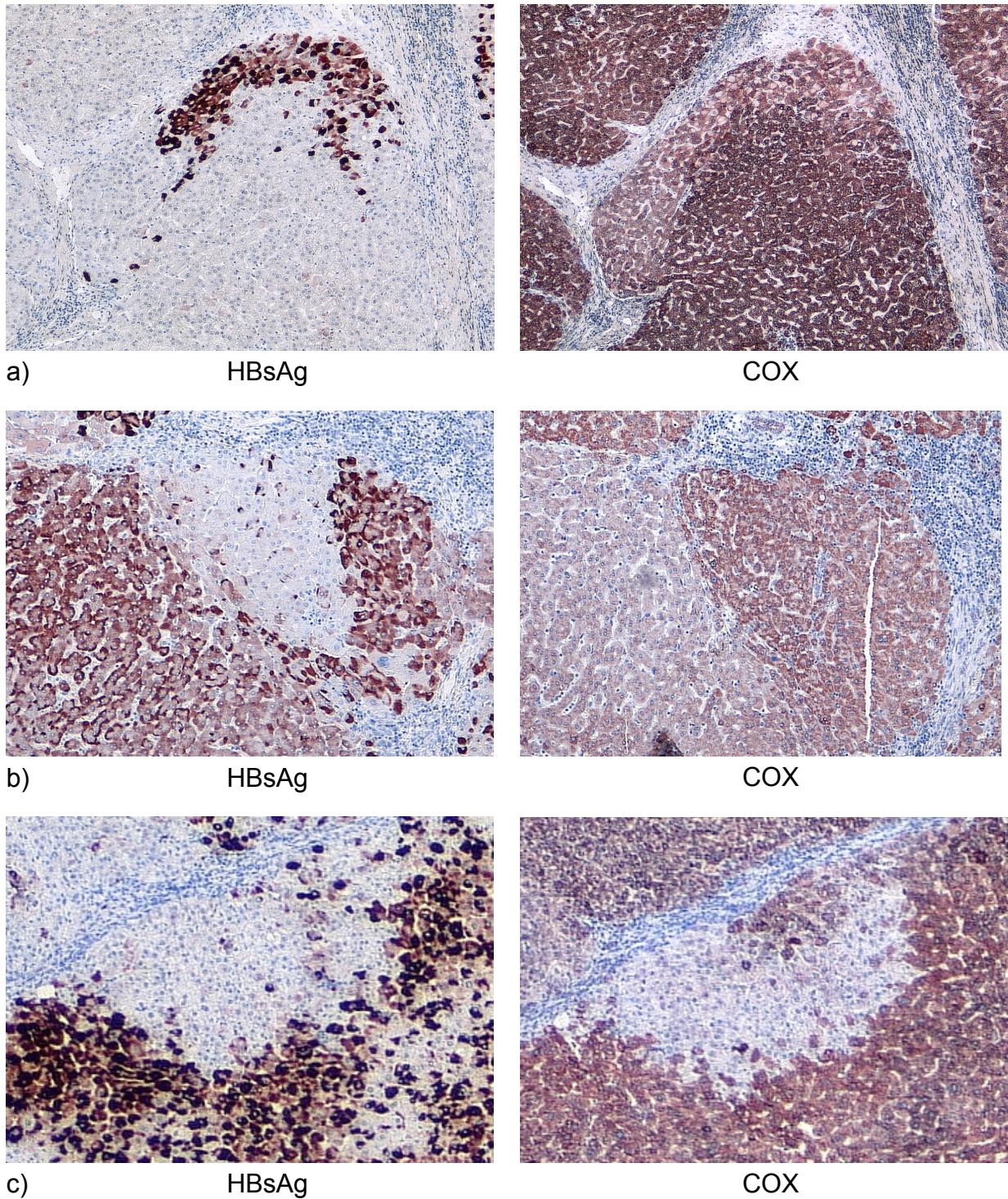




**Abb. 13 a-c:** DMP mit Gruppierung positiver Einzelzellen in der HBsAg-Färbung.

Die enzymatische Aktivität der COX und die cytoplasmatische Expression von HBsAg sind zeitlich und kausal voneinander unabhängig auftretende Ereignisse. Da beide Markerereignisse voneinander unbeeinflusst in derselben Zelle auftreten können, ist ein Vergleich HBsAg- und COX-gefärbter Parenchymareale anhand von Serienschnitten mög-

lich. Dabei treten auch semi-identische DMP auf, deren Grenzen nicht zu 100 % deckungsgleich sind (s. Abb. 14). Der Grund dafür ist das zeitlich versetzte Auftreten der COX-Mutation und der HBsAg-Expression.



**Abb. 14:** Semi-identische Patches. (a+b) COX-Patches mit HBsAg-positivem und HBsAg-negativem Anteil. (c) HBsAg-Patch mit COX-positivem und COX-negativem Anteil.

Eine weitere Voraussetzung für die Entstehung semi-identischer Patches ist die Fähigkeit der hepatischen Vorläuferzellen zu symmetrischer Zellteilung. Stamm- oder Vorläuferzellen teilen sich typischerweise asymmetrisch. Dabei entstehen eine differenzierte Zelle und eine neue Stammzelle mit erhaltener Teilungskapazität. Unter bestimmten Voraussetzungen erhalten Stammzellen die Fähigkeit zur symmetrischen Reduplikation, bei der beide Tochterzellen entweder Stammzellen oder differenzierte Zellen sind. Diese Fähigkeit ist abhängig von der Mikroumgebung der Stammzelle, die auch als Stammzellnische bezeichnet wird, und der Regulierung und dem Erhalt ihrer Teilungsfähigkeit dient (Kim und Shibata, 2002).

Die Entstehung eines semi-identischen, COX-negativen Patches mit HBsAg-positivem und HBsAg-negativem Anteil (s. Abb. 14a) lässt sich wie folgt erklären: Eine Vorläuferzelle entwickelt durch mitochondriale Mutation eine enzymatisch darstellbare Aktivitätsminderung der COX, ihre Nachkommen bilden einen COX-negativen Patch. Nach einer gewissen Zeit ereignet sich durch Veränderung von Faktoren der Stammzellnische mindestens eine symmetrische Zellteilung, bei der in der Tochtergeneration zwei neue teilungsfähige Zellen entstehen. Eine dieser Zellen wird durch ein zweites Markerereignis, beispielsweise durch eine cytoplasmatische HBsAg-Einlagerung, gekennzeichnet. Infolgedessen werden ihre Nachkommen durch das Merkmal der HBsAg-Positivität von den Nachkommen ihrer Schwesterzelle unterscheidbar. Diese bilden die HBsAg-negative Hälfte des ursprünglich COX-negativ markierten klonalen Zellareals. In diesem Beispiel wäre als zweites Markerereignis auch ein Verlust der HBsAg-Expression möglich, entweder wie zuvor beschrieben durch Mutation oder Verlust der viralen Erbinformation, oder durch immuninduzierte, zytokinvermittelte Beseitigung der chronischen Infektion.

Die Reihenfolge des Auftretens der COX- und HBsAg-Markierung ist dabei austauschbar. Ist die zuerst markierte Vorläuferzelle z. B. HBsAg-negativ, resultiert ein HBsAg-Patch mit einem COX-positiven und einem COX-negativen Anteil (s. Abb. 14 c). So wird anschaulich, dass HBsAg-positive Parenchymareale die Leberregeneration in Form von klonalen Proliferaten abbilden.

## 6. Zusammenfassung

Die chronische Hepatitis B ist definiert durch die anhaltende Produktion des viralen Hüllproteins HBsAg, das im Serum infizierter Personen nachweisbar ist. HBsAg akkumuliert außerdem im Cytoplasma einiger Leberzellen und ist durch immunhistochemische Färbung nachweisbar. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Färbeverhalten und der Verteilung HBsAg-positiver Zellen im Leberparenchym und deren Bedeutung für den Verlauf der HBV-Infektion. Charakteristischerweise treten HBsAg-positive Zellen bei manchen Infizierten in zusammenhängenden Gruppen auf. Solche HBsAg-positiven Leberzellareale entstehen möglicherweise durch klonale Expansion einer HBV-infizierten hepatozytären Vorläuferzelle, die das HBV-Genom bei der Zellteilung an ihre Nachkommen vererbt. Alle Zellen eines solchen HBsAg-Areals wären genetisch identisch/monoklonal. Eine histologische Methode zur Darstellung genetisch identischer Zellgruppen ist die Färbung des mitochondrialen Enzyms Cytochrom-c-Oxidase. Ein Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung von HBsAg-positiven Zellgruppen auf eine monoklonale Entstehung durch Vergleich von HBsAg- und COX-Färbung in Serienschnitten.

Im Rahmen einer retrospektiven Analyse wurden HBsAg-Färbungen von 35 Leberproben chronisch HBV-infizierter Patienten ausgewertet. In 9 Proben der 22 HBsAg-positiven Proben trat HBsAg ausschließlich in einzelnen Leberzellen auf. Für die Proben mit gruppierten HBsAg-Arealen wurde zusätzlich ein direkter COX-Serienschnitt angefertigt und mit der HBsAg-Färbung verglichen. Sowohl in der HBsAg- als auch in der COX-Färbung stellten sich homogen gefärbte Zellgruppen mit scharfen Begrenzungen, Patches genannt, dar. Die Begrenzungen dieser Patches wurden miteinander verglichen. Lagen exakt übereinstimmende Patchgrenzen in beiden Färbungen vor, wurden diese als doppelt markierte Patches (DMP) bezeichnet.

Bei der Auswertung der insgesamt 437 HBsAg- und 316 COX-Patches zeigte sich, dass DMP in 9 von 14 untersuchten Patientenfällen nachweisbar waren. In keinem Fall wurden sich widersprechende oder einander überschneidende COX- und HBsAg-Patchgrenzen nachgewiesen, wie sie in Folge einer hämatogenen Verbreitung des HBV-Virus im Parenchym zu erwarten wären. Der Nachweis von DMP belegt, dass HBsAg-positive Patches monoklonal sind. Sie entstehen möglicherweise durch die Weitergabe des HBV-Erbmaterials in integrierter Form oder als cccDNA von einer hepatischen Vorläuferzelle an ihre Nachkommen. In unserer Untersuchung fand sich kein Hinweis auf ein prä-

malignes Potential HBsAg-positiver Zellen. Es besteht kein nachweisbarer Zusammenhang zur Prognose der HBV-Infektion. Unsere Daten stehen im Einklang mit vorangehenden Arbeiten, die ein Auftreten HBsAg-positiver Areale bei chronischen Infektionen mit niedrigem Replikationsstatus beschreiben.

Die Entstehung monoklonaler HBsAg-positiver Felder steht im Zusammenhang mit der Proliferation des Leberparenchyms, die bei der Gewebsregeneration im Rahmen einer HBV-Infektion durch einen erhöhten Zellumsatz gekennzeichnet ist. Unsere Ergebnisse weisen auf die Entstehung der HBsAg-Patches bei der Leberregeneration nach dem Modell des limitierten kohärenten klonalen Wachstum hin, das erstmals von Nesbitt beschrieben wurde.

<b>7.1 Anhang</b>	Seite
7.1 Abbildungsverzeichnis	
<b>Abb. 1:</b> Serologische Marker der Hepatitis-B-Infektion (modifiziert nach Liang, 2009).	14
<b>Abb. 2:</b> Grading (entzündliche Aktivität) und Staging (Fibrosierung) bei chronischer Hepatitis B nach Desmet-Score (modifiziert nach Schirmacher, 2004).	17
<b>Abb. 3:</b> HBs-/ HBc-Expressionsmuster (modifiziert nach Bianchi und Gudat, 1975).	20
<b>Abb. 4:</b> Aufbau des Hepatitis-B-Virus und der nichtinfektiösen Partikel (modifiziert nach Modrow, 2010).	23
<b>Abb. 5:</b> Genomorganisation des Hepatitis-B-Virus (modifiziert nach Modrow, 2010).	25
<b>Abb. 6:</b> Immunhistochemische HBsAg-Expression in unterschiedlichen Infektionsphasen.	32
<b>Abb. 7:</b> Unterschiedliche Färbeverhalten einzelner Zellen in der HBsAg-Färbung.	39
<b>Abb. 8:</b> Patches mit unterschiedlichen Färbeintensitäten in der COX-Färbung.	40
<b>Abb. 9:</b> Doppelt markierte Patches (DMP) in direkten Serienschnitten aus Lebergewebe mit HBV-Infektion.	42
<b>Abb. 10:</b> Messung aller identifizierten Zellareale durch manuelles Ziehen eines Rahmens mit Hilfe des Programms AxioVision.	46
<b>Abb. 11:</b> Kleine HBsAg-Patches mit einer Größe von etwa 100 Zellen.	55
<b>Abb. 12:</b> Darstellung klonaler Proliferate in chronisch HBV-infiziertem Lebergewebe mit Hilfe unterschiedlicher Marker.	56
<b>Abb. 13:</b> DMP mit Gruppierung positiver Einzelzellen in der HBsAg-Färbung.	57
<b>Abb. 14:</b> Semi-identische Patches.	58
7.2 Tabellenverzeichnis	
<b>Tab. 1:</b> Übersicht der Proben mit HBsAg-positiven Zellgruppen, die durch Vergleich mit direkten COX-gefärbten Serienschnitten auf das Vorliegen von DMP untersucht wurden.	45
<b>Tab. 2:</b> Durchschnittliche Größe aller ausgewerteten HBsAg- und COX-Patches.	46

## 8. Literaturverzeichnis

- Adam AC, Faudou V, Paschen SA, Adam OM, Kahl P, Drebber U, Fischer HP, Büttner R. Hepatocarcinogenesis in non-cirrhotic liver is associated with a reduced number of clonal hepatocellular patches in non-tumorous liver parenchyma. *J Pathol* 2012; 228: 333-340
- Alison MR, Islam S, Lim S. Stem cells in liver regeneration, fibrosis and cancer: the good, the bad and the ugly. *J Pathol* 2009; 217: 282-298
- Alison MR, Vig P, Russo F, Bigger BW, Amofah E, Themis M, Forbes S. Hepatic stem cells: from inside and outside the liver? *Cell Prolif* 2004; 37: 1-21
- Beasley RP, Hwang LY, Lin CC, Chien CS. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22 707 men in Taiwan. *Lancet* 1981; 2: 1129-1133
- Bianchi L, Gudat F. Core- und Hüllenantigen des Dane-Partikels im Lebergewebe– Beziehungen zu den Verlaufsformen der Hepatitis B. *Leber Magen Darm* 1975; 5: 180-195
- Bianchi L, Gudat F. Sanded nuclei in hepatitis B: eosinophilic inclusions in liver cell nuclei due to excess in hepatitis B core antigen formation. *Lab Invest* 1976; 35: 1-5
- Bianchi L, Gudat F. Immunopathology of hepatitis B. In: Popper H, Schaffner F, Hrsg. *Progress in Liver Diseases*. New York: Grime and Stratton, 1979: 371-392
- Block TM, Guo H, Guo JT. Molecular virology of hepatitis B virus for clinicians. *Clin Liver Dis* 2007; 11: 685-706
- Bralet MP, Branchereau S, Brechot C, Ferry N. Cell lineage study in the liver using retroviral mediated gene transfer. Evidence against the streaming of hepatocytes in normal liver. *Am J Pathol* 1994; 144: 896-905
- Bruss V. Envelopment of the hepatitis B virus nucleocapsid. *Virus Res* 2004; 106: 199-209
- Busca A, Kumar A. Innate immune responses in hepatitis B virus (HBV) infection. *Virology* 2014; 11: 22
- Capaldi RA. Structure and assembly of cytochrome c oxidase. *Arch Biochem Biophys* 1990; 280: 252-262
- Carman WF, Jacyna MR, Hadziyannis S, Karayiannis P, McGarvey MJ, Makris A, Thomas HC. Mutation preventing formation of hepatitis B e antigen in patients

- with chronic hepatitis B infection. *Lancet* 1989; 2: 588-591
- Chisari FV. Hepatitis B virus transgenic mice: models of viral immunobiology and pathogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996; 206: 149-173
- Chisari FV, Ferrari C. Hepatitis B virus immunopathogenesis. *Annu Rev Immunol* 1995; 13: 29-60
- Chu CM, Liaw YF. Intrahepatic distribution of hepatitis B surface and core antigens in chronic hepatitis B virus infection. Hepatocyte with cytoplasmic/membranous hepatitis B core antigen as a possible target for immune hepatocytolysis. *Gastroenterology* 1987; 92: 220-225
- Chu CM, Yeh CT, Chien RN, Sheen IS, Liaw YF. The degrees of hepatocyte nuclear but not cytoplasmic expression of hepatitis B core antigen reflect the level of viral replication in chronic hepatitis B virus infection. *J Clin Microbiol* 1997; 35:102-105
- Cornberg M, Protzer U, Petersen J, Wedemeyer H, Berg T, Jilg W, Erhardt A, Wirth S, Sarrazin C, Dollinger MM, Schirmacher P, Dathe K, Kopp IB, Zeuzem S, Gerlich WH, Manns MP. Aktualisierung der S3-Leitlinie zur Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Hepatitis-B-Virusinfektion. *Z Gastroenterol* 2011; 49: 871-930
- Echevarria JM, Avellon A. Hepatitis B virus genetic diversity. *J Med Virol* 2006; 78 Suppl 1: 36-42
- Esumi M, Tanaka Y, Tozuka S, Shikata T. Clonal state of human hepatocellular carcinoma and non-tumorous hepatocytes. *Cancer Chemother Pharmacol* 1989; 23 Suppl: 1-3
- Falkowski O, An HJ, Ianus IA, Chiriboga L, Yee H, West AB, Theise ND. Regeneration of hepatocyte 'buds' in cirrhosis from intrabiliary stem cells. *J Hepatology* 2003; 39: 357-364
- Fan YF, Lu CC, Chang YC, Chang TT, Lin PW, Lei HY, Su IJ. Identification of a pre-S2 mutant in hepatocytes expressing a novel marginal pattern of surface antigen in advanced diseases of chronic hepatitis B virus infection. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15: 519-528
- Fan YF, Lu CC, Chen WC, Yao WJ, Wang HC, Chang TT, Lei HY, Shiao AL, Su IJ. Prevalence and significance of hepatitis B virus (HBV) pre-S mutants in serum and liver at different replicative stages of chronic HBV infection. *Hepatology* 2001; 33: 277-286
- Fellous TG, Islam S, Tadrous PJ, Elia G, Kocher HM, Bhattacharya S, Mears L, Turnbull



- DM, Taylor RW, Greaves LC, Chinnery PF, Taylor G, McDonald SAC, Wright NA, Alison MR. Locating the stem cell niche and tracing hepatocyte lineages in human liver. *Hepatology* 2009; 49: 1655-1663
- Fellous TG, McDonald SA, Burkert J, Humphries A, Islam S, De-Alwis NM, Gutierrez L, Tadrous PJ, Elia G, Kocher HM, Bhattacharya S, Mears L, El-Bahrawy M, Turnbull DM, Taylor RW, Greaves LC, Chinnery PF, Day CP, Wright NA, Alison MR. A methodological approach to tracing cell lineage in human epithelial tissues. *Stem Cells* 2009; 27: 1410-1420
- Fotiadu A, Tzioufa V, Vrettou E, Koufogiannis D, Papadimitriou CS, Hytioglou P. Progenitor cell activation in chronic viral hepatitis. *Liver Int* 2004; 24: 268-274
- Freitas N, Cunha C, Menne S, Gudima SO. Envelope proteins derived from naturally integrated hepatitis B virus DNA support assembly and release of infectious hepatitis delta virus particles. *J Virol* 2014; 88: 5742-5754
- Gerber MA, Hadziyannis S, Vissoulis C, Schaffner F, Paronetto F, Popper H. Electron microscopy and immunoelectronmicroscopy of cytoplasmic hepatitis B antigen in hepatocytes. *Am J Pathol* 1974; 75: 489-502
- Greaves LC, Preston SL, Tadrous PJ, Taylor RW, Barron MJ, Oukrif D, Leddham SJ, Deheragoda M, Sasieni P, Novelli MR, Jankowski JAZ, Turnbull DM, Wright NA, McDonald SAC. Mitochondrial DNA mutations are established in human colonic stem cells, and mutated clones expand by crypt fission. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 714-719
- Hadziyannis S, Gerber MA, Vissoulis C, Popper H. Cytoplasmic hepatitis B antigen in "ground-glass" hepatocytes of carriers. *Arch Pathol* 1973; 96: 327-330
- Hadziyannis SJ, Lieberman HM, Karvountzis GG, Shafritz DA. Analysis of liver disease, nuclear HBcAg, viral replication, and hepatitis B virus DNA in liver and serum of HBeAg Vs. anti-HBe positive carriers of hepatitis B virus. *Hepatology* 1983; 3: 656-662
- Hsia CC, Evarts RP, Nakatsukasa H, Marsden ER, Thorgeirsson SS. Occurrence of Oval-type Cells in Hepatitis B Virus-associated Human Hepatocarcinogenesis. *Hepatology* 1992; 16: 1327-1333
- Hsu HC, Lai MY, Su IJ, Chen DS, Chang MH, Yang PM, Wu CJ, Hsieh HC. Correlation of hepatocyte HBsAg expression with virus replication and liver pathology. *Hepatology* 1988; 8: 749-754

- Kim KM, Shibata D. Methylation reveals a niche: stem cell succession in human colon crypts. *Oncogene* 2002; 21: 5441-5449
- Lai CL, Dienstag J, Schiff E, Leung NW, Atkins M, Hunt C, Brown N, Woessner M, Boehme R, Condreay L. Prevalence and clinical correlates of YMDD variants during lamivudine therapy for patients with chronic hepatitis B. *Clin Infect Dis* 2003; 36: 687-696
- Lau JY, Bain VG, Davies SE, Alexander GJ, Williams R. Export of intracellular HBsAg in chronic hepatitis B virus infection is related to viral replication. *Hepatology* 1991; 14: 416-421
- Lavanchy D. Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures. *J Viral Hepat* 2004; 11: 97-107
- Lenhoff RJ, Summers J. Coordinate regulation of replication and virus assembly by the large envelope protein of an avian hepadnavirus. *J Virol* 1994; 68: 4565-4571
- Levrero M, Pollicino T, Petersen J, Belloni L, Raimondo G, Dandri M. Control of cccDNA function in hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 2009; 51: 581-592
- Liang TJ. Hepatitis B: the virus and disease. *Hepatology* 2009; 49: 13-21
- Lin WR, Lim SN, McDonald SAC, Graham T, Wright VL, Peplow CL, Humphries A. The histogenesis of regenerative nodules in human liver cirrhosis. *Hepatology* 2010; 51: 1017-1026
- Mani H, Kleiner DE. Liver biopsy findings in chronic hepatitis B. *Hepatology* 2009; 49: 61-71
- Mason WS, Jilbert AR, Summers J. Clonal expansion of hepatocytes during chronic woodchuck hepatitis virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 1139-1144
- Mason WS, Litwin S, Jilbert AR. Immune selection during chronic hepadnavirus infection. *Hepatol Int* 2008; 2: 3-16
- Mason WS, Liu C, Aldrich CE, Litwin S, Yeh MM. Clonal expansion of normal-appearing human hepatocytes during chronic hepatitis B virus infection. *J Virol* 2010; 84: 8308-8315
- Modrow S, Falke D, Truyen U. Viren mit doppelsträngigem DNA-Genom. In: Modrow S, Falke D, Truyen U, Schätzl H, Hrsg. *Molekulare Virologie*. Heidelberg-Berlin: Spektrum Akademischer Verlag, 2003: 449-472
- Naoumov NV, Portmann BC, Tedder RS, Ferns B, Eddleston AL, Alexander GJ,

- Williams R. Detection of hepatitis B virus antigens in liver tissue. A relation to viral replication and histology in chronic hepatitis B infection. *Gastroenterology* 1990; 99: 1248-1253
- Nesbitt MN. Chimeras vs X inactivation mosaics: significance of differences in pigment distribution. *Dev Biol* 1974; 38: 202-207
- Newbold JE, Xin H, Tencza M, Sherman G, Dean J, Bowden S, Locarnini S. The covalently closed duplex form of the hepadnavirus genome exists in situ as a heterogeneous population of viral minichromosomes. *J Virol* 1995; 69: 3350-3357
- Overturf K, al-Dhalimy M, Ou CN, Finegold M, Grompe M. Serial transplantation reveals the stem-cell-like regenerative potential of adult mouse hepatocytes. *Am J Pathol* 1997; 151: 1273-1280
- Pawlotsky JM. The concept of hepatitis B virus mutant escape. *J Clin Virol* 2005; 34 Suppl 1: 125-129
- Pollicino T, Cacciola I, Saffiotti F, Raimondo G. Hepatitis B virus PreS/S gene variants: pathobiology and clinical implications. *J Hepatol* 2014; 61: 408-417
- Portmann B, Galbraith RM, Eddleston AL, Zuckerman AJ, Williams R. Detection of HBSAG in fixed liver tissue - use of a modified immunofluorescent technique and comparison with histochemical methods. *Gut* 1976; 17: 1-9
- Ray MB, Desmet VJ, Bradburne AF, Desmyter J, Fevery J, De Groote J. Differential distribution of hepatitis B surface antigen and hepatitis B core antigen in the liver of hepatitis B patients. *Gastroenterology* 1976; 71: 462-469
- Robert Koch-Institut, 2013: Hepatitis B. RKI-Ratgeber für Ärzte. [http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber\\_HepatitisB.html](http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_HepatitisB.html) (Zugriffsdatum: 01.01.2015)
- Robinson WS, Klote L, Aoki N. Hepadnaviruses in Cirrhotic Liver and Hepatocellular Carcinoma. *J Med Virol* 1990; 31: 18-32
- Schirmacher P, Fleig WE, Dienes HP. Biopsische Diagnostik der chronischen Hepatitis. *Gastroenterol* 2004; 42: 175-185
- Shafritz DA, Kew MC. Identification of integrated hepatitis B virus DNA sequences in human hepatocellular carcinomas. *Hepatology* 1981; 1: 1-8
- Sorrell MF, Belongia EA, Costa J, Gareen IF, Grem JL, Inadomi JM, Kern ER, McHugh JA, Petersen GM, Rein MF, Strader DB, Trotter HT. National Institutes of Health consensus development conference statement: management of hepatitis B.

- Hepatology 2009; 49: 4-12
- Su IJ, Lai MY, Hsu HC, Chen DS, Yang PM, Chuang SM, Sung JL. Diverse virological, histopathological and prognostic implications of seroconversion from hepatitis B e antigen to anti-HBe in chronic hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 1986; 3:182-189
- Sun C, Jin XL, Xiao JC. Oval cells in hepatitis B virus-positive and hepatitis C virus-positive liver cirrhosis: histological and ultrastructural study. *Histopathology* 2006; 48: 546-555
- Summers J, Smith PM, Horwich AL. Hepadnavirus envelope proteins regulate covalently closed circular DNA amplification. *J Virol* 1990; 64: 2819-2824
- Summers J, Smith PM, Huang MJ, Yu MS. Morphogenetic and regulatory effects of mutations in the envelope proteins of an avian hepadnavirus. *J Virol* 1991; 65: 1310-1317
- Theise ND, Saxena R, Portmann BC, Thung SN, Yee H, Chiriboga L, Kumar A, Crawford JM. The canals of Hering and hepatic stem cells in humans. *Hepatology* 1999; 30: 1425-1433
- Theise ND, Bodenheimer HC Jr., Ferrell LD Acute and chronic viral hepatitis. In: Burt AD, Portmann BC, Ferrell LD, Hrsg. *MacSween's Pathology of the Liver*. 5th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone/Elsevier; 2007: 399–442
- Tur-Kaspa R, Burk RD, Lieberman HH, Shafritz DA. Hepatitis B virus gene expression in relation to virus replication and HBV-DNA integration. New concepts for antiviral therapy. *J Hepatol* 1986; 3 Suppl 2: 25-33
- Tuttleman JS, Pourcel C, Summers J. Formation of the pool of covalently closed circular viral DNA in hepadnavirus-infected cells. *Cell* 1986; 47: 451-460
- Wang HC, Huang W, Lai MD, Su IJ. Hepatitis B virus pre-S mutants, endoplasmic reticulum stress and hepatocarcinogenesis. *Cancer Sci* 2006; 97: 683-688
- Wang HC, Wu HC, Chen CF, Fausto N, Lei HY, Su IJ. Different types of ground glass hepatocytes in chronic hepatitis B virus infection contain specific pre-S mutants that may induce endoplasmic reticulum stress. *Am J Pathol* 2003; 163: 2441-2449
- World Health Organization, 2002: Hepatitis B. [http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/HepatitisB\\_whocdscsrlyo2002\\_2.pdf](http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/HepatitisB_whocdscsrlyo2002_2.pdf) (Zugriffsdatum: 22.05.2015)
- Weber B. Genetic variability of the S gene of hepatitis B virus: clinical and diagnostic impact. *J Clin Virol* 2005; 32: 102-112

## 9. Danksagung

Danken möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Reinhard Büttner für die Bereitstellung des Themas und des Archivmaterials des Instituts für Pathologie. Ein besonderer Dank gilt in diesem Zusammenhang Prof. Dr. med. Hans-Peter Fischer, der den Großteil der in dieser Arbeit verwendeten Fälle primär ausgewertet und befundet hat. Für die Anfertigung der histologischen Präparate und das immer hilfsbereite und freundliche Verhalten mir gegenüber einen großen Dank an die Mitarbeiter des Instituts für Pathologie unter der Leitung von Eva Steiner.

Ein besonderer Dank gilt Dr. med. Alexander C. Adam für die fachlich und menschlich hervorragende Betreuung, seine stets produktiven Anregungen während des Schreibens und für die abschließende Durchsicht der Arbeit.

Dankeschön meinem Bruder Florian für die technische Hilfe bei der grafischen Gestaltung, und meiner gesamten Familie, ohne deren Unterstützung und Verständnis mir gegenüber die Anfertigung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.