

Katharina Jundt

Nachweis viraler Nukleinsäuresequenzen in explantierten Lebern

Geboren am 09.11.1973 in Heidelberg

Reifeprüfung am 22.05.92 in Heidelberg

Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1992/ 93 bis WS 1998/ 99

Physikum am 07.09.1994 an der Ruprecht-Karls-Universität in Heidelberg

Klinisches Studium in Heidelberg

Praktisches Jahr in München

Staatsexamen am 20.04.1999 an der Ludwig-Maximilians-Universität in München

Promotionsfach: Pathologie

Doktorvater: Herr Prof. Dr. Dr. h. c. H. F. Otto

Die orthotope Lebertransplantation (OLT_x) ist die Therapie der Wahl für Patienten mit einer akuten oder chronisch-progredienten Lebererkrankung im Endstadium, für die es keine andere Alternative der Behandlung gibt. Dabei war es vor allem durch Fortschritte auf den Gebieten der Chirurgie und Anästhesiologie sowie durch die Einführung neuer Immunsuppressiva während der letzten drei Dekaden möglich, die Einjahresüberlebensraten nach Lebertransplantation auf 85% bis 90% zu steigern. Eine wichtige Rolle im Hinblick auf die Langzeitprognose des Transplantates spielen virale Infektionen – insbesondere mit dem Hepatitis-C- und -B-Virus. Die Arbeit beschäftigte sich deshalb mit dem Nachweis von Nukleinsäuresequenzen dieser Viren in 123 Leberexplantaten, die in der Zeit zwischen 1988 und 1996 im Transplantationszentrum Heidelberg operiert wurden.

Der Nachweis eines Virusbefalls des Transplantates kann molekularbiologisch mit Hilfe der PCR und dem Nachweis entsprechender viraler Nukleotide im Lebergewebe erfolgen. Vor allem wegen der Empfindlichkeit viraler RNA im Falle einer HCV-Infektion ist das hierfür am besten geeignete Material das unmittelbar nach Explantation schockgefrorene Lebergewebe. Es wäre allerdings von großem Vorteil, wenn für diese Untersuchungen auch routinemäßig prozessiertes Gewebe, also formalinfixiert und paraffineingebettet, verwendet werden könnte.

Erstes Ziel dieser Arbeit war es deshalb, durch Nachweis viraler Nukleotidsequenzen in schockgefrorenem Gewebematerial alle HBV- und HCV-infizierten Explantate eines Trans-

plantationszentrums zu erfassen und deren Zuordnung zu den verschiedenen Erkrankungen vorzunehmen. Die beiden Viren ließen sich nicht nur wie zu erwarten in den Gruppen nachweisen, bei denen bereits vor Explantation serologisch eine Hepatitis C bzw. B festgestellt wurde. So gehörten in erster Linie virale wie auch alkoholbedingte Zirrhosen, hepatozelluläre Karzinome und das akute Leberversagen zu den Erkrankungen, bei denen HCV-RNA bzw. HBV-DNA detektierbar war. Die entscheidende Rolle, die das Hepatitis-C-Virus bei der Entstehung des fulminanten Leberversagens nach den Ergebnissen dieser Arbeit spielt, wird unter Experten sehr konträr diskutiert.

Nächstes Ziel der Untersuchungen war es im Falle einer infizierten Leber mit einem hepatozellulären Karzinom (HCC) den Virusbefall des Tumorgewebes selbst zu überprüfen. Über die Rolle des HCV bei der Onkogenese des hepatozellulären Karzinoms bestehen viele Hypothesen. Der Nachweis der HCV-RNA auch im Tumorgewebe selbst im Rahmen dieser Experimente, läßt auf eine aktive Funktion in der Karzinogenese schließen, da hierfür eine Replikation des Virus beziehungsweise seine Persistenz nötig ist. Ob nun allerdings HCV einen direkt onkogenen Effekt auf infizierte Hepatozyten besitzt (immerhin wurde in einem Fall auch aus nicht-zirrhotoser Leber mit einem HCC das Virus extrahiert) oder ob die kontinuierliche Zellregeneration als Reaktion auf den chronischen nekroinflammatorischen Prozeß die Leberzellen zu Mutationen und malignen Transformationen prädisponiert, bleibt weiterhin eine Frage, die auch im Hinblick auf eine mögliche Prävention geklärt werden muß. Die Induktion der Onkogenese durch eine HBV-Infektion ist im Gegensatz dazu schon zu einigen Teilen aufgedeckt. So ließ sich das Virus auch hier im Tumorgewebe selbst identifizieren, ein Sachverhalt, der die These der aktiven Replikation und Integration der Virus-DNA in das menschliche Genom bei der Karzinogenese unterstützt.

Letztes Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe der anhand des Cryomaterials als sicher HCV-infizierten Explantate eine optimale Methode des HCV-RNA-Nachweises auch am fixierten und paraffineingebetteten Gewebematerial zu etablieren.

Der Einsatz von Formalin als Fixierungsmittel für molekularbiologisches Arbeiten stellte sich in den Experimenten dieser Arbeit nur als sehr eingeschränkt möglich heraus. Trotz vielfältiger Modifikationen der Extraktionsmethode war die Detektion der HCV-RNA aus formalinfixiertem Gewebe in nur 35% der Fälle möglich. Limitierender Faktor war meist die Menge der extrahierbaren Gesamt-RNA. Auch eine Zunahme der Fixierungszeit sorgte für einen progredienten Untergang bzw. eine Maskierung der HCV-RNA. Unter Zuhilfenahme des Enzymes Proteinase K, das hier durch seine Fähigkeit, unspezifisch Proteine zu spalten, als „Vorverdau“

fungierte, konnte der Ertrag an extrahierter RNA um ein Vielfaches erhöht werden. Dadurch gelang es, in 71% der Fälle eine HCV-Positivität zu reproduzieren. Der Einsatz des Enzyms sorgte jedoch nicht nur für eine quantitative Verbesserung der Gesamtertrages an RNA, sondern auch für eine Demaskierung der viralen RNA. Somit war es möglich, auch nach längerer Fixierungszeit HCV-RNA zu detektieren. Der Einsatz eines neu auf dem Markt erschienenen Fixierungsmittels genannt NoTox[®] machte es möglich, HCV-RNA sogar noch nach 120-stündiger Fixierungsdauer nachzuweisen, obwohl die Menge an extrahierter RNA nicht signifikant erhöht war. Dies ließ den Schluß zu, daß NoToX[®] im Gegensatz zu Formalin in qualitativer Hinsicht die vorhandenen Nukleinsäuren besser konservierte und somit für molekularbiologisches Arbeiten sehr gut geeignet ist. Da sich diese Substanz auch hervorragend für eine histologische Aufbereitung des Gewebes verwenden läßt und zudem wesentlich weniger giftig als Formalin einzustufen ist, wäre ein Einsatz bei der routinemäßigen Asservierung des Gewebes in der Pathologie für die Zukunft zu erwägen.