Aus der Universitätsklinik für
Kinderheilkunde und Jugendmedizin Tübingen
Abteilung Kinderchirurgie
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. J. Fuchs

Untersuchungen zur viralen Genese der Extrahepatischen Gallengangsatresie

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Judith Vanessa Junginger
aus
Tübingen
2005

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Professor Dr. P. Schweizer
2. Berichterstatter: Professor Dr. G. Bruchelt

Meinen Eltern
in Dankbarkeit
gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

I EINLEITUNG 1

I.1 Definition 1

I.2 Typeneinteilung 1

I.3 Häufigkeit und Geschlechtsverteilung 2

I.4 Klinisches Bild und Diagnostik 3

I.5 Differentialdiagnosen 4

I.6 Geschichtliches 4

I.7 Therapie 4

I.8 Prognose 6

I.9 Ätiologie und Pathogenese 7

I.9.1 Genetische Ursache 7

I.9.2 Immunologische Ursache 10

I.9.3 Toxische Ursache 10

I.9.4 Pathologische Gallensäuren als Ursache 11

I.9.5 Pankreassaftreflux in die Gallengänge als Ursache 11

I.9.6 EHGA Folge einer lokalen Ischämie 11

I.9.7 Infektion als Ursache für die Entstehung einer EHGA 12

I.9.8 EHGA als Folge einer embryonalen Fehlentwicklung 18

I.9.9 Vermehrte Zellproliferation durch Wachstumsfaktoren 19

II FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG DER ARBEIT 20

III MATERIAL UND METHODEN 21

III.1 Prinzip der Polymerasekettenreaktion (PCR) 21

III.2 Material (Krankengut und Gewebeproben) 27

III.3 Verarbeitung der Proben 29

III.3.1 Verarbeitung der Proben im Labor des Instituts für Pathologie der Universitätsklinik Tübingen 29

III.3.2 Verarbeitung der Biopsate im Labor der Kinderchirurgie der Universitätsklinik Tübingen 33

III.3.2.1 Patientenproben für eigene Untersuchungen 33
III.3.2.2 Allgemeines Verbrauchsmaterial und Geräte 33
III.3.2.3 Nukleinsäuren-Extraktion mit Glasmilch 34
III.3.2.4 Polymerasekettenreaktion (PCR) 35
III.3.2.4.1 Nachweis von β-Aktin-mRNA mittels RT-PCR mit vorherigem DNase-Verdau 38
III.3.2.4.2 Nachweis von Rotavirus C-RNA (Gen 5 & 6) mittels PCR 39
III.3.2.4.3 Nachweis von Rotavirus A mittels PCR 41
III.3.2.5 Agarosegel-Elektrophorese 43
III.3.2.6 Silberfärbung für PCR-Produkte 44

IV ERGEBNISSE 46
IV.1 Ergebnisse der routinemäßig durchgeführten nested-PCR aus dem Labor des Instituts für Pathologie der Universitätsklinik Tübingen 46
IV.2 Statistische Auswertung 48
IV.3 Ergebnisse der nested-RT-PCR aus dem Labor der Kinderchirurgie der Universitätsklinik Tübingen 49
IV.3.1 Ergebnisse der nested-RT-PCR für β-Aktin-mRNA mit DNase-Verdau 50
IV.3.2 Ergebnisse der nested-RT-PCR für das Gen 5 des Rotavirus C 51
IV.3.3 Ergebnisse der nested-RT-PCR für das Gen 5 des Rotavirus C mit DNase-Verdau 52
IV.3.4 Ergebnisse der nested-RT-PCR für das Gen 6 des Rotavirus C 53
IV.3.5 Ergebnisse der nested-RT-PCR für Rotavirus A 54

V DISKUSSION 55
V.1 Diskussion der eigenen Ergebnisse im Lichte einer Methodenkritik 55
V.1.1 Methodenkritik und Beurteilung der Zuverlässigkeit der Untersuchungen aus dem Institut für Pathologie der Universitätsklinik Tübingen 55
V.1.2 Beurteilung der Untersuchungen im Labor der Kinderchirurgie der Universitätsklinik Tübingen 56

V.2 Vergleich der eigenen Ergebnisse mit der Infektionsrate kongenitaler Virusinfektionen des Kollektivs aus der Literatur **59**

V.3 Diskussion der in der Literatur berichteten Ergebnisse zur viralen Genese der EHGA, das Pro und Contra **61**

V.4 Diskussion eigener Ergebnisse versus Ergebnisse aus der Literaturrecherche **72**

VI ZUSAMMENFASSUNG UND SCHLUSSFOLGERUNG **76**

LITERATURVERZEICHNIS **78**

Danksagung

Lebenslauf

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenosin
Abb.	Abbildung
Ad	zu
ADV	Adenovirus
Ag	Antigen
AMV	Avian Myeloblastosis Virus
anti-	Antikörper
bp	Basenpaar(e)
bzw.	beziehungsweise
C	Cytidin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CDC	Choledochuszyste
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (Copy DNA)
CMV	Cytomegalievirus
Cox A	Coxsackie-A-Virus
Cox B	Coxsackie-B-Virus
D.	Ductus
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	Desoxycytidin-5'-triphosphat
dGTP	Desoxyguanosin-5'-triphophat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphophat
dTTP	Desoxythymidin-5'-triphosphat
EBV	Epstein-Barr-Virus
ECHO	ECHO-Viren
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EHGA	Extrahepatische Gallengangsatresie
EIA	Enzymimmunassay
ELISA	Enzym-linked immuno sorbent assay
etc.	et cetera
EV	Enteroviren
FH	Fulminante Hepatitis
g	Gramm
G	Guanosin
GAPDH	Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase
GCH	Neonatale Riesenzellhepatitis
GCR	Gruppe C Rotavirus
GM	Größenmarker
h	Stunde
HAV	Hepatitis-A-Virus
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCl	Salzsäure

HCV	Hepatitis-C-Virus
HGV	Hepatitis-G-Virus
HHV 6	Humanes Herpesvirus Typ 6
H_2O	Wasser (Hydrogeniumoxid)
HPV	Humanes Papillomavirus
HSV 1	Herpes-simplex-Virus Typ 1
HSV 2	Herpes-simplex-Virus Typ 2
IgG	Immunglobuline der Klasse G
IgM	Immunglobuline der Klasse M
J	Jahre
kb	Kilobasen = Anzahl der Nukleotide 1 kb = 1000 Nukleotide
KCl	Kaliumchlorid
Lig.	Ligamentum
M	Mol
m	männlich
mg	Milligramm
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimol
Mo	Monate
mol	molekulare Einheit der Stoffmenge
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid (Kochsalz)
neg.	negatives Ergebnis
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
OD	optische Dichte
P	Patient
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Probeexzision
pH	Kennzahl für den Säuregrad bzw. die Basizität einer wässrigen Lösung
pmol	pikomol
pos.	positives Ergebnis
PVB 19	Parvovirus B 19
RIBA	Recombinant immunoblot assay
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RSV	Respiratory Syncytial Virus
RT	Reverse Transkription
RTase	Reverse Trankriptase
RT-PCR	reverse transcriptase PCR/ PCR-Methode mit RNA als Ausgangsmaterial

SDS	Sodiumdodecylsulfat
SiO_2	Siliziumdioxid als Glasmilch
T	Thymidin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq-Pol	Thermus aquaticus-DNA-Polymerase
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethan
U	Units (Einheiten)
unspez.	unspezifisch
UV	Ultraviolett
V	Volt
VZV	Varizella-Zoster-Virus
w	weiblich
Wo	Wochen
z.B.	zum Beispiel
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	mikromolar
µm	Mikrometer

I EINLEITUNG

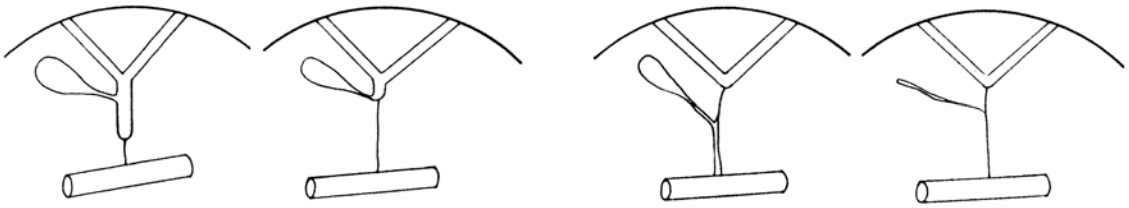
I.1 Definition

Der Begriff der Atresie stammt vom griechischen Wort „atretos“ = ohne Öffnung.
In der Medizin versteht man darunter einen angeborenen Verschluß von Hohlorganen oder natürlichen Körperöffnungen, wie zum Beispiel die Gallengangs-, Ösophagus- oder Analatresie.
In der klassischen Definition der Extrahepatischen Gallengangsatresie (EHGA), die Gegenstand dieser Arbeit ist, wird die Krankheit als angeborenes, teilweises oder totales Fehlen des Lumens der äußeren Gallengänge definiert. In den Definitionen der bisher vorliegenden Lexika wird die Möglichkeit des erworbenen Defektes (noch) nicht berücksichtigt.
Die Obliteration oder Diskontinuät des extrahepatischen Gallengangssystems führt zu einer Blockierung des Gallenflusses und somit zum Rückstau der Galle mit dem Ergebnis einer Cholestase. Ohne operative Korrektur führt diese Cholestase zur fortschreitenden konjugierten Hyperbilirubinämie, zur biliären Zirrhose mit portaler Hypertension. Zeichen dafür sind Aszites und Leberzelluntergang.
Die EHGA ist der häufigste Grund für eine Lebertransplantation im Kindesalter [17, 43].

I.2 Typeneinteilung

Die Gallengangsatresie wird in eine Intra- und Extrahepatische Gallengangsatresie (EHGA) eingeteilt.
Die EHGA wird wiederum in verschiedene Untergruppen gegliedert:
- „Korrigierbare“ Formen (10 %), d.h. Formen, bei denen nur die distalen Gänge betroffen sind, wie z.B. die Atresie des Ductus choledochus oder die Atresie des Ductus hepaticus communis. Da hier nur bestimmte Abschnitte der abführenden Gallenwege unterbrochen sind, die reseziert werden können, ist diese Form chirurgisch korrigierbar.
- „Nicht-korrigierbare“ Formen (90 %), bei denen auch die proximalen Gänge verschlossen sind, wie bei der Atresie der Ductus hepatici in der Leberpforte [94, 100].

Korrigierbare Formen der Extrahepatischen Gallengangsatresie



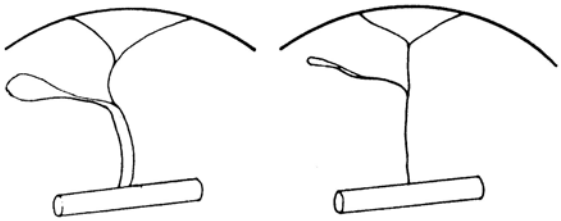
Typ I

Atresie des Ductus choledochus

Typ II

Atresie des Ductus hepaticus communis

Nicht-korrigierbare Formen der Extrahepatischen Gallengangsatresie



Typ III

Atresie der Ductus hepatici in der Leberpforte

Abb. 1 Einteilung der Extrahepatischen Gallengangsatresien in chirurgisch-relevante Typen (aus Schweizer P., 1980 [99])

I.3 Häufigkeit und Geschlechtsverteilung

Die Häufigkeit der Extrahepatischen Gallengangsatresie liegt zwischen 1:10.000 und 1:15.000 Lebendgeborenen [2, 49, 66].

Die Erkrankung tritt bei weiblichen Neugeborenen häufiger auf als bei männlichen [7, 13], es gibt jedoch auch Untersuchungen, die über eine Geschlechtsverteilung von rund 50:50 berichten [100]. In epidemiologischen Studien wird ein geographischer und jahreszeitlicher Einfluss auf die Häufigkeit der Erkrankung diskutiert [4, 20, 22, 49, 116, 132]. Eine Bestätigung dieser Studienergebnisse war bisher jedoch nicht möglich.

I.4 Klinisches Bild und Diagnostik

Klinisch ist die EHGA durch die Cholestase gekennzeichnet. Erste Anzeichen hierfür sind acholische Stühle und ein dunkelbraun gefärbter Urin. Ein Ikterus, der in den ersten Lebenstagen aufgrund der erst zunehmenden Gallenproduktion noch fehlen kann, tritt nicht bei allen Patienten auf. Durch den fehlenden Abfluss der Galle steigen das wasserlösliche direkte Bilirubin, Gallensäuren und weitere Gallenbestandteile, wie das Cholesterin im Serum an. Der Anstieg des Cholestaseenzyms γ-GT deutet ebenfalls auf eine Cholestase hin. Die Erhöhung der Transaminasen GPT und GOT ist bereits Ausdruck einer Schädigung der Hepatozyten.

Der Mangel an Gallensäuren im Darm führt zu Resorptionsstörungen verschiedener Vitamine. Besonders die verminderte Resorption von Vitamin K birgt das Risiko von (zerebralen) Blutungen, da die Vitamin K-abhängigen Gerinnungsfaktoren nicht ausreichend gebildet werden können [111].

Trotz der erheblichen Fortschritte in der pränatalen Diagnostik bleibt es weiterhin schwierig, die Diagnose pränatal zu stellen [23].

Die sichere Diagnose der EHGA ist nur postnatal durch eine Leberbiopsie, möglicherweise ergänzt durch eine Cholangiographie, möglich [100, 111].

Da es sich bei der EHGA möglicherweise um eine (entzündliche) Obliteration des extrahepatischen Gallengangsystems handelt [7], zeigen sich auch in der Histologie des Leberbiopsats die charakteristischen Entzündungsinfiltrate mit geringer Anzahl von polymorphonukleären Leukozyten, Lymphozyten, Plasmazellen und Eosinophilen um den Gallengang herum [131].

Da die entzündlichen Infiltrate denen einer viralen Infektion gleichen, wurde eine virale Ursache von mehreren Autoren in Betracht gezogen [9].

In anderen immunhistochemisch und molekularbiologisch orientierten Untersuchungen wurden im Gewebe operierter Kinder nur geringe Leukozyteninfiltrate und in der Mehrzahl der Fälle keine immunkompetenten Lymphozyten nachgewiesen. Somit ist eine Virusinfektion unwahrscheinlich [107].

I.5 Differentialdiagnosen

Die häufigsten Ursachen einer Cholestase im Kindesalter sind kongenitale Atresien der extrahepatischen Gallengänge (30 %) und eine CMV-Infektion (20 %) [68].
Beim klinischen Bild einer Cholestase im Neugeborenenalter müssen neben der EHGA und der intrahepatischen Gallengangsdysplasie auch die Neugeborenenhepatitis sowie eine Choledochuszyste und verschiedene Stoffwechselerkrankungen, besonders der α-1-Antitrypsinmangel und die Galaktosämie in Betracht gezogen und diagnostisch ausgeschlossen werden [100, 111].

I.6 Geschichtliches

Die erste Beschreibung einer Gallengangsatresie findet sich in der Dissertationsarbeit von Donop aus dem Jahre 1851 [29]. Die verschiedenen Varianten wurden dann 1892 von Thomson [123] beschrieben. Holmes [48] veröffentlichte 1916 die anatomischen Merkmale einer Gallengangsatresie und legte die bis heute gültige Typeneinteilung in korrigierbare und nicht-korrigierbare Formen der Gallgangsatresie fest. Der erste erfolgreiche operative Therapieversuch bei einer korrigierbaren Form gelang Ladd [64] 1928. 1957 beschrieb Kasai [56, 58] die Hepatoporto-Enterostomie als operative Therapiemöglichkeit der nicht-korrigierbaren Form der EHGA. Diese mehrfach modifizierte Operationstechnik ist bis heute die am häufigsten angewandte Methode [76, 100]. Schweizer [106] entwickelte aufgrund anatomischer Untersuchungen die erweiterte oder Extended Hepatoporto-Jejunostomie, welche zur Verbesserung der Ergebnisse führte.

I.7 Therapie

Von Kasai wurde 1957 die Hepatoporto-Enterostomie als operatives Verfahren zur Galleableitung bei der bis dahin nicht-korrigierbaren Extrahepatischen Gallengangsatresie beschrieben [56, 57]. Es wurde die Leberpforte als Schnittfläche zur Galleableitung gewählt. Hierbei werden die obliterierten extrahepatischen Gallengänge zusammen mit dem fibrös umgewandelten Gewebe der Leberpforte entfernt. Nach der

Exzision wird auf die eröffnete Leberpforte eine y-förmige Jejunumschlinge aufgenäht. Kasai verfolgte die Idee, dass die in der Leberpforte angeschnittenen Gallengänge die Galle aus beiden Leberlappen drainieren und in die anastomosierte Darmschlinge ableiten [100].
Bis heute wurde diese Operationstechnik vielfach modifiziert.

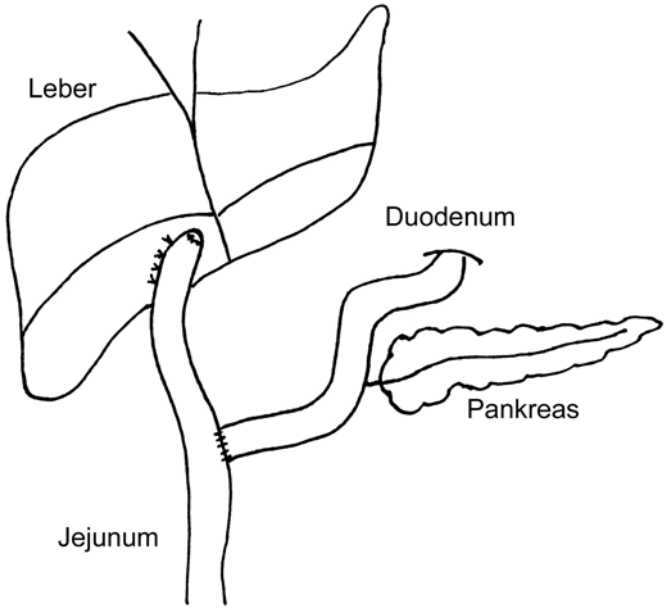


Abb. 2 Hepatoporto-Jejunostomie nach Kasai (Originalmethode)

Aufgrund der Tatsache, dass mit der Operationstechnik nach Kasai nur 23 % der Kinder mit EHGA nach 10 Jahren als geheilt gelten konnten, wurde durch Schweizer [104, 106], nach erneutem Studium der Anatomie der Leberpforte, die Extended Hepatoporto-Enterostomie entwickelt. Hierbei wird nicht nur das fibröse Gewebe der Kasai'schen Leberpforte entfernt, sondern eine größere Gewebeplatte reseziert, wobei die Resektion die zirkuläre Skelettierung der arteriellen und portalen Gefäße in der Leberpforte umfassen muss. Dadurch werden die grossen intrahepatischen Gallengänge dargestellt und eröffnet. Die zu entfernende Gewebeplatte reicht von der Fissur, welche durch das Lig. teres hepatis gebildet wird, und zwischen dem Lobus caudatus sinister und dem Segmentum laterale des Lobus sinister verläuft, bis zur rechten Fissur, die durch das Gallenblasenbett gebildet wird (siehe Abbildung 3) [106].

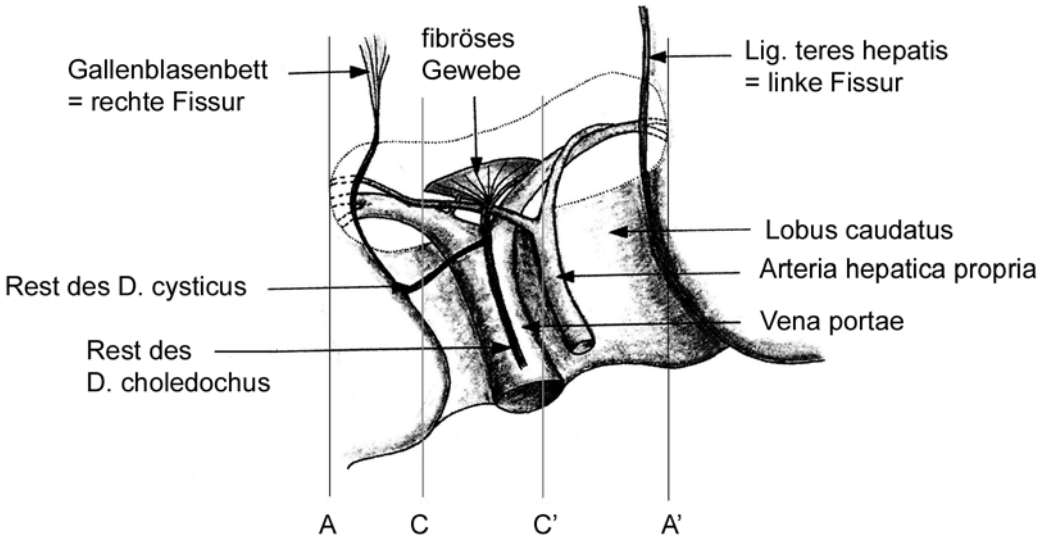


Abb. 3 Exploration der Leberpforte **A-A'**: Extended Hepatoporto-Enterostomie nach Schweizer , **C-C'**: Hepatoporto-Enterostomie nach Kasai
(aus Schweizer P. et al., 2001 [106])

I.8 Prognose

Werden Kinder mit EHGA keiner operativen Therapie unterzogen, versterben sie im Durchschnitt nach 19 Lebensmonaten an den Folgen des Leberumbaus [97, 100]. Ungefähr 25-35 % der Patienten, die einer Hepatoporto-Enterostomie nach Kasai unterzogen wurden, überleben mehr als 10 Jahre ohne die Notwendigkeit einer Lebertransplantation [8].

Ebenso bedeutsam wie die Auswahl des Operationsverfahrens, ist es die Kinder zu einem frühen Zeitpunkt - innerhalb der ersten 2 Lebensmonate - zu operieren, da die Leberzirrhose in höherem Alter eventuell schon zu weit fortgeschritten ist und dann nur noch eine Lebertransplantation als Therapiemöglichkeit verbleibt [101, 103].

Desweiteren hängt die Prognose der Patienten nach einer Hepatoporto-Enterostomie neben dem Grad der Fibrose und der Morphologie der Leberpforte [100, 105] vor allem vom Querschnitt der intrahepatischen Gallengänge ab [100].

Somit legt die Extended Hepatoporto-Enterostomie mit ihren erweiterten Resektionsgrenzen und der daraus resultierenden vergrößerten Drainagefläche die Grundlage für eine bessere Prognose [106].

Weitere prognostisch relevante Kriterien, von denen die Leistungsfähigkeit der Hepatoporto-Enterostomie abhängt, sind der Gallenfluss nach der Operation, der postoperative Verlauf des Ikterus sowie das Auftreten von postoperativen Cholangitisepisoden [69, 100].

I.9 Ätiologie und Pathogenese

Es wurden zahlreiche Studien zur Ätiologie der EHGA veröffentlicht. Jedoch konnte bisher keine Theorie bewiesen werden, so dass eine eindeutige Ursache bis heute nicht gefunden werden konnte.
Landing [66] und Witzleben [130] vertraten in den 70er Jahren die Theorie, dass die neonatale Hepatitis und die EHGA eine gemeinsame Grundlage in ihrer Entstehung haben. Außerdem geht Landing [66] davon aus, dass ein entzündlicher Prozess die Gallengangsepithelzellen zerstört und dann zu einer Gallengangsobliteration (EHGA) führen kann.
Schweizer [100] beschreibt zwei ätiologisch unterschiedliche Formen. Er unterscheidet zwischen der foetal/embryonalen Form, die mit anderen kongenitalen Anomalien assoziiert ist und sich schon in der foetalen Phase ausbildet und der prä-, peri- oder postnatal erworbenen Form, die durch Viren oder andere externe Faktoren verursacht wird. Hier werden die bereits angelegten Gallengänge zerstört, so dass im Gegensatz zur foetalen Form noch Gallengangsrudimente vorhanden sind.

I.9.1 Genetische Ursache

Bei 10-25 % der Kinder mit EHGA war eine **Assoziation mit weiteren Fehlbildungen** zu erkennen [35, 121].
So wurden Zusammenhänge mit verschiedenen Fehlbildungen des kardiovaskulären Systems, des Gastrointestinaltraktes, des Urogenitaltraktes sowie anorektalen Anomalien, der Trisomie 18 und dem Situs inversus gefunden [13, 14, 21, 35, 51, 108, 121, 126].
Besonders häufig wurde über ein gemeinsames Auftreten mit dem Polysplenia Syndrom berichtet [14, 21, 27, 55, 127].

Für eine Reihe von Patienten wurde eine **familiäre Häufung** bezüglich der EHGA beschrieben. Darüber wird bereits seit 1855 diskutiert [18]. Diese Beobachtungen könnten für eine genetische Prädisposition der Familienmitglieder sprechen.
Es wurde z.B. von einer Familie mit zwei an EHGA erkrankten Brüdern berichtet [63] sowie von einer andere Familie mit fünf Geschwistern, zwei davon Zwillinge, in welcher drei der Kinder ebenfalls an EHGA litten [112]. In einer weiteren Familie wurden zwei Schwestern untersucht, die denselben HLA-Typ hatten; ein Kind hatte EHGA, das andere eine Dilatation der Gallengänge [3]. Der Fall von zwei Brüdern, von denen einer an einer Intrahepatischen, der andere an einer Extrahepatischen Gallengangsatresie litt, wurde von Danesino [19] publiziert.

Um eine fundierte Aussage in Bezug auf eine genetische Komponente in der Pathogenese einer Erkrankung treffen zu können, ist die **Zwillingsforschung** ein unentbehrliches Mittel.
Hierbei wird untersucht, ob ein bestimmtes Merkmal bei eineiigen Zwillingen häufiger für beide Zwillinge zutrifft (Konkordanz = Übereinstimmung) als bei zweieiigen, oder ob das Merkmal auch bei eineiigen Zwillingen diskordant ist.
In vier verschieden Studien wurden 7 Zwillingspaare auf das Merkmal EHGA untersucht. Bei allen Zwillingspaaren wurde das Merkmal nur bei einem Zwilling gefunden [50, 75, 117, 128].
In einer weiteren Studie untersuchte Schweizer [102] 6 Zwillingspaare und kam ebenfalls zu dem Ergebnis, dass alle für das Merkmal EHGA diskordant sind. Aufgrund dieser Ergebnisse hält Schweizer eine genetische Komponente als Ursache für unwahrscheinlich.
Auch Silveira [109] fand bei 4 Zwillingspaaren, die er im Rahmen einer Studie mit 237 EHGA-Patienten untersuchte, bei allen nur eine Diskordanz vor, so dass er die bisherigen Aussagen unterstützen konnte.
Hart [46] berichtet von einem Zwillingspaar, bei dem ebenfalls Diskordanz festgestellt wurde: bei einem Zwilling wurde eine neonatale Hepatitis, beim anderen eine EHGA diagnostiziert.

Smith [112] ist einer der wenigen, die von einem konkordanten Zwillingspaar für das Merkmal EHGA berichten. In dieser Familie mit 5 Geschwistern trat bei einer weiteren Schwester ebenfalls EHGA auf.
Poovorawan [85] fand unter 143 EHGA-Patienten 8 Zwillingspaare, die ebenfalls diskordant waren. Auffällig war laut Poovorawan [85], dass sechs Paare die gleiche Blutgruppe und zwei sogar die gleiche Untergruppe hatten.

Das HLA-System (**h**uman **l**eucocyte **a**ntigen system) ist ein autosomal kodominant vererbtes System von Gewebeantigenen. Die HLA-Antigene sind durch verschiedene Genorte (A, B, C, DR) determiniert. Diese verschiedenen HLA-Typen, die 0,1 % des menschlichen Genoms umfassen, sind unter anderem mit verschieden Erkrankungen assoziiert (**HLA-Assoziation**).
Erstmalig konnte 1993 in einer Fallkontrollstudie gezeigt werden, dass bei EHGA-Patienten das HLA-B12-Antigen im Vergleich zu einer Kontrollgruppe deutlich häufiger zu finden war. Ebenso waren bei diesen die Haplotypen A9-B5 und A28-B35 in den Lymphozyten signifikant erhöht [110]. Aufgrund dieses Ergebnisses warf Silveira [110] das erste Mal die Vermutung auf, dass EHGA, wie andere Krankheiten, mit spezifischen HLA-Subtypen assoziiert und eventuell immun induziert sein könnte.
Durch die Erkenntnisse Silveiras [110] etablierte Schreiber [95] das so genannte „two hit“-Modell. Er ging davon aus, dass auf der Basis der HLA-Typen eine genetische Prädisposition gegeben sein muss, die dann in Kombination mit externen Einflüssen, wie beispielsweise einer viralen Infektion, zu der erworbenen Form der EHGA führen kann.
Im Gegensatz dazu konnte Jurado 1997 [54] in seiner Studie die Ergebnisse von Silveira [110] nicht reproduzieren. Er untersuchte bei einer Gruppe von 48 spanischen EHGA-Patienten ebenfalls den Polymorphismus von HLA-Typen und fand unter diesen Patienten weniger von HLA-B12, -B44 und -B45-Antigenen als in der Kontrollgruppe.
Nakada [78] wies 1997 bei 13 EHGA-Patienten und deren Familien eine erhöhte Expression von HLA-A33, -B44 und -DR6 im Blut nach. Ein Anstieg der Expression verschiedener Zelladhäsionsmoleküle, im Besonderen von ICAM-1, wurde von Dillon [25] bei Patienten mit EHGA in deren Gallengängen nachgewiesen, zu demselben Ergebnis kam 1998 auch Minnick [70].

Dillon [26] konnte auch bei 6 Kindern mit EHGA eine starke Expression von ICAM-1 in Assoziation mit MHC II in den Gallengangsepithelzellen feststellen und wies darauf hin, dass die Kombination der beiden Faktoren eventuell eine Rolle in der Immunopathogenese spielen könnte.
Die Untersuchung von HLA-DR, ICAM-1 sowie der Anzahl von CD4+-, CD8+- und γ/δ-T-Zellen brachten folgendes Ergebnis: Im entzündlichen Gewebe konnte eine leichte Infiltration von CD4+-Zellen nachgewiesen werden, die Gallengangsepithelzellen exprimierten abnormale Mengen von ICAM-1 und HLA-DR [10].
Kobayashi [60], der ebenfalls das HLA-DR-System (MHC Klasse II) sowie die Makrophagen assoziierten Antigene (CD 68) untersuchte, fand eine Korrelation zwischen der Expression dieser beiden Antigene und dem Schweregrad des Krankheitsverlaufs.

I.9.2 Immunologische Ursache

Hinweise, die auf eine mögliche immunlogische Ursache für die Entstehung der EHGA hindeuten, wurden in verschiedenen Arbeiten beschrieben. So konnte Hadchouel [42] bei 33 % von 128 untersuchten Gallengangspräparaten Immunglobuline gegen Gallengangsstrukturen finden.
Landing [67] sieht die Möglichkeit, dass ein T-Lymphozytenmangel zu einer EHGA führen könnte, da er bei Patienten mit EHGA einen Mangel an Hassallkörperchen festgestellt hat.

I.9.3 Toxische Ursache

Einige Studien haben einen jahreszeitlichen Anstieg der Inzidenz der Gallengangsatresie beschrieben. Hieraus entstand die Theorie einer toxischen Ursache für die Entstehung einer EHGA.
Strickland und Shannon [116] berichteten 1982 über ein gehäuftes Auftreten der EHGA bei Neugeborenen, die zwischen August und Oktober der Jahre 1972 bis 1980 im Norden Texas geboren wurden. Dies führten sie auf Chemikalien zurück, die in der

Landwirtschaft Verwendung finden und besonders im Frühsommer angewandt werden. Dies entspricht dem Differenzierungszeitraum für die Anlegung der Gallengänge bei den Kindern, die im genannten Zeitraum geboren wurden.
Auch Yoon [132] berichtete 1997 von einer signifikant erhöhten Inzidenz von Gallengangsatresie in Atlanta von 1968 bis 1993, die jedoch in den Monaten Dezember bis März auftrat und somit nicht mit der Aussage von Strickland [116] korreliert.
Houwen und Schweizer [49] konnten für die Niederlande und West-Deutschland sowie Ayas [4] für Michigan keine dieser Theorien bestätigen, da sie weder eine zeitliche noch eine geographische Abhängigkeit finden konnten. Auch Davenport [22] konnte 1998 keine Zusammenhänge feststellen.

I.9.4 Pathologische Gallensäuren als Ursache

Da sich die Gallensäurezusammensetzung beim Neugeborenen von der des Erwachsenen unterscheidet, könnte eine Persistenz fetaler Gallensäuren zu einer Entzündung und Sklerose führen [45]. 1969 zeigte Schaffner [93], dass eine pathologische Gallensäurezusammensetzung einen schädigenden Einfluss auf die Gallengangsepithelien und Hepatozyten haben kann.

I.9.5 Pankreassaftreflux in die Gallengänge als Ursache

Bei einer Fehlmündung des Ductus choledochus in den Ductus pancreaticus bereits oberhalb des Oddi-Sphinkters, kommt es bei dessen Kontraktion zum Pankreassaftreflux in den Ductus choledochus [71, 100]. Die daraus resultierende Cholangitis kann in den intra- und extrahepatischen Gallengängen zu stenotischen Fibrosen führen. Dies konnte tierexperimentell gezeigt werden [79].

I.9.6 EHGA Folge einer lokalen Ischämie

Ebenso verdächtig in der Pathogenese von EHGA ist eine ischämische Vaskulopathie [47]. Da die Gallengänge bei 16 % der Menschen nur durch vaskuläre Endstromäste versorgt werden, besteht die Gefahr, dass die Gallengänge bei einer Ischämie

obliterieren [59]. In Tierexperimenten an Schweinen konnte gezeigt werden, dass die extrahepatischen Gallengänge total oder segmental obliterierten, nachdem sie freigelegt und somit von der Gefäßversorgung getrennt wurden [98]. Das gleiche Ergebnis konnte nach der Durchtrennung der Arteria hepatica bei Lämmerembryonen sowie bei Kaninchenfeten beobachtet werden [84, 74].

I.9.7 Infektion als Ursache für die Entstehung einer EHGA

Die Idee der viralen Ursache von EHGA stammt aus der Hypothese von Landing 1974 [66]. Diese Theorie wurde später durch Ergebnisse aus serologischen Untersuchungen und Tierexperimenten gestützt.

Eine infektiöse Ursache, die z.B. durch einen Virus bedingt sein kann, scheint in einigen Fällen eine mögliche Erklärung zu sein. Landing [66] zieht die Möglichkeit in Betracht, dass eine intrauterin oder perinatal erworbene virale Infektion das ausschlaggebende Ereignis sein könnte, welches zur Leber- und Gallengangszerstörung führt. Auch die mikroskopische Untersuchung der intraoperativ entnommenen Gallengänge zeigte entzündliche Infiltrate, die auf eine postnatale virale Infektion hindeuten könnten [16, 131].

Trotz der zahlreichen Studien konnte jedoch bis heute kein Beweis dafür erbracht werden, dass ein Virus der Auslöser für die Erkrankung ist.

In diversen Tierversuchen wurde versucht, diesen Prozess zu imitieren um so den Verlauf von der Virusinfektion bis zum Entstehen einer EHGA beobachten und beweisen zu können.

Parashar [81] und Wilson [129] haben Mäuse mit Reoviren infiziert und experimentell postinfektiöse Gewebsveränderungen nachgewiesen, die denen bei einer EHGA ähnlich sind. Parashar [81] sprach von einer periportalen Entzündung. Er konnte jedoch keine Gewebszerstörung finden. Szavay [118], der in seiner Studie Balb/c-Mäuse mit dem Reovirus Typ 3 infizierte, konnte nur Entzündungszeichen nachweisen, jedoch keine Atresie der Gallengänge. Riepenhoff-Talty [88] konnte bei immunkompetenten Balb/c-Mäusen, die mit Rotaviren der Gruppe A infiziert wurden, eine Obstruktion der extrahepatischen Gallengänge feststellen. Petersen [82] infizierte Mäuse mit Rhesus-Rotaviren, von denen 85 % eine Cholestase entwickelten. Eine spätere histologische

Untersuchung des Lebergewebes der infizierten Mäuse ergab das Bild einer EHGA. Bei Mäusen, die prophylaktisch vor der Infektion mit Interferon-α behandelt wurden, konnte die Entwicklung einer EHGA erfolgreich vermieden werden, da die Mäuse unter dem IFN-α eine Immunität entwickelten.

Reovirus Typ 3

Der Zusammenhang von Reovirus Typ 3 Infektion und EHGA wurde schon häufig und sehr kontrovers diskutiert. Einige der Autoren halten einen Zusammenhang für wahrscheinlich, während andere am Nachweis scheiterten und keine Assoziation erkennen konnten.

Nachdem Morecki [72] bereits 1982 bei 17 von 25 EHGA-Patienten (68 %) und bei nur 8 % einer Kontrollgruppe Reovirus-Antikörper nachgewiesen hat, sprach er sich für eine Assoziation mit diesem Virus aus. 2 Jahre später fand er elektronenmikroskopisch Viruspartikel, die den Partikeln ähneln, welche in Reovirus infizierten Zellkulturen zu sehen sind [73].

Auch Glaser [38] konnte 1984 bei 62 % der untersuchten EHGA-Patienten Reovirus 3-Antikörper nachweisen. Im Gegensatz dazu halten Dussaix [31] und Brown [12] einen ursächlichen Zusammenhang für unwahrscheinlich, da sie keine signifikant erhöhten Antikörper fanden. Sokol [114], Steele [115], Riepenhoff-Talty [89] und Saito [91] scheiterten am Nachweis von Reovirus-RNA mittels RT-PCR. Nur Tyler [125] konnte 1998 mittels RT-PCR in Leber- bzw. Gallengangsgewebe bei 55 % der Patienten mit EHGA und bei 78 % mit Choledochuszyste Reovirus-RNA nachweisen.

Cytomegalievirus (CMV)

CMV ist die häufigste kongenitale Virusinfektion [34]. Bei 5-10 % der infizierten Kinder, die symptomatisch werden, können kongenitale Erkrankungen (z.B. Hepatosplenomegalie, Thrombozytopenie, Hyperbilirubinämie, Mikrozephalie) und andere bleibende Defekte (z.B. kardiovaskulärer, geistiger und gastrointestinaler Entwicklungsrückstand) entstehen [33].

Aus diesen Gründen stand eine Cytomegalievirusinfektion schon oft im Verdacht, der Auslöser für eine EHGA zu sein.

Schon zu Beginn der 70er Jahre wurde dieses Thema von Oppenheimer [80] und Danks [20] kontrovers diskutiert. Im Gegensatz zu Oppenheimer [80], der eine Beziehung zwischen CMV und EHGA vermutet, konnte Danks [20] in Australien bei 55 EHGA-Kindern kein CMV ausfindig machen.
1991 beschrieb Hart [46] ein dizygotes Zwillingspaar, von dem ein Zwilling an einer EHGA, der andere an einer neonatalen Hepatitis litt. Bei beiden wurde eine kongenitale CMV-Infektion festgestellt.
Chang [15] hat in Taiwan mittels einer sensitiven PCR nur bei 2 von 26 Patienten mit EHGA das CMV-Genom gefunden.
Einen positiven Nachweis von CMV in 24 % der untersuchten Fälle (5/21) erbrachte eine Studie von Tarr 1996 [122], der Nachweis von viralen Einschlüssen gelang jedoch nicht. Fischler [36] konnte bei seiner Studie bei 50 % der Patienten (9/18) CMV finden. Die serologischen Untersuchungen auf IgM fielen jedoch nur zu 38 % positiv aus (8/21).
Jevon [52] erhielt mit der PCR keine positiven Ergebnisse (n = 12) und auch bei Domiati-Saad [28] war nur ein Patient von 9 positiv.

Epstein-Barr-Virus (EBV)

EBV wurde in Bezug auf kongenitale Infektionen bisher selten beschrieben [34, 39, 53]. Auch Domiati-Saad [28], der versuchte diesen Bezug herzustellen, konnte weder für 9 EHGA-Patienten noch für 10 Patienten mit einer GCH ein positives Ergebnis verzeichnen.

Humanes Herpesvirus Typ 6 (HHV 6)

Domiati-Saad [28], der sich 2000 mit dem in diesem Zusammenhang selten diskutierten Virus beschäftigte, erzielte mit der PCR bei 2 EHGA- und 1 GCH-Patienten sowie auch bei 2 Kontrollpersonen positive Ergebnisse.

Hepatitis-Viren

Da die Gruppe der Hepatitis-Viren unweigerlich in direktem theoretischen Bezug zu Erkrankungen der Leber steht, liegt eine Diskussion über diese Gruppe nahe.

Die serologischen Untersuchungen auf die HBV-Oberflächen-Antigene (HBsAg) und die Antikörper gegen HBV (anti-HBs und anti-HBc) sowie auf die Antikörper gegen HAV (anti-HAV), lieferten keinen Hinweis für eine aktive oder abgelaufene Infektion. Aufgrund dessen hält Balistreri [6] die Hepatitis-Viren A und B als Ursache für unwahrscheinlich.
In Japan jedoch fand Tanaka [120] in 13 von 16 EHGA-Fällen HBc- und/oder HBs-Antigene.
A-Kader [1] testete mittels ELISA 24 von 25 und mittels RIBA 25 von 25 Patienten negativ auf HCV. Auch der HCV-RNA-Nachweis mittels PCR erzielte bei allen 10 untersuchten Patienten nur negative Ergebnisse.

Humanes Papillomavirus (HPV)

Für das humane Papillomavirus stehen sich die Untersuchungen von Drut [30] und Domiati-Saad [28] gegensätzlich gegenüber. Während Drut [30] sich für eine Rolle des HPV bei der Pathogenese von EHGA aussprach, da er mittels der PCR 89 % positive Ergebnisse erzielte, widerspricht Domiati-Saad [28] dieser Aussage, da alle von ihm untersuchten Patienten (9 EHGA und 10 GCH) negative Ergebnisse lieferten.

Parvovirus B 19 (PVB 19)

Das Parvovirus B 19 wurde noch in keiner der Veröffentlichungen als Ursache erwähnt, da Studien zu diesem Virus negativ ausfielen. Sokal [113] kam zu dem Schluss, dass das Virus für die fulminante Hepatitis eine Rolle spielt, für die EHGA ergaben sich hierfür jedoch keine Hinweise [28, 113].

Rotaviren

Die Rotaviren waren schon mehrfach Gegenstand von Tierversuchen. 1996 wurde erstmals von Riepenhoff-Talty [89] eine Untersuchung an Patienten mit EHGA durchgeführt, deren Resultat für Rotavirus C ein positives Ergebnis bei 50 % des Patientengutes (n = 18) war. Für Rotavirus A hingegen waren die Ergebnisse gänzlich negativ. Ein Jahr später stellte Bobo [9] die Ergebnisse von Riepenhoff-Talty [89] mit ihrer Studie in Frage, da sie für die Rotaviren A, B und C nur negative Ergebnisse erhielt.

In einer Zusammenfassung sollen die aus der Literatur von 1994-2004 entnommenen Ergebnisse tabellarisch dargestellt werden. Die Studien in denen die Virusart nicht explizit genannt wurden, mussten von dieser Arbeit (Tabelle 1) ausgeschlossen werden.

Tab.1 Literaturübersicht zur Virusgenese der EHGA (chronologisch geordnet)

Autor Jahr	**Viren**	**Nachweis-methode**	**Patientenzahl**	**Ergebnisse**
A-Kader H.H. [1] 1994	Hepatitis-C-Virus	ELISA-1 & RIBA II	25 EHGA	1/25 pos.(ELISA) 25/25 neg.(RIBA II)
			28 andere Lebererkrankungen	4/28 pos.(ELISA) 28/28 neg.(RIBA II)
			42 Kontrollpatienten	42 /42 neg.
		PCR	10 EHGA	10/10 neg.
Steele M. [115] 1995	Reovirus Typ 3	nested-RT-PCR & Southern Blot (Leber-PE)	14 EHGA	14/14 neg.
			20 idiopathische neonatale Hepatitis	20/20 neg.
			16 Kontrollpatienten	16/16 neg.
		nested-RT-PCR (Gallengang-PE)	8 EHGA	8/8 neg.
			1 Choledochuszyste	1/1 neg.
Tarr P. [122] 1996	Cytomegalie-virus	Western Blot	21 EHGA	5/21 pos.
Riepenhoff-Talty M. [89] 1996	Rotavirus C	nested-RT-PCR & Liquid-hybridisierung	18 EHGA	9/18 pos.
			2 Choledochuszyste	1/2 pos.
			12 Kontrollpatienten	12/12 neg.
	Rotavirus A	nested-RT-PCR	10 EHGA	10/10 neg.
			2 Choledochuszyste	2/2 neg.
			2 Kontrollpatienten	2/2 neg
	Reovirus 3	nested-RT-PCR	9 EHGA + Choledochuszyste	9/9 neg.
			2 Kontrollpatienten	2/2 neg.

Bobo L. [9] 1997	Rotavirus A, B & C	RT-PCR-EIA	10 EHGA 14 Kontrollpatienten (andere Lebererkrankungen)	10/10 neg. 14/14 neg.
	Rotavirus C	Southern Blot	10 EHGA 14 Kontrollpatienten (andere Lebererkrankungen)	10/10 neg. 14/14 neg.
Tyler K. [125] 1998	Reovirus	nested-RT-PCR	20 EHGA 9 Choledochuszyste 33 andere hepatobiliäre Erkrankungen 17 Kinder bei Autopsie	11/20 pos. 7/9 pos. 7/33 pos. 2/17 pos.
Fischler B. [36] 1998	Cytomegalie-virus	ELISA	21 EHGA 38 intrahepatische Cholestase 35 Kontrollpatienten 54 Mütter (der 59 Kinder mit Cholestase) 111 gesunde Schwangere (Kontrollgruppe)	8/21 pos. (IgM) 11/38 pos. (IgM) 2/35 pos. (IgM) 51/54 pos. (IgM) 83/111 pos. (IgM)
		PCR	18 EHGA 7 intrahepatische Cholestase	9/18 pos. 3/7 pos.
Drut R. [30] 1998	Humanes Papilloma-virus	nested-PCR	18 EHGA 30 Kontrollpatienten	16/18 pos. 30/30 neg.
Sokal E.M. [113] 1998	Parvovirus B19	nested-PCR	41 fulminante Hepatitis 82 EHGA (Kontrollgruppe)	4/41 pos. 82/82 neg.

Jevon G. [52] 1999	Cytomegalie-virus	In-situ-Hybridisierung & PCR	12 EHGA	12/12 neg.
Domiati-Saad R. [28] 2000	Humanes Papilloma-virus	nested-PCR	10 neonatale Riesen-zell Hepatitis (GCH) 9 EHGA (insg.19 Patienten) 8 Kontrollpatienten	10/10 GCH neg. 9/9 EHGA neg. 8/8 Kontroll neg.
	Epstein-Barr-Virus			10/10 GCH neg. 9/9 EHGA neg. 8/8 Kontroll neg.
	Parvovirus B19			10/10 GCH neg. 9/9 EHGA neg. 8/8 Kontroll neg.
	Cytomegalie-virus			2/10 GCH pos. 1/9 EHGA pos. 8/8 Kontroll neg.
	Humanes Herpesvirus Typ 6			1/10 GCH pos. 2/9 EHGA pos. 2/8 Kontroll pos.
Saito T. [91] 2004	Reovirus	nested-RT-PCR	36 EHGA 29 angeborene Erweiterung der Gallengänge 17 Kontrollpatienten	36/36 neg. 29/29 neg. 17/17 neg.

I.9.8 EHGA als Folge einer embryonalen Fehlentwicklung

Desmet [24] berichtet, dass sich die interlobulären Gänge in 20-25 % der Fälle bei Kindern mit EHGA in einem primitiven embryonalen Stadium befinden. Diese Tatsache gibt Anlass zu dem Verdacht, dass es sich bei der EHGA um eine Entwicklungs- bzw. Differenzierungsstörung der Gallengänge in einer frühen embryonalen

Entwicklungsphase handelt, was auf eine Hemmungsfehlbildung hinweisen könnte [83]. Dieser Aspekt wurde unter anderem in der Arbeit von Bachmann [5] untersucht, indem sie die Histologie der Leberpforte bei EHGA mit den histologischen Befunden von Rattenembryonen aus dem Stadium der Gallengangsentwicklung verglich. Bachmann [5] konnte die Gangstrukturen bei EHGA keinem Entwicklungsstadium zuordnen. Sie kommt aber zu dem Schluss, dass eine Reifungsstörung der Gallengänge angenommen werden kann, welche zu einem Entwicklungsstopp der Gallengänge in einem embryonalen/fetalen Stadium führt.

I.9.9 Vermehrte Zellproliferation durch Wachstumsfaktoren

Eine weitere mögliche Rolle für die Entstehung der EHGA könnten Wachstumsfaktoren wie z.B. TGF-β spielen, die die Zellproliferation stimulieren und so zum Zellwachstum und zur verstärkten Bindegewebsneubildung führen. Hierdurch könnten die Lumina von Gallengängen verschlossen werden.

TGF-β1 ist ein Zytokin, das die mesenchymale Proliferation stimuliert und das Epithelwachstum inhibiert. Es konnte gezeigt werden, dass es in der Organogenese eine wichtige Rolle spielt. Tan [119] fand bei Kindern mit EHGA im Vergleich zu gesunden in derselben Schwangerschaftswoche ein TGF-β1-Muster in den Gallengangstrukturen, das denen der primitiven Platte der Gallengänge ähnelt. Dies kann ein Hinweis für einen Entwicklungsstopp im Umwandlungsprozeß der Gallengänge bei der Gallengangsatresie sein. Er vermutet, dass diesem Prozeß eine epithelial-mesenchymale Unordnung zugrunde liegt.

Das Zytokin TGF-β1 spielt auch bei Versuchstieren eine Rolle in der Entstehung der Leberfibrose, bei der die hepatische Expression und die Plasmakonzentration dieses Zytokins erhöht sind. Da die EHGA, die Zystische Fibrose und andere Lebererkrankungen durch die Leberfibrose charakterisiert sind, untersuchte Rosensweig [90] einen möglichen Zusammenhang. Bei den Patienten mit EHGA war die Konzentration von Plasma-TGF-β1-Protein im Vergleich zur Kontrollgruppen erniedrigt, er fand jedoch eine gesteigerte hepatische Expression von TGF-β1 bei allen Lebererkrankungen im Stadium der Leberfibrose.

In der Studie von Ramm [87] konnte der Beweis erbracht werden, dass aktivierte HSCs = hepatic stellate cells (Lebersternzellen) verantwortlich für die wachsende Kollagenproduktion in Patienten mit EHGA sind und eine wichtige Rolle im fibrogenetischen Prozeß spielen. Ebenso wurde gezeigt, dass Gallengangsepithelzellen, HSCs und Hepatozyten an der Produktion des fibrogenetischen Zytokins TGF-β1 beteiligt sind und sich vorwiegend in der Nähe der fibrotischen Septen befinden.
In der Studie von Lamireau [65] wurde im duktulären Proliferationsgebiet von Leberproben von Kindern mit EHGA eine erhöhte Expression von Kollagen Typ I und IV sowie von Osteonectin gefunden. Ebenso gab es gallengangsnah eine Expression von TGF-β1, welches wahrscheinlich sowohl aus den Entzündungszellen als auch aus den Gallengangszellen stammte. Lamireau [65] ist der Meinung, dass es durch diese TGF-β-Produktion sekundär zu einer starken Produktion von extrazellulären Matrixproteinen in den periduktulären Myofibroblasten kommen kann. Somit könnte eine schwache Expression von TGF-β1 eine Erklärung für die langsame Progredienz der Fibrose bei Gallengangsatresie sein.

II FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Die Diskussion über die Ätiologie und Pathogenese der EHGA wird (zur Zeit) von Hinweisen auf eine entzündliche oder noch spezieller auf eine virale Genese beherrscht.
In der vorliegenden Untersuchung soll daher methodisch standardisiert überprüft werden, ob Befunde eine virale Genese bestätigen können.
Als Methode zum Nachweis viraler Nukleinsäuren in Gewebeproben von Patienten mit EHGA diente das molekularbiologische Verfahren der Polymerasekettenreaktion (PCR).
Die PCR ist ein bereits in der Routinediagnostik verschiedener Viruskrankheiten verwendetes, erprobtes und bewährtes Verfahren [32, 124].

III MATERIAL UND METHODEN

III.1 Prinzip der Polymerasekettenreaktion (PCR)

PCR (Polymerase chain reaction)

Die Polymerasekettenreaktion ist eine 1985 von Kary Mullis [77] entwickelte effektive Methode zur in-vitro Amplifizierung (Vervielfältigung) von spezifischen DNA-Sequenzen. Die Methode ist selbst mit geringsten Mengen an DNA-Material möglich. Voraussetzung der erfolgreichen Durchführung einer PCR ist jedoch, dass Teile des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes bekannt sind.
Der Prozeß der PCR läuft in 3 Schritten ab, die sich mehrfach zyklisch wiederholen. Jedes neu synthetisierte DNA-Fragment dient im Folgezyklus wieder als Matrix. Im Verlauf der Zyklen, die sich meist 30-40 mal wiederholen, werden die DNA-Sequenzen exponentiell vermehrt (millionenfache Vermehrung spezifischer Genfragmente).
Idealfall: nach n-Zyklen haben sich die DNA-Fragmente um das 2^n - fache vermehrt.

Ist für die Durchführung der PCR keine DNA als Ausgangsmaterial vorhanden, sondern RNA wie z.B. bei einigen Viren, muss diese zunächst in DNA umgeschrieben werden, um die PCR erfolgreich durchführen zu können. Die einzelsträngige RNA muß mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase (RTase) in eine einzelsträngige cDNA umgeschrieben werden. Mit dieser komplementären DNA (cDNA) kann die sogenannte **RT-PCR** nun nach dem gewöhnlichen Schema durchgeführt werden.

Für die Durchführung werden folgende Komponenten benötigt:

1. Ein Paar Primer (sense und antisense)
   Als Primer werden chemisch synthetisierte Oligonukleotide bezeichnet. Die Sequenz dieser Oligonukleotide ist strangspezifisch und wird so synthetisiert, dass sie komplementär zu einem Bereich der Matrix ist, die den Rand des zu vervielfältigenden DNA-Fragmentes bildet. Die Primer müssen sich in ihrer

Sequenz unterscheiden und dürfen auch nicht zueinander komplementär sein. Die Primer dienen als Startsequenzen für DNA-Polymerasen.

2. Alle 4 dNTPs (Desoxyribonukleosidtriphosphate)
   Die dNTPs sind die Bausteine für die Kettenverlängerung, die sich komplementär an den Matrizenstrang binden.

3. Eine hitzestabile DNA-Polymerase
   Dieses Enzym ist für den Vorgang der Kettenverlängerung verantwortlich. Es benötigt das freie 3'-OH-Ende des an die Matrize gebundenen Primers als Startsequenz für den Vorgang der Kettenverlängerung. Dieses hitzestabile Restriktionsenzym wird vom Bakterium „Thermus aquaticus" gebildet, das in heißen Quellen seinen Lebensraum hat. Aufgrund dieser günstigen Eigenschaft ist es möglich, dass das Enzym die sowohl hohen als auch schwankenden Temperaturen der Zyklen überlebt. Somit können alle Reagenzien in ein Cup pipettiert werden. Damit entfällt die Notwendigkeit einer erneuten Enzymgabe und die PCR kann ununterbrochen und automatisiert ablaufen.

Ein Zyklus besteht aus 3 Schritten:

1. Denaturierung:
   Durch Erhitzen der Probe auf ca. 95°C werden die Doppelstränge der vorhandenen DNA in Einzelstränge aufgetrennt (thermische Denaturierung).

2. Renaturierung (Annealing):
   Bei diesem Schritt wird die Probe auf eine Temperatur, abhängig vom jeweiligen Primerpaar, die zwischen 40°C und 75°C liegt, abgekühlt. Dann binden die Primer, bei der für sie optimalen Temperatur, an die komplementäre Sequenz des zu amplifizierenden DNA-Einzelstranges.

3. Polymerisation:

   Beim Erhitzen der Probe auf 72°C, der optimalen Temperatur der Taq-Polymerase, werden die dNTPs an den Matrizenstrang angelagert und es entsteht wieder ein DNA-Doppelstrang, der in dem darauffolgenden Zyklus wieder getrennt wird und als Matrize dient.

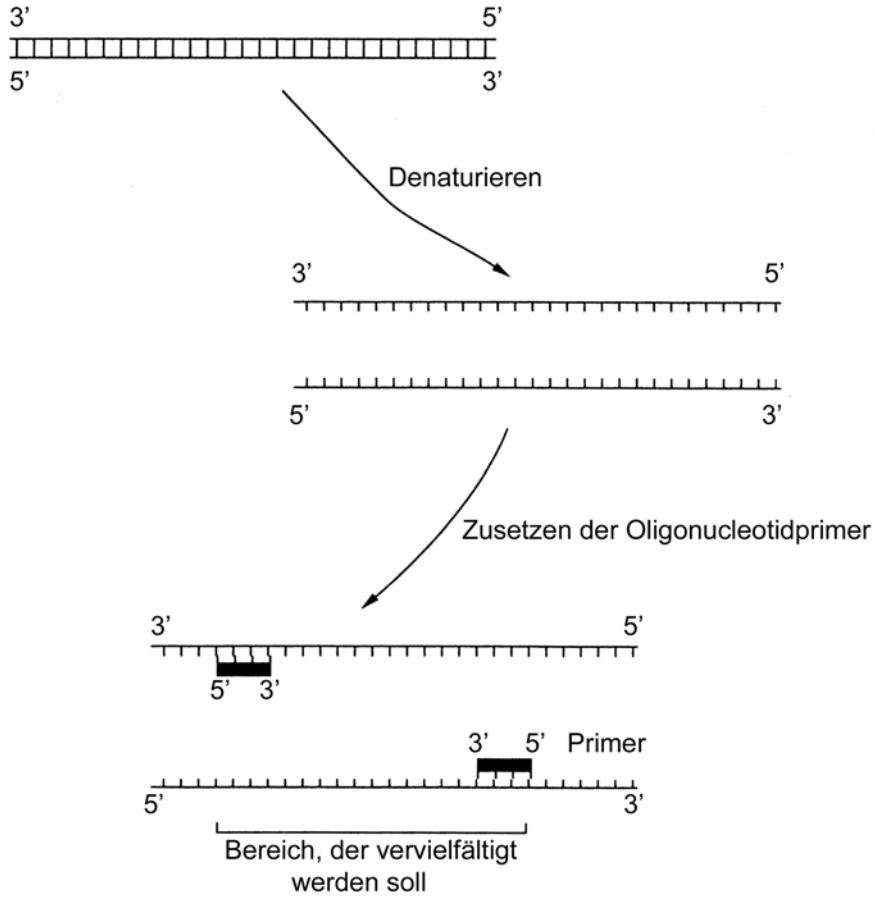


Abb. 4a Ablauf der Polymerasekettenreaktion
(aus Brown T.A.,Gentechnologie für Einsteiger, 2. Aufl., 1996, Spektrum Akademischer Verlag [11])

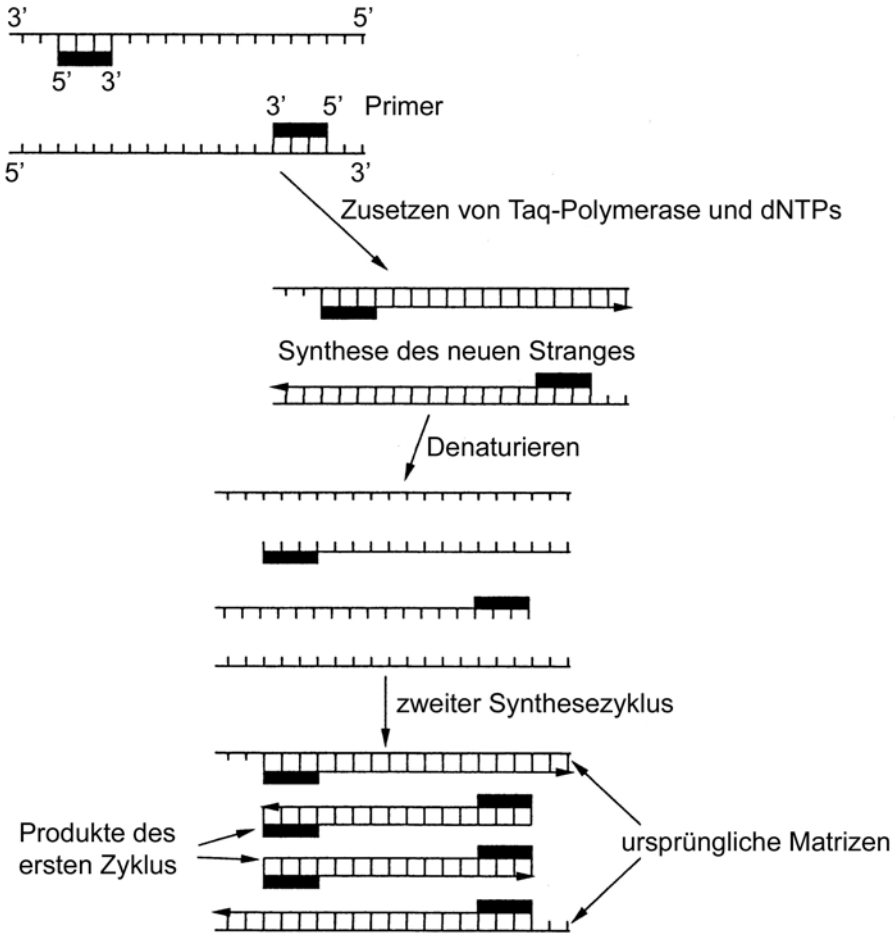


Abb. 4b weiterer Ablauf der Polymerasekettenreaktion
(aus Brown T.A., Gentechnologie für Einsteiger, 2. Aufl., 1996,
Spektrum Akademischer Verlag [11])

Dieser Vorgang läuft nun 30-40 mal ab.

Das auf diesem Weg millionenfach amplifizierte DNA-Fragment kann mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und dargestellt werden.

Es wird ein 1-2 % Agarosegel hergestellt, das mittels Ethidiumbromid gefärbt wird, um später die Banden unter UV-Licht sichtbar zu machen. Die PCR-Produkte werden durch Anlegen eines elektrischen Stroms an die Gelelektrophoresekammer ihrer Größe entsprechend in charakteristische Banden aufgetrennt. Aufgrund der negativ geladenen Nukleinsäuremoleküle wandern die Fragmente zur positiv geladenen Anode. Wobei die größeren, langsamer wandernden Moleküle eine kürzere Strecke zurücklegen als die

kleinen und somit schnelleren Moleküle. Hierdurch ergibt sich die größenabhängige Auftrennung in Banden. Da die Größe des gesuchten Fragmentes bekannt ist, kann durch Zuhilfenahme eines Größenmarkers, der definierte Fragmente enthält, beurteilt werden, ob das gesuchte Amplimer in der Probe enthalten ist oder nicht.

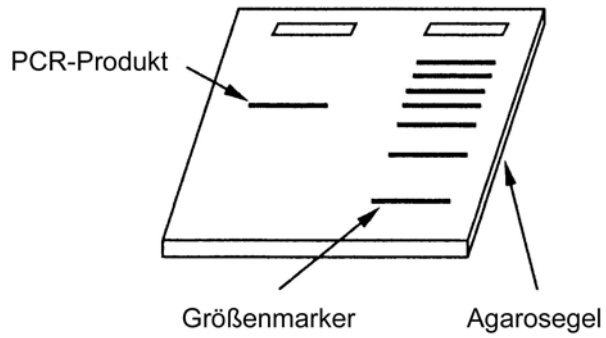


Abb. 5 Sichtbarmachen des Produkts
(aus Brown T.A, Gentechnologie für Einsteiger, 2. Aufl., 1996, Spektrum Akademischer Verlag [11])

In den Experimenten, die dieser Arbeit zugrunde liegen, wurde die sogenannte **nested-PCR** angewandt.

Hierbei handelt es sich um eine Variation der vorher beschriebenen grundlegenden PCR-Technik.

Es kommt nicht selten vor, dass ein Primer an mehreren Stellen der Matrize bindet, da die gleiche Primersequenz häufig an mehreren Stellen des DNA-Einzelstranges auftritt.

Hierdurch werden mehrere Fragmente unterschiedlicher Länge markiert, die dann fälschlicherweise vervielfältigt werden und zu mehreren Produkten führen. Um diesen Fehler zu umgehen, wird bei der nested-PCR ein zweites Primerpaar zur Hilfe genommen, so dass insgesamt 4 Primer verwendet werden (Abbildung 6).

Dieses zweite Primerset hat seine Bindungsstellen innerhalb des bereits vom 1. Primerpaar markierten Bereichs. Somit werden nur die Amplimere weiter vervielfältigt, bei denen beide Primersets an der richtigen Stelle binden können. Die Amplimere bei denen

nur das 1. Primerpaar binden konnte, werden so vom weiteren Ablauf der PCR ausgeschlossen und nicht weiter vervielfältigt.

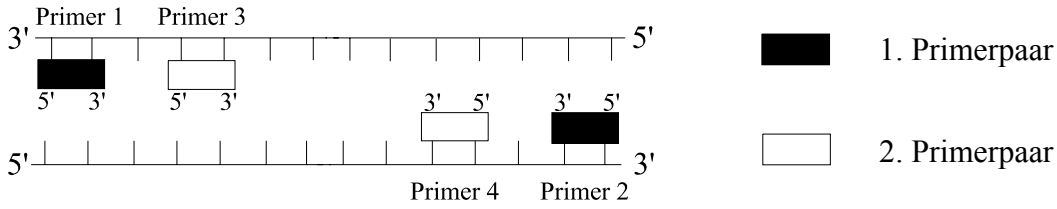


Abb. 6 Prinzip der nested-PCR

Durch diesen 2. PCR-Durchlauf wird die Ausbeute des gewünschten Amplimers erhöht und somit auch die Sensitivität und die Spezifität dieser Methode.

Bei der **semi-nested-PCR** wird anstatt eines zweiten Primerpaares nur ein neuer Primer verwendet, der ebenfalls innerhalb des 1. Primerpaares bindet. Im 2. Durchlauf wird dann ein Amplimer vervielfältigt, dessen Länge durch den Abstand zwischen dem neuen und einem Primer aus dem 1. Primerpaar definiert wird (Abbildung 7).

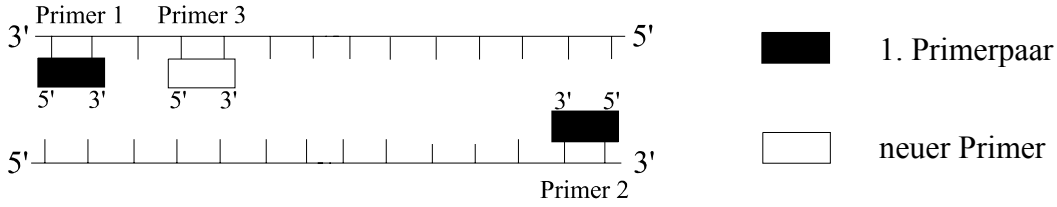


Abb. 7 Prinzip der semi-nested-PCR

Besonders beim Nachweis von viralen Nukleinsäuren spielt die nested-PCR eine besondere Rolle. Damit kann ausgeschlossen werden, dass Nukleinsäuren, die nicht von den Viren stammen, sondern beispielsweise von zellulären Strukturen der Gewebeprobe, ebenfalls amplifiziert werden und es so zu falsch positiven Ergebnissen kommen kann.

III.2 Material (Krankengut und Gewebeproben)

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Gewebeproben von Kindern mit operierter EHGA wurden zur Diagnosesicherung in der Abteilung für Molekulare Pathologie des Instituts für Pathologie der Universitätsklinik Tübingen routinemäßig aufgearbeitet.
Die Proben stammten aus der Abteilung für Kinderchirurgie der Universitätsklinik für Kinderheilkunde und Jugendmedizin Tübingen und wurden im Zeitraum von 1995–2001 intraoperativ gewonnen (Tabelle 2).

Tab. 2 Ausgewertetes Krankengut, sortiert nach Entnahmezeitpunkt der Gewebeproben

Patient (P)	Geburts-datum	Geschlecht	Datum der Proben-entnahme	Art der Probe	Alter bei Proben-entnahme
1	25.12.1996	w	11.02.1997	Native Leber-PE	1Mo 2Wo 3Tage
2	01.02.1997	m	25.03.1997	Native & Formalin-fixierte Leber-PE	1Mo 3Wo 3Tage
3	18.10.1996	w	30.04.1997	Native Leber-PE	6Mo 1Wo 5Tage
4	11.04.1997	w	21.05.1997	Native Leber-PE	1Mo 1Wo 3Tage
5	29.03.1997	w	26.06.1997	Native Leber-PE	2Mo 4Wo
6	04.11.1996	m	17.10.1997	Native Leber-PE	11Mo 1Wo 6Tage
7.1+7.2	22.08.1997 (2 Proben)	m	28.10.1997	Native Leber-PE	2Mo 6Tage
8	03.03.1984	m	26.11.1997	Native Leber-PE	13J 8Mo 3Wo 2Tage
9	29.10.1997	w	22.12.1997	Native Leber-PE	1Mo 3Wo 2Tage
10	16.02.1998	m	18.03.1998	Native Leber-PE	1Mo 2Tage
11	14.02.1998	w	01.04.1998	Native Leber-PE	1Mo 2Wo 4Tage
12	19.02.1998	m	14.04.1998	Native Leber-PE	1Mo 3Wo 5Tage
13	16.05.1992	w	16.04.1998	Native Leber-PE	5J 11Mo

14	18.08.1998	w	28.10.1998	Native Leber-PE	2Mo 1Wo 3Tage
15	07.11.1998	m	21.01.1999	Native Leber-PE	2Mo 2Wo
16	21.09.1998	m	30.03.1999	EDTA-Blut	6Mo 1Wo 2Tage
17	13.02.1999	w	16.04.1999	Native Leber-PE	2Mo 3Tage
18	08.03.1999	w	27.05.1999	Native Leber-PE	2Mo 2Wo 5Tage
19	04.09.1999	m	27.09.1999	Native Leber-PE	3Wo 2Tage
20	06.10.1999	m	05.11.1999	Native Leber-PE	4Wo 2Tage
21	01.12.1999	w	17.02.2000	Formalin-fixierte Leber-PE	2Mo 2Wo 2Tage
22	19.02.2000	w	02.05.2000	Native Leber-PE	2Mo 1Wo 6Tage
23.1+23.2	24.02.2000 (2 Proben)	m	10.05.2000	Native Leber- PE	2Mo 2Wo 2Tage
24	24.09.2000	m	20.10.2000	Native Leber-PE	3Wo 5Tage
25	16.10.2000	w	19.12.2000	Native Leber-PE	2Mo 3Tage
26	15.01.2001	m	05.02.2001	Native Leber-PE	3Wo
27	04.12.2000	w	06.02.2001	Formalin-fixierte Leber-PE	2Mo 2Tage
28		m		Vollblut	
29	04.10.2000	m		Stuhlprobe	

Probe **28**: Vollblutprobe eines klinisch gesunden erwachsenen freiwilligen Probanden als interne Positivkontrolle für vorhandene β-Aktin-mRNA und als Negativkontrolle für den Virusnachweis
Probe **29**: Stuhlprobe eines an Rotavirus-Enteritis erkrankten Kindes mit positivem Rotavirus-Antigen-Nachweis im Stuhl als Positivkontrolle für Rotavirus A

Diese Leberproben wurden auf folgende Viren untersucht:

- Cytomegalievirus (CMV)
- Epstein-Barr-Virus (EBV)
- Herpes-simplex-Virus Typ 1 und Typ 2 (HSV 1, HSV 2)
- Humanes Herpesvirus Typ 6 (HHV 6)
- Varizella-Zoster-Virus (VZV)
- Hepatitis-B-Virus (HBV)
- Hepatitis-C-Virus (HCV)
- Hepatitis-G-Virus (HGV, 5´-UTR- und NS 3-Genregion)
- Adenovirus (ADV)
- Enteroviren (EV)
- Coxsackie-A-Virus (Cox A) und Coxsackie-B-Virus (Cox B)
- ECHO-Virus (Echo)
- Respiratory Syncytial Virus (RSV)
- Parvovirus B19 (PVB 19)

[- Rotavirus C und Rotavirus A]

III.3 Verarbeitung der Proben

III.3.1 Verarbeitung der Proben im Labor des Instituts für Pathologie der Universitätsklinik Tübingen

Die eingesandten Proben mit den Nummern 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 23, 26, 27 (Tabelle 2, S.27) wurden auf alle oben aufgeführten Viren, außer auf Rotavirus C und A, untersucht.

Als Kontrolle wurde der Nachweis von GAPDH eingesetzt. Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GAPDH) ist ein Enzym, welches in allen Zellen vorhanden ist [44]. Die Bestimmung des für die GAPDH codierenden Gens wird häufig als Kontrolle

verwendet, da sein Nachweis als Beleg für intakte Zellen und somit auch strukturell intakter Nukleinsäuren dient.

Die Proben kamen entweder nativ oder Formalin-fixiert und Paraffin-eingebettet zur Untersuchung.
Die Paraffin-gebetteten Proben wurden mit dem Mikrotom in 5 µm dünne Scheiben geschnitten und in 1,5 ml Eppendorfcups gegeben. Die Schnitte wurden bei Raumtemperatur durch zwei Waschschritte mit je 800 µl Xylen und einem Waschschritt mit 100 % Alkohol von Paraffin befreit. Das Gewebepellet wurde anschließend im Speedvac getrocknet und in 200 µl P1-Puffer (140 mM NaCl, 1,5 mM $MgCl_2$, 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,5 % Nonidet-P40-Detergens) resuspendiert.
Die Nativproben wurden in einem Eppendorfcup manuell mit einem Stempel zerrieben und ebenfalls in P1-Puffer gelöst.
Die Cups wurden für 5 min auf Eis gesetzt und anschließend bei 4°C und 13.000 rpm zentrifugiert.
Danach wurde der Überstand, in dem die zytoplasmatische RNA enthalten ist, abgezogen und in einem neuen Cup bei -20°C eingefroren. Das Pellet, das die genomische DNA in noch intakten Zellkernen enthielt, wurde nun in 200 µl P2-Puffer (1mM EDTA, 1 % SDS, 10mM Tris-HCl pH 7,5) resuspendiert und nach Zugabe von 1 mg/ml Proteinase K-Lösung bei 65°C für 2 Stunden verdaut. Durch diesen Proteinase K-Verdau wird der Zellkern aufgebrochen und die genomische DNA freigesetzt.
Der Überstand und das verdaute aufgelöste Gewebepellet wurden vermischt und Phenol/Chloroform zugegeben. Nach Vortexen und Zentrifugieren des Gemisches bei 12.000 rpm ist das Gemisch in 3 Phasen aufgeteilt. Die Oberphase enthielt die DNA bzw. RNA, in der Interphase waren die Proteine enthalten und das schwere Extraktionsmittel Phenol/Chloroform senkte sich in die Unterphase ab.
Nun konnten die Proteine extrahiert werden und die DNA/RNA enthielt nun keine Verunreinigungen mehr.
Die Nukleinsäuren wurden anschließend durch Lyophylisation getrocknet und in 20 µl destilliertem Wasser gelöst.

Photometrische Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäuren

Die Proben wurden 1/20 verdünnt. Ein Endvolumen von 100 µl wurde dann in Quarzküvetten im Photometer bei 260 nm vermessen.
Die Messung der optischen Dichte (OD 260-Messung) ergab die Konzentration der DNA und aus dem Verhältnis der optischen Dichte bei 260nm und 280nm erhielt man den Reinheitsgrad dieser Probe.
Ideal:

$$\frac{OD260nm}{OD280nm} \sim 1{,}8 \text{ - } 2{,}0$$

PCR-Ansatz in einem 0,5 ml Eppendorfgefäß:

x µl	Wasser
5 µl	10-fach PCR-Puffer
2 µl	5 mM dNTP-Mix
1 µl	Primer 1 (15 pmol/µl = 15 µM)
1 µl	Primer 2 (15 pmol/µl = 15 µM)
y µl	DNA-Lösung (200- 400 ng DNA bzw. Wasser in der Negativkontrolle)
0,3 µl	Taq-Polymerase (1 µl = 5 Einheiten)
50 µl	Gesamtansatz

y = Menge abhängig von der optischen Dichte der DNA
x = 50 µl – 9,3 µl – y µl

- Durchführung der PCR mit dem Gerät Perkin-Elmer 9600
- Die PCR-Programme beinhalten 40 Zyklen mit jeweils 3 Stufen:
  1. Denaturierung der DNA
  2. Primer-Annealing
  3. Elongationsschritt

Auftrennung der PCR-Fragmente durch Gelelektrophorese

- es wurde ein 1- 2% iges Agarosegel gegossen (1-2g SeaKem Agarose/100 ml TAE-Puffer
- nach dem Erhitzen der Agarose im Mikrowellenherd wurde diese abgekühlt
- es wurde 20 µl Ethidiumbromid (1mg/ml) zugegeben
- es wurden 15 µl des PCR-Ansatz mit 3 µl DNA-Ladepuffer gemischt
- es wurden 10 µl Grössenmarker (PhiX /Hae III) mit auf dem Gel aufgetragen
- Gelelektrophorese (ca. 100 V)

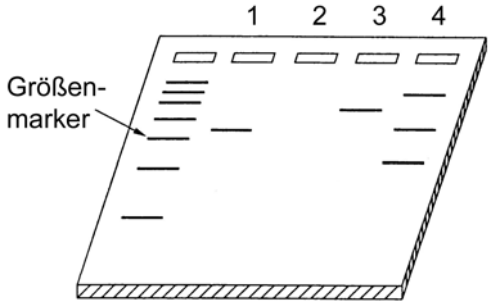


Abb. 8 Darstellung des PCR-Produktes auf dem Agarosegel
(aus Brown T.A., Gentechnologie für Einsteiger, 2. Aufl., 1996,
Spektrum Akademischer Verlag [11])

- anschließend Dokumentation dieser Ergebnisse auf dem UV-Tisch mittels Photo
- Bestimmung der Fragmentgröße durch Vergleich mit den Banden des Größenmarkers

Da die Größen der Banden des Markers in kb bekannt sind, sowie die Größen der gewünschten Amplimere, können die dargestellten Banden eindeutig verschiedenen Viren zugeordnet werden.

III.3.2 Verarbeitung der Biopsate im Labor der Kinderchirurgie der Universitätsklinik Tübingen

III.3.2.1 Patientenproben für eigene Untersuchungen

Von dem oben genannten Krankengut (Tabelle 2, S.27) wurden folgende Proben mit den Nummern 4, 6, 7.1, 7.2, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 17, 18, 19, 20, 22, 23.1, 23.2, 24, 25, 26, 27, 28 und 29 zusätzlich von uns auf Rotaviren untersucht.

Positiv- und Negativkontrollen

Die von einem klinisch gesunden erwachsenen freiwilligen Probanden stammende Vollblutprobe Nr. 28 wurde im Versuch als interne Positivkontrolle für vorhandene β-Aktin-mRNA sowie als Negativkontrolle für den Virusnachweis eingesetzt.
Ebenfalls als Negativkontrolle wurde eine ausschließlich H_2O enthaltende Probe verwendet.
Als Rotavirus A-Positivkontrolle diente das Probenmaterial Nr. 29. Die Stuhlprobe stammte von einem Patienten, der im Alter von 8 Monaten an einer Rotavirus-Enteritis erkrankte. Diese wurde durch einen positiven Rotavirus-Antigen-Nachweis im Stuhl bestätigt.

III.3.2.2 Allgemeines Verbrauchsmaterial und Geräte

Material:	Hersteller
Sterile Pipettenspitzen mit „Sealing- Filter“(10µl,100µl,1000µl) (DNase, RNase, pyrogenfrei)	Biozym
Reaktionsgefäße (0,5ml, 1,5ml)	Eppendorf
Präzisionstücher	Kimberly-Clark
Latexhandschuhe	Safeski

Geräte:	Hersteller
Pipetten (verstellbar: 0,5-10µl, 10-100µl, 100-1000µl)	Eppendorf

Vortexer	Janke & Kunkel
Mikroliterzentrifuge	Hettich
Magnetrührer	Janke & Kunkel
Thermocycler Gene E	Techne
Phast System (Elektrophoresegerät & Silberfärbegerät)	Pharmacia
Präzisionswaage	Sartorius

III.3.2.3 Nukleinsäuren-Extraktion mit Glasmilch

Material:	Hersteller
Glasmilch, Siliziumdioxid-Pulver (SiO_2)	Sigma
Guanidiniumisothiocyanat (GIT)	ROTH
EDTA-Na_2-Salz	Serva
Tris-HCl	Gibco/BRL
Trion x100	Serva
Ethanol 70 %	
Aceton	

Glasmilch, Silicasuspension:	pro 50 ml Lösung
	30 g SiO_2
	300 µl HCl 36 % (rauchend)
	25 ml DEPC-H_2O
	bei +4°C lagern
GIT-Lysispuffer	5 M Guanidiniumisothiocyanat
	50 mM Tris x HCl pH 6,5
	20 mM EDTA pH 8,0
	1,2 % Trion x100
	lichtgeschützt lagern
GIT-Waschpuffer	4,5 M Guanidiniumisothiocyanat
	50 mM Tris x HCl pH 6,5
	lichtgeschützt lagern

Methode:

Die Nukleinsäure-Extraktion der Biopsate wurde nach dem von Koopmans et al. [61] beschriebenen Verfahren „**Silica-Gel-Extraktionsprotokoll“** durchgeführt.

Die Nativ-Gewebestücke (0,5- 9 mg), die bis dahin bei -70°C gelagert wurden, wurden in insgesamt 800µl GIT-Lysispuffer lysiert und danach mit 15µl Glasmilch inkubiert. Dabei bindet die gesamte Nukleinsäure an die Glasmilchpartikel. Die Proben wurden anschließend mehrmals durch Abzentrifugieren der Silicapartikel und verwerfen des Überstandes mit 2x GIT-Waschpuffer, 2x mit 70% Ethanol und 1x mit Aceton gewaschen. Anschließend wurden die Silica-Pellets getrocknet und in H_2O (100-200µl je nach Gewebemenge) bei 56 °C eluiert, dabei geht die Nukleinsäure wieder in wässrige Lösung über. Abschließend wurde die Silica abzentrifugiert und der DNA/RNA-haltige Überstand umgefüllt.

Die so gewonnene Nukleinsäurelösung diente als Probe bei der anschließenden PCR-Amplifikation.

III.3.2.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Material:

Primer: synthetische Oligonukleotide je 10 mM Roth (Hersteller)

aufgeführt wie folgt: Name - (+s) = sense bzw. (-s) = antisense - Sequenz 5´-3´

Primer für β-Aktin-mRNA nach Koopmans et al.1993 [61]

Actin 1	(+s)	5´- GTG GGG CGC CCC AGG CAC CA - 3´
Actin 3	(-s)	5´- CTC TTG CTC TGG GCC TCG TC - 3´

PCR-Produkt (Actin1/Actin3): 82 bp

Primer für Rotavirus-Nachweis nach Riepenhoff-Talty et al. 1996 [89]

Um die Ergebnisse dieser PCR der Arbeit von Riepenhoff-Talty [89] entgegen zu stellen, wurden hier ebenfalls die auch von Riepenhoff-Talty [89] verwendeten Primer nach Gouvea et al. 1990 [40], Gouvea et al. 1991 [41] und Qian et al. 1991 [86] benutzt.

Rotavirus C Gen 5 (codierend für CapsidproteinVp6) bezogen auf Sequenz von Human Rotavirus C Strain Bristol

C1	(+s)	5´- CTC GAT GCT ACT ACA GAA TCA G - 3´
C2	(+s)	5´- GCT AAC TGG AGA AGA GAC TCA G - 3´
C3	(-s)	5´- GGG ATC ATC CAC GTC ATG CG - 3’
C4	(-s)	5´- ÁGC CAC ATA GTT CAC ATT TCA TCC - 3´

PCR-Produkt 1. Runde (C1/C4): 356 bp
PCR-Produkt 2. Runde (C2/C3): 267 bp

Rotavirus C Gen 6 (codierend für Protein NS34) bezogen auf Sequenz von Porcine Rotavirus C Strain Cowden

C34	(-s)	5´- AGC CAC ATT GTA AGC AGT CT - 3´
C35	(+s)	5´- GTT GAA TTG AAT CCT GGA CCT - 3´
C36	(+s)	5´- GAG AAT GCT TGG TGG TGC TT - 3´

PCR-Produkt 1. Runde (C34/C36): 460 bp
PCR-Produkt 2. Runde (C34/C35): 343 bp

Rotavirus A Gen 8 bzw. 9 (codierend für Capsidprotein Vp7) bezogen auf Consensussequenz Gruppe A

End9	(-s)	5´- GGT CAC ATC ATA CAA TTC TAA TCT AAG - 3´
Beg9	(+s)	5´- GGC TTT AAA AGA GAG AAT TTC CGT CTG G - 3´
KE1A	(+s)	5´- GGA CCA AGA GAA AAC GTA GC - 3´

PCR-Produkt 1. Runde (Beg9/End9): 1062 bp
PCR-Produkt 2. Runde (KE1A/End9): 258 bp

Enzyme und Nukleinsäuren:

Name	Beschreibung	Hersteller
10xPCR Buffer	Puffer (1ml: 500mM KCl, 15mM $MgCl_2$und 100mM Tris-HCl)	Amersham Pharmacia Biotech
Taq-Pol	Taq-DNA Polymerase, 5000 U/ml	Amersham Pharmacia Biotech
dNTP	PCR Nukleotide Mix, 10mM (10mM dATP, 10mM dCTP, 10mM dGTP, 10mM dTTP, pH 7,0)	Amersham Pharmacia Biotech
RTase	AMV-Reverse Transkriptase, 15 U/µl	usb
DNase I	RNase-freie DNase, 7,500 U/ml	Amersham Pharmacia Biotech

Chemikalien für die PCR-Ansätze:	Hersteller
Mineralöl	usb
100% DMSO (Dimethyl- Sulfoxid)	Roth
RNA-freies Wasser (Ampuwa)	Fresenius Kabi

Methode:

III.3.2.4.1 Nachweis von β-Aktin-mRNA mittels RT-PCR mit vorherigem DNase-Verdau

Bei der oben beschriebenen Nukleinsäure-Extraktion besteht die Gefahr, dass die viralen Nukleinsäuren (in diesem Fall RNA) sowie die zelluläre RNA durch die aus dem Zytoplasma stammenden RNasen verdaut werden. Dies führt unter Umständen dazu, dass weitere Nachweismethoden fälschlicherweise ein negatives Ergebnis bringen.
Um sicher zu gehen, dass dies bei dem Probenmaterial nicht geschehen ist, wurde zunächst der Nachweis der zellulären β-Aktin-mRNA gewählt, die das Protein β-Aktin kodiert, welches für die Struktur des Zytoskeletts eine wesentliche Rolle spielt und dessen β-Aktin-mRNA in jeder noch intakten eukaryotischen Zelle nachweisbar ist.
Dieser Nachweis sollte also zeigen, dass das Gewebe der verwendeten Proben noch intakt ist und dazu dienen, ein falsch negatives Ergebnis auszuschließen.
Die Methode und die Sequenzen der hierfür notwendigen Primer wurden der Arbeit von Koopmans [61] entnommen.
Da die Gefahr besteht, dass neben der β-Aktin-mRNA ebenso genomische β-Aktin-DNA vervielfältigt wird, wurde zuerst ein DNase-Verdau durchgeführt, indem das Ausgangsmaterial mit RNase-freier DNase behandelt wurde. Bei diesem Schritt wird eventuell vorhandene DNA zerstört, so dass davon ausgegangen werden kann, dass nur β-Aktin-mRNA spezifisch nachgewiesen wird.

Für den DNase-Verdau wurde ein Mix 1 aus 3,75 U DNase, 1 µl 10xPCR-Puffer, 6,5 µl Wasser und 2 µl der jeweiligen Nukleinsäurelösung (Probe) erstellt und anschließend im Wasserbad 1 h bei 37°C inkubiert, wobei die DNA verdaut wurde. Anschließend wurde der Ansatz einem Denaturierungsschritt 3 min bei 94°C unterzogen, bei dem die DNase inaktiviert wurde und Sekundärstrukturen der Nukleinsäuren aufgelöst werden sollten.
Während der Mix 1 10 min bei 45°C abgekühlt wurde, wurde der 2. Mix für die RT-PCR wie folgt in den 1. Mix pipettiert.

Es wurden dem Reaktionsgemisch 1,5 µl 10xPCR-Puffer, 0,5 µl 10mM dNTP, je 2,5µl 10mM Primer Actin 1 und Actin 3, 1 U Taq-Pol und 3 U RTase hinzugefügt und dann auf ein Gesamtvolumen von 25 µl mit RNA-freiem Wasser aufgefüllt. Um einer Verdunstung des Gemisches entgegen zu wirken wurde der Ansatz mit 30 µl Mineralöl bedeckt.
Die Reverse Transkription wurde für 60 min bei 42°C durchgeführt, im Anschluss daran folgten 40 Amplifikationszyklen mit je 1 min Denaturierung bei 94°C, 1 min Annealing bei 54°C und 1 min Extension bei 72°C. Anschließend wurde 5 min bei 72°C inkubiert.
Die erwartete Produktlänge beträgt 82 bp.
Die Produkte wurden bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

III.3.2.4.2 Nachweis von Rotavirus C-RNA (Gen 5 & 6) mittels PCR

Der Nachweis von Rotavirus C wird mittels nested-RT-PCR für die beiden Gene 5 und 6 durchgeführt. Diese Methode wurde schon von Riepenhoff-Talty [89] angewandt, so dass eine Vergleichbarkeit gewährleistet ist. Hier konnte für Gen 5 eine nested-PCR und für Gen 6 eine semi-nested-PCR angewendet werden.

RT-PCR für Rotavirus C (1. Runde)

Es wurden für die RT-PCR in einem Eppendorfgefäß 2,5 µl 10xPCR-Puffer, 0,5 µl 10mM dNTP, je 2,5 µl 10mM Primer C1 und C4 für Gen 5 bzw. Primer C36 und C34 für Gen 6 hinzugefügt. Zur Vermeidung der Ausbildung von Einzelstrangsekundär-strukturen wurden 5 % DMSO dazugegeben. Es wurden je Ansatz 2 µl Nukleinsäurelösung verwendet und RNA-freies Wasser ad 25 µl Gesamtvolumen hinzugefügt. Dieses Reaktionsgemisch wurde dann im Thermocycler 3 min auf 76°C und 30 sec. auf 90°C erhitzt, anschließend wurde es sofort auf Eis abgekühlt. Nach dem Abkühlen und Zentrifugieren des Ansatzes wurde jeweils ein Mix aus 1 U Taq-Pol,
3 U RTase und 2 µl RNA-freies Wasser hinzugefügt und mit 30 µl Mineralöl zur Vermeidung einer Verdunstung überschichtet. Anschließend wurde der Ansatz folgenden Temperaturzyklen im Thermocycler ausgesetzt:

Die Reverse Transkription wurde für 60 min bei 42°C durchgeführt, im Anschluss daran folgten 40 Amplifikationszyklen mit je 1 min Denaturierung bei 94°C, 1 min Annealing bei 45°C und 1 min Extension bei 72°C. Zuletzt wurde der Ansatz weitere 10 min bei 72°C inkubiert um überstehende Enden des Produktes aufzufüllen.
Die erwartete Produklänge beträgt 356 bp für Gen 5 und 460 bp für Gen 6.
Die Produkte wurden bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

Rotavirus C-PCR (2. Runde)

Um sowohl die Sensitivität als auch die Spezifität der PCR zu erhöhen, wurden die PCR-Produkte einer erneuten Amplifikation mit Primern, die innerhalb des Amplifikates liegen, unterzogen.
Dafür wurde ein Reaktionsgemisch aus 2,5 µl 10xPCR-Puffer, 0,5 µl 10mM dNTP, je 2,5 µl 10mM Primer C2 und C3 für Gen 5 bzw. C34 und C35 für Gen 6, 1 U Taq-Pol und 0,5 µl des Produktes der 1. PCR-Runde zusammengefügt. Dieses Gemisch wurde dann auf ein Gesamtvolumen von 25 µl mit RNA-freiem Wasser aufgefüllt und ebenfalls wieder mit 30 µl Mineralöl überschichtet. Die Temperaturzyklen bestanden aus 40 Zyklen mit je 1 min Denaturierung bei 94°C, 1 min Annealing bei 45°C und 1 min Polymerisation bei 72°C und anschließender Inkubation von 10 min bei 72°C.
Die erwartete Produktlänge der 2. Runde beträgt 267 bp für Gen 5 und 343 bp für Gen 6.
Die Produkte wurden bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

Nested-RT-PCR für Rotavirus C Gen 5 mit vorherigem DNase-Verdau

Um zu zeigen, dass RNA amplifiziert wurde und keine DNA, wurde für Rotavirus C Gen 5 die RT-PCR mit vorherigem DNase-Verdau durchgeführt, d.h. auch hier wurde wie bei der β-Aktin-mRNA das Ausgangsmaterial mit RNase-freier DNase vorbehandelt um die RNA spezifisch nachzuweisen.
Es wurde wie beim β-Aktin-mRNA-RT-PCR-Verfahren ein Mix 1 aus 3,75 U DNase, 1 µl 10xPCR-Puffer, 6,5 µl RNA-freies Wasser und 2 µl der Nukleinsäurelösung erstellt und anschließend im Wasserbad 1 h bei 37°C inkubiert, wobei die DNA verdaut wurde.

Anschließend wurde der Ansatz einem Denaturierungsschritt 3 min bei 94°C unterzogen bei dem die DNase inaktiviert wurde und Sekundärstrukturen der Nukleinsäuren aufgelöst werden sollten.
Während der Mix 1 10 min bei 45°C abgekühlt wurde, wurde der 2. Mix für die RT-PCR in den 1. Mix pipettiert.
Es wurden dem Reaktionsgemisch 1,5 µl 10xPCR-Puffer, 0,5 µl 10mM dNTP, je 2,5µl 10mM Primer C1 und C4, 1 U Taq-Pol und 3 U RTase und zusätzlich 5 % DMSO zur Vermeidung der Ausbildung von Sekundärstrukturen hinzugefügt. Das Gemisch wurde auf ein Gesamtvolumen von 25 µl mit RNA-freiem Wasser aufgefüllt und mit 30 µl Mineralöl überschichtet.
Die Reverse Transkription wurde auch hier 60 min bei 42°C durchgeführt, im Anschluss daran folgten 40 Amplifikationszyklen mit je 1 min Denaturierung bei 94°C, 1 min Annealing bei 45°C und 1 min Extension bei 72°C mit anschließender Inkubation von 5 min bei 72°C.
Die erwartete Produktlänge beträgt 356 bp.

Die anschließende nested-PCR wurde genau identisch wie beim Nachweis von Rotavirus C Gen 5 ohne Verdau (siehe III.3.2.4.2 Rotavirus C-PCR (2. Runde) S.40) durchgeführt.
Die erwartete Produktlänge beträgt 267 bp für Gen 5.
Die Produkte wurden bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

III.3.2.4.3 Nachweis von Rotavirus A mittels PCR

Zusätzlich zum Nachweis von Rotavirus C wurde, in Anlehnung an die Arbeit von Riepenhoff-Talty [89], der Nachweis von Rotavirus A durchgeführt. Dies war notwendig, da es uns trotz mehrfacher Anstrengung nicht möglich war, Rotavirus C-haltiges Material als Positivkontrolle zu erhalten.
Der Nachweis wurde erstens durchgeführt um eventuell vorhandenes Virusmaterial im Patientengewebe nachzuweisen, zweitens wollten wir durch den korrekten Rotavirus A-Nachweis die Wahrscheinlichkeit erhöhen, dass auch der Rotavirus C-Nachweis mittels PCR bei fehlender Positivkontrolle korrekt abgelaufen ist.

Der Nachweis wurde an fünf Proben durchgeführt. Es wurde die Probe 29 als Positivkontrolle getestet, bei der bereits durch einen Antigen-Test Rotavirus A sicher nachgewiesen werden konnte. Weiter wurden die Probe 28 sowie H_2O als Negativproben sowie die Proben 15 und 23.2 von Patienten mit EHGA getestet.

RT-PCR für Rotavirus A (1. Runde)

Die semi-nested-PCR für Rotavirus A wurde nach demselben Protokoll wie für das Rotavirus C durchgeführt. Es wurden die für das Rotavirus A entsprechenden Primer verwendet.
Es wurden in einem PCR-Gefäß 2,5 µl 10xPCR-Puffer, 0,5 µl 10mM dNTP, je 2,5µl 10mM Primer Beg 9 und End 9, 5 % DMSO, 11,35 µl RNA-freies Wasser und 2µl der Nukleinsäurelösung angesetzt. Dieses Reaktionsgemisch wurde dann im Thermocycler 3 min auf 76°C erhitzt und 30 sec. auf 90°C, anschließend wurde es sofort auf Eis abgekühlt. Nach dem Abkühlen und Zentrifugieren des Ansatzes wurde jeweils ein Mix aus 1 U Taq-Pol, 3 U RTase und 2 µl RNA-freiem Wasser hinzugefügt und mit 30 µl Mineralöl bedeckt. Anschließend wurde der Ansatz folgenden Temperaturzyklen im Thermocycler unterzogen:
Die Reverse Transkription wurde für 60 min bei 42°C durchgeführt, im Anschluss daran folgten 40 Amplifikationszyklen mit je 1 min Denaturierung bei 94°C, 1 min Annealing bei 45°C und 1 min Extension bei 72°C mit anschließender Inkubation von 5 min bei 72°C.
Die erwartete Produktlänge beträgt 1062 bp.

Rotavirus A-PCR (2. Runde)

Da bei der RT-PCR (Beg 9 /End9) für die Probe 29 eine positive Bande sichtbar war, wurde noch eine 2. Runde (semi-nested-PCR) durchgeführt, um die Sensitiviät und Spezifität zu erhöhen.
Dazu wurde wieder ein Mix aus 2,5 µl 10xPCR-Puffer, 0,5 µl 10mM dNTP, je 2,5 µl 10mM Primer KEA1 und End 9, 1 U Taq-Pol und 0,5 µl des Produktes der 1. PCR-Runde zusammengefügt. Dieses Gemisch wurde dann auf ein Gesamtvolumen von

25 µl mit RNA-freiem Wasser aufgefüllt und ebenfalls wieder mit 30 µl Mineralöl überschichtet. Die Temperaturzyklen bestanden wieder aus 40 Zyklen mit je 1 min Denaturierung bei 94°C, 1 min Annealing bei 45°C und 1 min Polymerisation bei 72°C und anschließender Inkubation von 5 min bei 72°C.
Die erwartete Produktlänge der 2. Runde beträgt 258 bp und liegt zwischen der 2. und 3. Bande des 100 bp Größenmarkers.
Die Produkte wurden bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

III.3.2.5 Agarosegel-Elektrophorese

Material:

Name	Beschreibung	Hersteller
<u>Größenmarker (GM):</u>		
100bp	100 Base-Pair Ladder, 1µg/µl	Amersham Pharmacia Biotech
DRigest III	DNA-Längenstandard, 1µg/µl	Amersham Pharmacia Biotech
<u>Gele:</u>		
Phast Gel Gradient 10-15	Polyacrylamid-Gele	Amersham Pharmacia Biotech
Phast Gel-Pufferstreifen	Agarose	Amersham Pharmacia Biotech

Methode:

Für den Gellauf wurden 3-4 µl des PCR-Produktes aus dem Cup mittels einer Pipette vorsichtig entnommen und in die Rillen des Elektrophoresekammes pipettiert. Für jeden Kamm sind maximal 5 Proben plus Größenmarker (Längenstandard) möglich. Das fertige Gel und die 2 Pufferstreifen wurden in das Elektrophoresegerät „Phast System“ eingelegt und das Kämmchen mit den Proben vorsichtig eingesetzt. Dann wurde die Elektrophorese nach den Angaben und dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

III.3.2.6 Silberfärbung für PCR-Produkte

Material:	Hersteller
Chemikalien für die Silberfärbung:	
destilliertes Wasser (H_2O)	Fresenius Kabi
Glutardialdehydlösung 25 %	MERCK
Silbernitrat	MERCK
Natriumcarbonat	MERCK
Formaldehydlösung DAB 10 (35-37 Gew.% Formalin)	Aug. Hedinger
Essigsäure (Eisessig) 100%	MERCK
Glycerin	MERCK
Trichloressigsäure	MERCK

Methode:

Zur Durchführung der Silberfärbung mussten zuerst folgende Lösungen/Chemikalien angesetzt werden:

- 8,3 % Glutaraldehyd: 30 ml Glutadialdehdydlösung ad 90 ml H_2O
- 0,5 % Silbernitrat: 200-250 mg Silbernitrat ad 100 ml H_2O
- Entwickler: 12,5 g Natriumcarbonat
  400 µl Formaldehyd
  H_2O ad 500 ml
- 10 % Essigsäure: 50 ml Essigsäure ad 500 ml H_2O
- Konservierer: 50 ml Essigsäure
  50 ml Glycerin
  H_2O ad 500 ml
- 20 % Trichloressigsäure: 200 g Trichloressigsäure ad 1000 ml H_2O

Die Silberfärbung wird ebenfalls in dem Gerät „Phast System“ durchgeführt. Hierfür wird das Gel nach der Elektrophorese in die Silberfärbekammer eingelegt.
Die Färbung wird mittels eines Programms gestartet und nach dem Schema in Tabelle 3 automatisch durchgeführt: Dauer ca. 40-45 min

Tab. 3 Arbeitsschritte der Silberfärbung der Gele im „Phast System“

Schritt	**Lösungen**	**Zeit in min**	**Temperatur in °C**
1.	20 % Trichloressigsäure	5	20
2.	8,3 % Glutaraldehyd	5	50
3.	destilliertes Wasser	2	50
4.	destilliertes Wasser	2	50
5.	destilliertes Wasser	2	50
6.	0,5 % Silbernitrat	8	40
7.	destilliertes Wasser	0,5	30
8.	destilliertes Wasser	0,5	30
9.	destilliertes Wasser	0,5	30
10.	Entwickler	4	30
11.	Entwickler	2	50
12.	5 % Essigsäure	3	50
13.	Konservierer	3	50

Nach Abschluss der Silberfärbung wird das Gel aus dem Gerät entnommen und getrocknet. Die Produkte und die Größenmarker sind nun als geschwärzte Banden sichtbar.

VI ERGEBNISSE

IV.1 Ergebnisse der routinemäßig durchgeführten nested-PCR aus dem Labor des Instituts für Pathologie der Universitätsklinik Tübingen

Tab. 4 Tabellarische Darstellung der PCR-Ergebnisse aufgeführt nach Patienten und untersuchten Virustypen

P	CMV	EBV	HSV 1	HSV 2	HHV 6	VZV	HBV	HCV	HGV	ADV	EV	Cox A	Cox B	ECHO	RSV	PVB 19
1	neg	neg					neg	neg	neg							
2	neg	neg					neg	neg	neg							
3	neg	neg	neg	neg			neg	neg	neg							
4	neg	neg					neg	neg	neg							
5	neg	neg					neg	neg	neg							
6	neg	neg					neg	neg	neg	neg						
7	**pos**	neg					neg	neg	neg	neg						
8	neg	**pos**	neg	neg			neg	neg	neg	neg	neg					
9	neg	neg	neg	neg			neg	neg	neg	neg						
11	neg	neg					neg	neg	neg	neg	neg					
12	neg	neg	neg	neg			neg	neg	neg							neg
13	neg	**pos**	neg	neg			neg	neg	neg							
14	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg					neg
15	neg	neg	neg	neg		neg	neg	neg		neg	neg					neg
16		neg				neg				neg	neg					
17	neg	neg	neg	neg			neg	neg	neg	neg	neg					neg
18	**pos**	neg	neg	neg	neg		neg	neg	neg	neg	neg					neg
19	neg	neg	neg	neg	neg		neg	neg		neg	neg	neg	neg	neg		neg
20	neg	neg	neg	neg	neg		neg	neg	neg	neg	neg					neg
21	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg		neg	neg	neg	neg	neg		
23	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg		neg	neg					neg
26	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg		neg						
27	**pos**	neg	neg	neg	neg		neg	neg	neg	neg					neg	

Bei allen 23 Patienten konnte die GAPDH, mittels der RT-PCR, regelrecht dargestellt werden. Sie dient als Beleg für die Isolierung strukturell intakter und amplifizierbarer Nukleinsäuren.

Wie aus der Tabelle 4 (S.46) ersichtlich ist, sind die meisten Ergebnisse negativ ausgefallen. Das bedeutet, es konnte molekularbiologisch kein Hinweis für eine virale Infektion des untersuchten Materials in den durchgeführten nested-PCR-Untersuchungen gefunden werden.

Die Untersuchung ergab nur 3 positive Ergebnisse für CMV sowie 2 positive Fälle für EBV, die im Folgenden noch ausführlich kommentiert werden.

Patient 7: Die PCR ergab einen positiven Befund mit dem Nachweis von humanen Cytomegalievirus (CMV)-spezifischen DNA-Sequenzen. Sie ließen sich am nativen sowie am Formalin-fixierten Lebergewebe nachweisen. Damit ist die CMV-Infektion der Leber bestätigt. Auch in den peripheren Lymphozyten aus EDTA-Blut konnte molekularbiologisch mittels PCR eine CMV-Infektion nachgewiesen und somit eine systemische Infektion mit CMV bestätigt werden.

Patient 8: Die PCR ergab den Nachweis von Epstein-Barr-Virus (EBV)-spezifischen DNA-Sequenzen. Dieser molekularbiologische Nachweis einer EBV-Infektion kann einerseits einen Restbefund nach erfolgter EBV-Infektion darstellen, zum anderen, wenn sich serologische oder klinische Hinweise ergeben, auch im Zusammenhang mit einer akuten oder kürzlich erfolgten EBV-Infektion zu sehen sein.

Patientin 13: Die PCR, die an dem nativen Gewebe der Leber durchgeführt wurde, ergab den Nachweis von Epstein-Barr-Virus (EBV)-spezifischen DNA-Sequenzen. Dies belegt eine EBV-Infektion der Patientin und kann, sofern klinischerseits kein Verdacht auf eine akute oder kürzlich zurückliegende EBV-Infektion vorliegt, ein Hinweis für eine EBV-Reaktivierung sein.

Patientin 18: Nachweis von humanen Cytomegalievirus (CMV)-spezifischen DNA-Sequenzen in relativ niedriger viraler Kopienzahl, da sich das CMV-spezifische Amplifikat erst nach Durchführung der zweiten (nested) PCR gelelektrophoretisch darstellen lässt. Dieser Nachweis einer CMV-Infektion der Leber in relativ niedriger viraler Kopienzahl ist vereinbar mit einer konatalen CMV-Infektion.

Patientin 27: Die am Leberbiopsat durchgeführten nested-PCR-Untersuchungen ergaben den Nachweis von CMV-spezifischen DNA-Sequenzen in niedriger viraler Kopienzahl. Der Befund ist vereinbar mit einer geringgradig ausgeprägten CMV-Reaktivierung. Hinweise für eine weitere Infektion fanden sich nicht.

Tab. 5 Anzahl der auf jeden einzelnen Virustyp getesteten Patientenproben

Virus	Anzahl der getesteten Patienten	Positiv	Negativ
CMV	22	3/22	19/22
EBV	23	2/23	21/23
HSV 1	15	0	15/15
HSV 2	15	0	15/15
HHV 6	8	0	8/8
VZV	6	0	6/6
HBV	21	0	21/21
HCV	21	0	21/21
HGV	15	0	15/15
ADV	16	0	16/16
EV	11	0	11/11
Cox A	2	0	2/2
Cox B	2	0	2/2
ECHO	2	0	2/2
RSV	1	0	1/1
PVB 19	8	0	8/8

IV.2 Statistische Auswertung

Eine statistisch mathematische Auswertung ist nach Aussage des Instituts für Medizinische Biometrie der Universität Tübingen nicht möglich, da die Fallzahl, der auf die verschiedenen Viren untersuchten Proben, zu gering ist.

IV.3 Ergebnisse der nested-RT-PCR aus dem Labor der Kinderchirurgie der Universitätsklinik Tübingen

Tab. 6 Tabellarische Darstellung der PCR-Ergebnisse aufgeführt nach Patienten und untersuchten Virustypen

Patient (P)	β-Aktin-mRNA mit DNase-Verdau	Rotavirus C Gen 5	Rotavirus C Gen 5 mit DNase-Verdau	Rotavirus C Gen 6	Rotavirus A
4	pos.	unspez.			
6	pos.	neg.			
7.1	pos.	neg.			
7.2	pos.	neg.			
9	pos.	unspez.			
10	neg.	unspez.		neg.	
11	neg.		neg.	neg.	
12	pos.	neg.			
14	pos.	unspez.	neg.		
15	pos.	pos.	neg.	unspez.	neg.
17	pos.	pos.	neg.	neg.	
18	pos.	unspez.			
19	unspez.		neg.	neg.	
20	neg.	unspez.		neg.	
22	pos.	neg.		neg.	
23.1	pos.	pos.	neg.	neg.	
23.2	pos.	unspez.		neg.	neg.
24	pos.	unspez.	neg.	neg.	
25	unspez.		neg.	neg.	
26	pos.	unspez.	neg.		
27	pos.	neg.		unspez.	
28	pos.	unspez.		neg.	neg.
29	pos.	unspez.		neg.	pos.

Probe **28**: Vollblutprobe eines klinisch gesunden erwachsenen freiwilligen Probanden als interne Positivkontrolle für vorhandene β-Aktin-mRNA und als Negativkontrolle für den Virusnachweis
Probe **29**: Stuhlprobe eines an Rotavirus-Enteritis erkrankten Kindes mit positivem Rotavirus-Antigen-Nachweis im Stuhl als Positivkontrolle für Rotavirus A

neg.: negatives Ergebnis
pos.: positives Ergebnis
unspez.: unspezifische Schmierbanden

IV.3.1 Ergebnisse der nested-RT-PCR für β-Aktin-mRNA mit DNase-Verdau

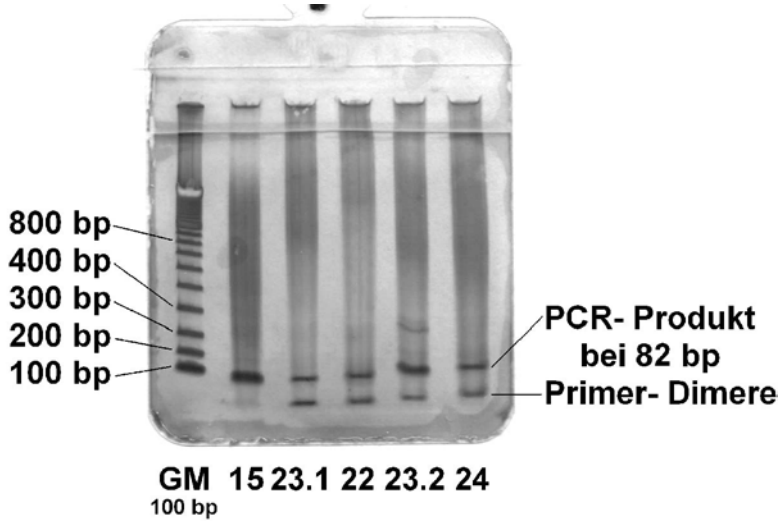


Abb. 9 Elektrophoresegel der Produkte für β-Aktin-mRNA, Spalte 1: Größenmarker, Spalte 2-6: Patientenproben Nr. 15, 23.1, 22, 23.2 und 24

Bei 18 von 23 getesteten Patientenproben konnte das PCR-Produkt für β-Aktin-mRNA mit einer Größe von 82 bp eindeutig positiv nachgewiesen werden, so dass davon ausgegangen werden kann, dass diese Proben intaktes Gewebe enthalten und für die Untersuchung geeignet waren.

Bei zwei der Proben konnten nur unspezifische Banden dargestellt werden. Hier muss davon ausgegangen werden, dass die Proben keine β-Aktin-mRNA enthielten.

Das gleiche gilt für 3 weitere Proben, die eindeutig negative Ergebnisse zeigten.

Die unspezifischen bzw. negativen Ergebnisse korrelierten nicht mit der Menge des jeweils verwendeten Probenmaterials.

Als Negativkontrolle diente eine Probe mit H_2O.

Die in der Abbildung 9 sichtbaren Primer-Dimere entstehen durch die verwendete Taq-Polymerase, die bereits bei Raumtemperatur aktiv wird und es somit zu Wechselwirkungen zwischen den Primern kommt. Die durch die unspezifische Anlagerung entstandenen Primer-Dimere haben eine Größe, die nicht ganz der doppelten Primerlänge entspricht.

IV.3.2 Ergebnisse der nested-RT-PCR für das Gen 5 des Rotavirus C

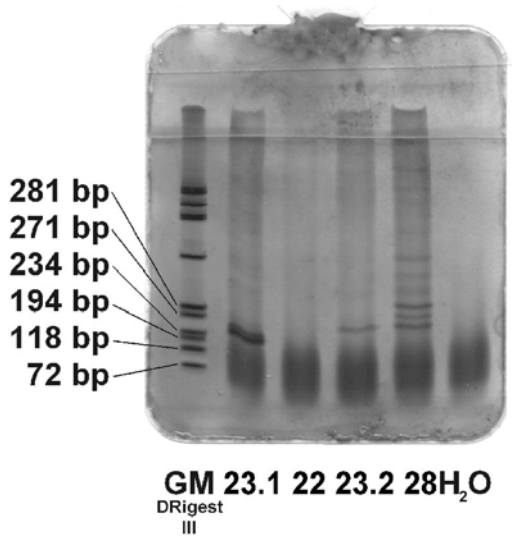


Abb. 10 Elektrophoresegel der Produkte für Rotavirus C Gen 5, Spalte 1: Größenmarker, Spalte 2-5: Patientenproben Nr. 23.1, 22, 23.2 und 28, Spalte 6: H_2O als Negativkontrolle

Von den 20 getesteten Proben waren 6 eindeutig negativ bei positivem β-Aktin-mRNA-Nachweis.

Elf der Proben wiesen unspezifische Banden auf, wobei bereits bei zwei dieser Proben der β-Aktin-mRNA-Nachweis negativ ausfiel. Somit kann man bei diesen 2 Proben das Ergebnis nur eingeschränkt verwerten, da eine eventuell vorhandene Rotavirus-RNA genauso zerfallen sein könnte wie die β-Aktin-mRNA der Probe und sich so der Nachweismethode entzogen hätte.

Dies bedeutet, dass nur bei den anderen neun Proben mit positivem β-Aktin-mRNA-Nachweis, die unspezifischen Banden als negativer Virusnachweis verwertet werden kann.

Bei drei Proben zeigte sich eine positive Bande zwischen zwischen dritter und fünfter Bande des Größenmarkers (siehe Abbildung 10, Probe Nr. 23.1). Um dieses Ergebnis zu überprüfen, wurde die PCR mit einem vorhergehenden DNase-Verdau wiederholt. Als Negativkontrolle diente eine Probe mit H_2O.

IV.3.3 Ergebnisse der nested-RT-PCR für das Gen 5 des Rotavirus C mit DNase-Verdau

Bei 3 Proben wurde bei dem Nachweis von Rotavirus C Gen 5 ein positives Ergebnis mittels RT-PCR erzielt. Da sich dieses Ergebnis auch ohne reverse Transkriptase (RTase) wiederholte, musste man davon ausgehen, dass es sich bei den amplifizierten Nukleinsäuren nicht um RNA sondern um DNA handelt, die das Rotavirus nicht enthält.

Um diese Vermutung zu bestätigen wurde erneut eine PCR durchgeführt, der ein DNase-Verdau vorangestellt wurde, um eventuell vorhandene DNA zu zerstören.

Wie erwartet, stellten sich nun negative Ergebnisse ein, womit bestätigt werden konnte, dass die zunächst positiven Ergebnisse durch DNA verursacht waren und nicht durch die im Rotavirus enthaltene RNA. Somit konnte auch in diesen drei Proben kein Rotavirus C nachgewiesen werden.

Die RT-PCR mit DNase-Verdau wurde ebenfalls bei 3 Proben angewendet, die für Rotavirus C Gen 5 unspezifische Banden aufwiesen. Damit konnte ein eindeutig negatives Ergebnis festgestellt werden.

Ebenso ergab sich ein negatives Resultat bei 3 Proben, für die schon der β-Aktin-mRNA-Nachweis negativ ausfiel.

Als Negativkontrolle diente eine Probe mit H_2O.

IV.3.4 Ergebnisse der nested-RT-PCR für das Gen 6 des Rotavirus C

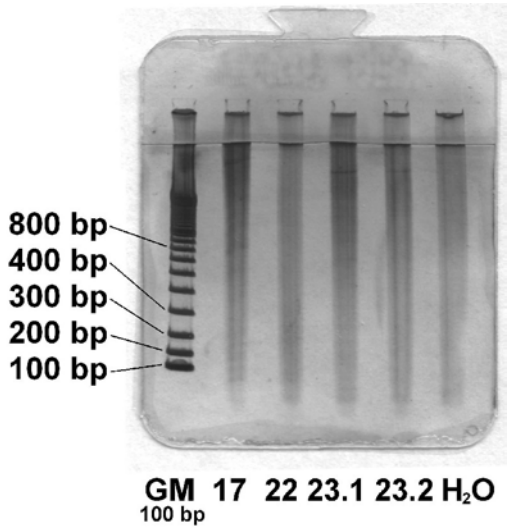


Abb. 11 Elektrophoresegel der Produkte für Rotavirus C Gen 6, Spalte 1: Größenmarker, Spalte 2-5: Patientenproben Nr. 17, 22, 23.1 und 23.2, Spalte 6: H_2O als Negativkontrolle

Bei 12 der 14 Proben zeigte sich ein eindeutig negatives Ergebnis, wobei auch hier bereits bei 5 Proben keine intakte β-Aktin-mRNA nachgewiesen werden konnte. Dies schränkt wieder die Aussagekraft des Ergebnisses ein.

Unspezifische Banden bei ca. 120 bp zeigten sich bei 2 Proben. Da das zu erwartende Produkt bei 343 bp liegt und somit deutlich länger ist, war das Ergebnis negativ.

Als Negativkontrolle diente eine Probe mit H_2O.

IV.3.5 Ergebnisse der nested-RT-PCR für Rotavirus A

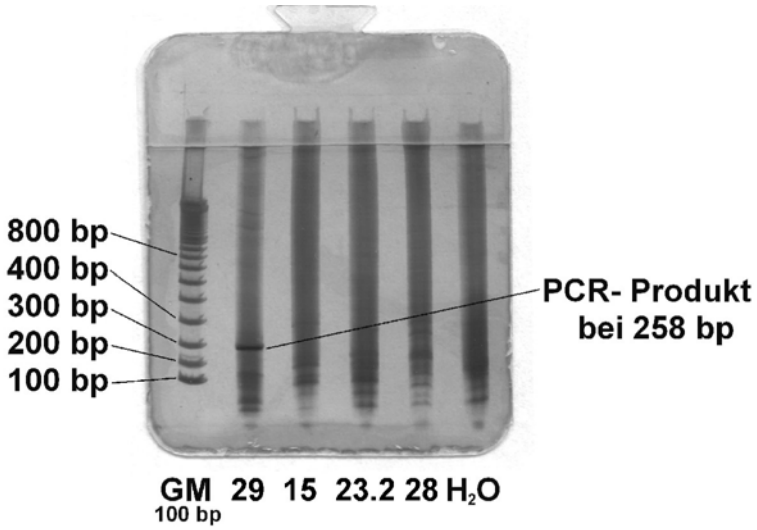


Abb. 12 Elektrophoresegel der Produkte für Rotavirus A, Spalte 1: Größenmarker, Spalte 2-5: Patientenproben Nr. 29, 15, 23.2 und 28, Spalte 6: H_2O als Negativkontrolle

Der Nachweisversuch für Rotavirus A wurde an 2 Patienten mit EHGA durchgeführt. Als Negativkontrollen dienten eine Probe mit H_2O sowie die Probe eines gesunden Probanden.

Bei allen 4 Proben waren die Ergebnisse negativ.

Nur bei der verwendeten Rotavirus A-Positivkontrolle (Proben Nr.29) zeigte sich bei der RT-PCR, wie erwartet, eine positive Bande bei ca. 1062 bp. Bei der darauf folgenden nested-PCR konnte das positive Ergebnis bestätigt werden (siehe Abbildung 12, Probe Nr. 29), da dass Produkt nun zwischen der 2. und 3. Bande des Größenmarkers, d.h. bei einer Größe von 258 bp lag.

V DISKUSSION

V.1 Diskussion der eigenen Ergebnisse im Lichte einer Methodenkritik

V.1.1 Methodenkritik und Beurteilung der Zuverlässigkeit der Untersuchungen aus dem Institut für Pathologie der Universitätsklinik Tübingen

Für die vorliegenden Untersuchungen wurde die schon mehrfach erwähnte nested-PCR verwendet, die als sehr sensitive Methode für den Nachweis viraler Nukleinsäuren gilt. Der Vorteil der nested-PCR gegenüber der Standard-PCR wurde im Kapitel „Material und Methoden“ (S.25) erklärt.

Zur Optimierung des Verfahrens wurden folgende Richtlinien beachtet:
1.) Es ist bekannt, dass die PCR-Diagnostik am Formalin-fixierten Material eine deutlich geringere Sensitivität gegenüber der aus dem nativen Gewebe aufweist.
2.) Um Kontaminationen zu vermeiden wurden die einzelnen Schritte der PCR in separaten Räumen des Labors durchgeführt.
3.) Um die Qualität der Methode zu sichern wurde bei jedem Durchgang sowohl eine Positiv- als auch eine Negativkontrolle durchgeführt. Die regelrechte Darstellung der GAPDH (Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase) nach RT-PCR, die als Positivkontrolle dient, gilt als Beleg für die Isolierung strukturell intakter und damit amplifizierbarer Nukleinsäuren und konnte bei jeder Patientenprobe erfolgreich dargestellt werden.
4.) Kritisch muss die lange Aufbewahrungszeit des Gewebematerials bei -80°C betrachtet werden, da bei diesen Bedingungen im Laufe der Zeit RNA-Degradationen auftreten können. Durch die lange Lagerung kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass keine Temperaturschwankungen stattgefunden haben, die das Material eventuell teilweise aufgetaut haben könnten. Aus praktischen Gründen wurden die Untersuchungen im Institut für Pathologie aber nur durchgeführt, wenn genügend Gewebematerial gesammelt war.

V.1.2 Beurteilung der Untersuchungen im Labor der Kinderchirurgie der Universitätsklinik Tübingen

Die hohe Sensitivität der PCR führt zur Anfälligkeit gegenüber Kontamination. Somit kann es schon bei geringer Verunreinigung z.B. durch unsteriles Arbeiten zu falsch positiven Ergebnissen kommen. Deshalb ist sorgfältiges Arbeiten unter Vorsichtsmaßnahmen angezeigt [62].

Folgende Vorsichtsmaßnahmen wurden beachtet:
1.) Um eine Kontamination erkennen zu können, ist es sinnvoll eine Negativkontrolle mitzuführen [96], eine Maßnahme, die bei jedem Versuch angewandt wurde.
2.) Um die Amplifikation der Nukleinsäuren zu verbessern wurde dem PCR-Ansatz das PCR-Additivum DMSO hinzugefügt, welches das Schmelzverhalten der Nukleinsäure verändert und somit die Ausbildung störender Einzelstrangsekundärstrukturen unterdrückt [96].
3.) Da in dieser Arbeit zunächst sichergestellt werden sollte, dass die verwendeten Proben intaktes Material enthalten, wurde der Nachweis von β-Aktin-mRNA dem Virusnachweis vorangestellt. So konnte überprüft werden, ob ein negativer Virusnachweis durch zerstörtes Probenmaterial oder durch tatsächliches Fehlen von Virus-RNA in der Probe zustande gekommen ist. Die Ergebnisse wurden somit durch eine zweite Methode abgesichert.
Leider konnte in dieser Arbeit bei 5 Proben keine β-Aktin-mRNA nachgewiesen werden. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass Einzelstrang-mRNA während des PCR-Ablaufs nicht so stabil ist wie Doppelstrang-RNA und möglicherweise zerfällt, so dass auch bei negativem β-Aktin-mRNA-Nachweis ein positiver Virusnachweis (Doppelstrang-RNA) möglich ist [125].
Andererseits könnte es sich aber auch um zerstörtes Probenmaterial handeln, so dass der darauf folgende negative Virusnachweis nur eingeschränkt zu verwerten ist.
Es gibt verschiedene Möglichkeiten, die ursächlich für den schlechten Zustand einiger Proben sein könnten. Eventuell enthielten einige Proben zu wenig Material und/oder die Handhabung der Proben sowie deren Lagerung könnte zur Beschädigung der RNA durch autolytische Prozesse oder Dehydrierung der Proben geführt haben. Darüber

hinaus ist fraglich, ob bei einer abgelaufenen Infektion mit dem Virus eine Viruspersistenz über eine längere Zeit im Probenmaterial möglich ist. Auch in diesem möglichen Verlust von Virusmaterial kann eine Fehlerquelle für falsch negative Ergebnisse liegen. Eine andere Möglichkeit ist, dass die Viruslast des verwendeten Probenmaterials für die angewandte Untersuchungsmethode zu gering ist und unter der Nachweisgrenze für dieses Verfahren liegt, so dass es auch so zu falsch negativen Ergebnissen kommen kann. Die hohe Sensitivität der angewandten Methode kann beim Nachweis von Nukleinsäuren dazu führen, dass nicht nur RNA sondern fälschlicherweise DNA-Fragmente amplifiziert werden, was dann zu unspezifischen bzw. falsch positiven Ergebnissen führen kann. Dies wurde in dieser Arbeit umgangen, indem man den entsprechenden Proben beim β-Aktin-mRNA-Nachweis und dem Nachweis von Rotavirus C Gen 5 eine DNase-Verdau vorangestellt hat.

In dieser Arbeit wurde für den Nachweis von Gen 5 des Rotavirus C die nested-PCR verwendet. Für das Gen 6 des Rotavirus C sowie für den Nachweis des Rotavirus A wurde jeweils nur die semi-nested PCR durchgeführt, die weniger sensitiv ist als die nested-PCR, da nur ein weiterer Primer innerhalb des 1. Primerpaares ansetzt und nicht ein 2. Primerpaar wie bei der nested-PCR. Diese Verfahrenswahl wurde bewusst durchgeführt, da im Versuch dieselben Primer verwendet wurden wie in der Arbeit von Riepenhoff-Talty [89]. Ziel war es, mit ihren Ergebnissen einen Vergleich herzustellen. Mit dem beschriebenen Verfahren können die Ergebnisse der beiden Untersuchungen besser verglichen werden.

Bei 14 von 23 Proben wurde Rotavirus C sowohl auf Gen 5 als auch auf Gen 6 untersucht. Die Tatsache, dass für beide Gene immer dasselbe Ergebnis erzielt wurde schließt eine Kontamination aus und spricht für den korrekten Ablauf der Methode.

Die anderen Proben konnten nur auf ein Gen untersucht werden, da für eine weitere Testung zu wenig Probenmaterial vorhanden war.

Die Aussagekraft der Ergebnisse ist auch dadurch eingeschränkt, dass keine gesunde Kontrollgruppe untersucht wurde. Die Ergebnisse einer Kontrollgruppe hätten den Ergebnissen aus den Patientenproben gegenübergestellt werden können. Diese vergleichende Untersuchung war aber aus ethischen Gründen nicht möglich, da es sich bei der Probenentnahme durch eine Leber-PE um ein invasives, risikobehaftetes Verfahren handelt.

Ebenfalls muss in Frage gestellt werden, ob Biopsien aus dem Leberparenchym als Probenmaterial für die Fragestellung geeigneter gewesen wäre als Exzidate aus der Leberpforte. Bei manchen Patienten konnte zwar auf Leberbiopsien zurückgegriffen werden, bei anderen waren jedoch nur Exzidate aus der Leberpforte vorhanden.
Die Interpretation der ausschließlich negativen Ergebnisse ist auch wegen der geringen Fallzahl schwierig. Hier könnte sich, statistisch gesehen, der Fehler 2. Art eingeschlichen haben. Das bedeutet, dass bei einem größeren Patientengut (als dem vorhandenen) möglicherweise positive Ergebnisse erschienen wären.
Durch die in der Arbeit verwendetet Taq-Polymerase, die bereits bei Raumtemperatur aktiv ist, kann es zur Bildung von Primer-Dimeren kommen, die als störende Nebenprodukte die PCR beinträchtigen können [96].
Zusätzlich zum Nachweis von Rotavirus C wurde in Anlehnung an die Arbeit von Riepenhoff-Talty [89] der Nachweis von Rotavirus A durchgeführt. Dies war notwendig, da es uns trotz mehrfacher Anstrengung nicht möglich war, Rotavirus C-haltiges Material als Positivkontrolle zu erhalten.
Der Nachweis wurde erstens durchgeführt um eventuell vorhandenes Virusmaterial im Patientengewebe nachzuweisen, zweitens wollten wir durch den korrekten Rotavirus A-Nachweis die Wahrscheinlichkeit erhöhen, dass auch der Rotavirus C-Nachweis mittels PCR bei fehlender Positivkontrolle korrekt abgelaufen ist.
Die eindeutigen Ergebnisse der Positivkontrolle für Rotavirus A sowie der Nachweis von β-Aktin-mRNA erhöhen die Wahrscheinlichkeit, dass auch die PCR für Rotavirus C korrekt abgelaufen ist, da die PCR-Abläufe bis auf die Anwendung unterschiedlicher Primer identisch sind. Durch den Nachweis von Rotavirus A in der Positivkontrolle kann angenommen werden, dass die Extraktionsmethode richtig durchgeführt wurde und damit die Rotavirus-RNA zuverlässig gewonnen wurde. Auch die stets negativen Ergebnisse der Negativkontrollen bestätigen die Verlässlichkeit der Methode.

Im Folgenden soll noch einmal zusammengefasst werden, welche methodischen Mängel das Ergebnis positiv oder negativ beeinflussen könnten:

- zu geringe Anzahl der Proben
- zu wenig Probenmaterial
- Gewebematerial, das für die Fragestellung nicht geeignet ist

- Schädigung des Probenmaterials durch Lagerung oder Handhabung
- zu geringe Viruspersistenz oder Viruslast für angewandte Nachweismethode
- fehlerhaftes Arbeiten oder Kontamination

V.2 Vergleich der eigenen Ergebnisse mit der Infektionsrate kongenitaler Virusinfektionen des Kollektivs aus der Literatur

Eine statistisch mathematische Auswertung ist nicht möglich, da die Fallzahl, der auf die verschiedenen Viren untersuchten Proben, zu gering ist. Beim Versuch einer statistischen Auswertung wäre die Beurteilung der Ergebnisse stark durch den Fehler 2. Art gefährdet. Dies bedeutet, dass bei einer zu geringen Probandenanzahl möglicherweise ein Zusammenhang hergestellt wird, der bei Untersuchungen eines größeren Kollektivs relativiert bzw. widerlegt werden würde.
Die Testung auf die Viren HSV 1, HSV 2, HHV 6, VZV, HBV, HCV, HGV, ADV, EV, Cox A, Cox B, ECHO, RSV, PVB 19, Rotavirus A und C (siehe Tabelle 4, S.46 sowie Tabelle 6, S.49), bei denen ausschließlich negative Ergebnisse erzielt wurden, geben keinen Anhalt für einen möglichen Zusammenhang zwischen Infektion mit dem jeweiligen Virus und der Entstehung der EHGA.
Die beiden Virusarten (CMV und EBV), für die in der eigenen Untersuchung einige wenige Proben positiv waren, werden schon im Zusammenhang mit dem Begriff „TORCH“ (**T**oxoplasmose, **O**ther (VZV, Hepatitis B, EBV, Listeriose, Syphilis, etc.), **R**öteln, **C**ytomegalie, **H**erpes simplex) genannt, der die Viren und Mikroorganismen zusammenfasst, die durch eine prä- und perinatale Infektion das Kind möglicherweise schädigen können [33]. Nun sollen die eigenen positiven Ergebnisse in %-Angaben mit der jeweiligen Inzidenz von kongenitaler CMV- bzw. EBV-Infektion aus der Literatur verglichen werden (Diagramm 1).

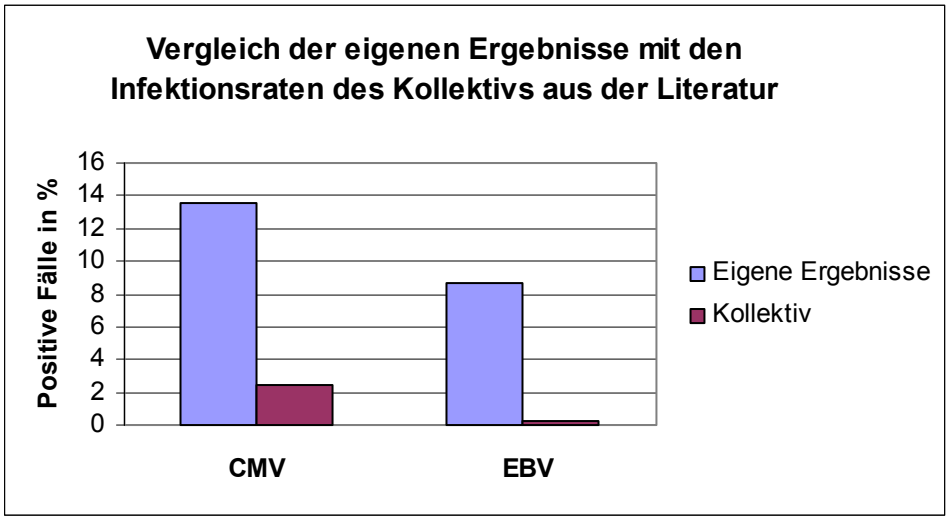


Diagramm 1 Vergleich der eigenen positiven Ergebnisse in % mit der jeweiligen Infektionsrate von kongenitaler CMV- bzw. EBV-Infektion aus der Literatur

Das CMV verursacht die häufigste kongenitale Infektion [33]. Bei Geburt ist durchschnittlich 1 % aller lebendgeborener Kinder mit diesem Virus infiziert. Bezüglich der Infektionsrate geht man von Werten zwischen 0,2 bis 2,4 % aus [34, 37, 46, 92]. Von diesen Infektionen bleiben jedoch über 90 % der infizierten Neugeborenen asymptomatisch [46].

In der eigenen Arbeit lag die Rate der CMV-Infektionen bei 13,6 % und somit deutlich höher als die in der Literatur angegeben Zahlen und kann somit als Ursache der EHGA (durchaus) in Betracht gezogen werden.

Für das EBV gibt es bezüglich kongenitaler Infektion nur einzelne Fallberichte [34, 39, 53]. Wie aus dem Diagramm 1 ersichtlich, lag die Rate der positiven Ergebnisse in dieser Arbeit bei 8,7 % und ist wiederum deutlich höher als in der Literatur. Problematisch ist jedoch, dass die Zeitspanne zwischen Geburt und Probenentnahme bei diesen 2 positiven Proben sehr groß war (nach 13 und ca. 6 Jahren). Zu beachten ist, dass ab dem Kindesalter die Durchseuchung mit EBV beginnt [34] und somit keine Aussage über den Infektionszeitpunkt mehr getroffen werden kann. Aus diesem Grund ist es schwierig, eine Kausalität von EBV für die Genese der EHGA nachzuweisen.

V.3 Diskussion der in der Literatur berichteten Ergebnisse zur viralen Genese der EHGA, das Pro und Contra

Wie in der Einleitung dieser Arbeit bereits erwähnt, wird die Ätiologie und Pathogenese der Extrahepatischen Gallengangsatresie (EHGA) in der Literatur unter verschiedenen Aspekten diskutiert.
Alle relevanten Theorien wurden im Kapitel I (S.7-20) berücksichtigt:
1.) die Theorie von einer genetische Ursache und Assoziation der EHGA mit chromosomalen Anomalien, 2.) die Theorie der immunologischen Genese. 3.) die Theorie der toxisch bedingten Genese, 3.) die Genese der EHGA als Folge einer Infektion, 4.) die Theorie der Entstehung der EHGA als Folge einer lokalen Ischämie, 5.) EHGA als Folge einer embryonalen Fehlentwicklung, 6.) die Theorie vom Einfluß von Wachstumfaktoren auf Proliferation und Obliteration der Gallengänge.

Die Ergebnisse der Autoren, die einen ursächlichen Zusammenhang von Virusinfektionen und der Extrahepatischen Gallengangsatresie annehmen, wurden in der Tabelle 1 (S.16-18) zusammengefasst und sortiert.
Dabei wurden nur Studien aus dem Zeitraum von 1994-2004 berücksichtigt. Die Studien, in denen die Virusart nicht explizit genannt wurden, mußten von dieser Zusammenstellung (Tabelle 1, S.16-18) ausgeschlossen werden.
Die in der Tabelle 1 (S.16-18) aufgeschlüsselten Literaturergebnisse sollen hier chronologisch diskutiert werden.

1994 untersuchte A-Kader [1], die mögliche Rolle von Hepatitis-C-Virus-Infektionen in der Pathogenese von pädiatrischen hepatobiliären Erkrankungen, insbesondere der EHGA. In ihrer Studie wurden 25 diagnostizierte EHGA-Patienten, die einer Hepatoenterostomie nach Kasai unterzogen wurden, sowie 28 Patienten mit anderen Lebererkrankungen, unter anderem 8 mit neonataler Hepatitis, erfasst. Die Kontrollgruppe bestand aus 42 gesunden „age-matched“ Kindern. Als Untersuchungsmaterial diente das den Patienten und Probanden entnommene Serum. Die Proben wurden mit Hilfe eines ELISA-1 und eines Immunoblot RIBA II auf die Anwesenheit von anti-HCV „gescreened“. ELISA-1 weist Antikörper gegen ein Nicht-

Struktur-Protein (c-100c) nach und RIBA II erfasst Antikörper gegen das Core-Protein (c22) sowie ebenfalls 3 Nicht-Struktur-Proteine (c-100c, 5-1-1 und c33). Bei 10 Kindern der EHGA-Gruppe wurde zusätzlich eine 1. Schritt-PCR-Technik angewandt, mit welcher der Nachweis von HCV-RNA möglich ist. Wie aus der Tabelle 1 (S.16) ersichtlich ist, kam A-Kader [1] zu folgendem Ergebnis: Von den 25 EHGA-Patienten konnte mit Hilfe des ELISA-1 nur eine Probe seropositiv auf anti-HCV getestet werden. Bei den 28 Proben der Patienten mit anderweitigen Lebererkrankungen stellte sich viermal ein positives Ergebnis ein. Die Proben der Kontrollpatienten sowie die der PCR-Gruppe waren gänzlich negativ. Die anti-HCV positiven Proben wurden erneut mit dem RIBA II getestet um den positiven Befund zu bestätigen. Die positiven Tests des ELISA-1 konnten jedoch in keinem der 5 Proben bestätigt werden. Sie waren alle negativ. Eine Erklärung hierfür könnte eine höhere Spezifität von RIBA II und PCR sein. **A-Kader** [1] **kommt aufgrund seiner Ergebnisse zu dem Schluss, dass das Hepatitis-C-Virus keine Rolle bei der Entstehung der EHGA spielt.** Die Zuverlässigkeit der Ergebnisse wird durch die Anwendung zweier unterschiedlicher Testverfahren verbessert. Zu kritisieren ist jedoch, dass nicht bei allen Proben eine PCR angewendet wurde, die eine höhere Sensitivität aufweist. Zusätzlich könnte dieses Verfahren durch Verwendung einer nested-PCR noch weiter sensitiviert werden. Aufgrund der fehlgeschlagenen Bestätigungsversuche der positiven Proben könnte es sich hierbei auch um Verfahrensfehler handeln.

1995 versuchte Steele [115] einen möglichen Zusammenhang zwischen der Präsenz von Reovirus Typ 3 und cholestatischen Lebererkrankungen bei Kindern nachzuweisen. Als Methode verwendete sie eine RT-PCR-Technik. Als Proben dienten archivierte Formalin-fixierte in Paraffin-gebettete Leberproben von 50 Kindern. Diese wurden im Zeitraum von 1985-1992 mittels perkutaner Nadelbiopsie oder offener Biopsie entnommen. Unter den Proben waren 14 mit EHGA, 20 mit idiopathischer neonataler Hepatitis sowie 16 Proben von „age-matched“ Kontrollpatienten, die andere Erkrankungen wie z.B. α-1-Antitrypsinmangel, Hydrops fetalis, Zystische Fibrose aufwiesen. Für die nested-PCR wurden Primer verwendet, die spezifisch das M3-Genomsegment vervielfältigen, sowie ein 2. Primerpaar, welches das humane Albumin-Gen amplifiziert. Die Auswahl des M3-Genomsegmentes spielt eine wichtige Rolle, da

für mehrere andere Genomsegmente (wie S1, S4, M4, L1, L3) eine erhöhte Mutationsrate bekannt ist, die mit der Persistenz von viralen Infektionen einhergeht. Das M3-Genomsegment codiert die Sequenz für ein Protein, das für virale Replikation von Bedeutung ist. Die Reaktionsbedingungen des Experiments wurden durch Versuche an infiziertem Mäusegewebe sowie an präserviertem menschlichen Lebergewebe optimiert. Die PCR-Produkte wurden durch Gelelektrophorese und Southern Blot-Analyse identifiziert. Steele [115] kam zu folgenden Ergebnissen: keine der 50 Proben konnte positiv getestet werden. Bei einer Leberprobe eines Kindes mit EHGA wurde durch das Southern Blot-Verfahren zunächst ein positives Ergebnis erzielt. Dieses Ergebnis wurde jedoch durch weitere Tests am selben Präparat widerlegt. Desweiteren wurden 8 Gallengangsgewebeproben von Kindern mit EHGA sowie 1 Probe von einem Kind mit Choledochuszyste mittels RT-PCR auf Reovirus Typ 3-RNA untersucht. Auch hier konnte kein Beweis für die Anwesenheit reoviraler M3-RNA erbracht werden. **Aufgrund ihrer Ergebnisse geht Steele** [115] **davon aus, dass es keinen Zusammenhang zwischen Reovirus 3 und neonatalen Lebererkrankungen gibt.** Auffällig ist hier die vorhergehende Optimierung der verwendeten Methoden am Tiermodell, was deren Verlässlichkeit erhöht. Zusätzlich wurde bei einer weiteren Gruppe eine nested-RT-PCR an Gallengangsgewebe angewendet, welche die Ergebnisse aus der Untersuchung der Leberproben unterstützt. Abschließend kann gesagt werden, dass die Auswahl, die Vorbereitung sowie die Durchführung der Methoden ein hohes Maß an Zuverlässigkeit gewährleistet.

Tarr [122] griff 1996 eine mögliche virale Ätiologie durch eine CMV-Infektion als ursächliches Agens einer EHGA auf. Ihre 21 Patienten wurden alle mit der gesicherten Diagnose EHGA im Zeitraum vom 1. Juli 1989 bis 31. Dezember 1993 entlassen. An diesem Patientengut wurde die Häufigkeit einer gleichzeitig bestehenden CMV-Infektion evaluiert. Um die Diagnose einer CMV-Infektion zu sichern, wurde das Virus entweder aus Kulturen von Urin (11 Patienten), Blut (1 Patient) oder Leber (1 Patient) isoliert oder spezifische IgM-Antikörper mit einem Western Blot nachgewiesen (bei 10 der 21 Patienten). Bei 5 der 21 Patienten konnte mit den eben genannten Methoden eine CMV-Infektion diagnostiziert werden, dies entspricht einer Rate von 24 % aller hier genannten EHGA-Fälle. Die 5 positiven Fälle verteilten sich wie folgt auf die

unterschiedlichen Nachweismethoden: serologischer Nachweis (n= 1), kultureller Nachweis (n= 3) und serologisch sowie kultureller Nachweis (n= 1). Bei den 5 positiven Patienten, die alle weiblich waren, konnten histologisch im Leberbiopsat mittels Lichtmikroskop keine CMV-transformierten Zellen identifiziert werden. **Tarr** [122] **ist der Meinung, dass ein ursächlicher Zusammenhang bestehen könnte, da die Anzahl positiver Patienten höher war als erwartet.** Die Ergebnisse sind laut Autor jedoch unzureichend um beweisend zu sein, da eine hohe Durchseuchung vorliegt. Die Studie zeigt in dieser Hinsicht beträchtliche Mängel. So wurde beispielsweise keine „age-matched" Kontrollgruppe eingesetzt. Somit kann nicht evaluiert werden wie hoch die Prävalenz einer CMV-Infektion bei nicht an einer Lebererkrankung erkrankten Patienten ist. Somit ist auch der Schluss der Studie unzulässig, dass es sich bei den 24 % positiven Ergebnissen um einen höheren Wert als erwartet handelt. Ebenso kann der histologische Nachweis, der nicht erbracht werden konnte, die Aussage weder stützen noch widerlegen. Auch der Western Blot sowie die Kulturen sind, im Vergleich zu aktuelleren Methoden wie z.B. der PCR, in Bezug auf die Sensitivität unterlegen. Durch alleinigen Nachweis von IgM-Antikörper kann der Zeitpunkt des Infektionsbeginns nicht festgestellt werden. Somit ist eine Aussage über die Ursächlichkeit von CMV-Infektion für die Pathogenese der EHGA in dieser Studie nicht möglich.

Erstmalig wurde von Riepenhoff-Talty [89] 1996 durch eine retrospektive Blindstudie versucht das Rotavirus der Gruppe C mittels nested-PCR als Ursache für die EHGA nachzuweisen. Es wurden Primer verwendet, die für Regionen des Gen 5 und Gen 6 des Virus codieren, die sowohl bei mit Rotaviren infizierten Menschen als auch Schweinen nachgewiesen werden können. Das Gen 5 codiert für das innere Hauptcapsidprotein von Rotavirus C, während Gen 6 das Muster für ein Nicht-Struktur-Protein, äquivalent zu NS 34 von Rotavirus A, darstellt. Zwischen den zwei Amplifikationszyklen wurden die Proben zusätzlich noch einer ^{32}P-markierten Probe unterzogen. Außerdem wurde bei 13 der 20 Patienten versucht, mit der nested-PCR Rotavirus der Gruppe A nachzuweisen und ebenso bei 2 der 12 Kontrollpatienten, was jedoch in keinem der Fälle gelang. Das gleiche gilt für 9 Proben, die auf Reovirus 3 getestet wurden. Das Patientengut bestand aus 20 Patienten mit einer cholestatischen Erkrankung, darunter befanden sich 18

EHGA-Patienten und 2 Kinder mit einer Choledochuszyste. Als Kontrollgruppe dienten 12 Patienten, die keine dieser Erkrankungen aufwiesen. Alle Proben (Leber-, Gallen-, Gallengang- sowie Stuhlproben) wurden frisch eingefroren und von Patienten gewonnen, die jünger waren als 8 Monate. Von den 20 getesteten Kindern waren 10 positiv für Rotavirus C-RNA, darunter waren 9 Kinder mit EHGA und 1 Kind mit einer Choledochuszyste. 9 der getesteten Patienten waren für Gen 5 positiv und nur 5 für Gen 6. 4 der Patienten waren für beide Gene 5 und 6 positiv. Dagegen konnte bei keinem der 12 Kontrollpatienten virale RNA nachgewiesen werden. **Riepenhoff-Talty** [89] **geht aufgrund ihrer Ergebnisse davon aus, dass eine pathogenetische Beziehung zwischen der EHGA und dem Rotavirus C bestehen könnte, nicht jedoch mit dem Rotavirus A und Reovirus 3.** Sie weist jedoch darauf hin, dass durch die von ihr durchgeführte Studie nicht die Ursächlichkeit bewiesen werden kann. Die gewählte Methode erscheint für die Studie sehr günstig, da Rotavirus C schlecht zu kultivieren ist. Die Sensitivität konnte durch die Anwendung der nested-PCR erhöht werden, da aufgrund der geringen Nukleinsäuren bei einem Amplifikationszyklus nur wenig Material gewonnen werden konnte. Riepenhoff-Talty [89] erhöht zusätzlich die Spezifität durch die Hybridisierung der Proben und dadurch auch die Sensitivität über das 100-fache gegenüber Agarosegel mit Ethidiumbromid. Es gibt in dieser Studie jedoch Unterschiede in Bezug auf die Sensitivität für Gen 5 bzw. Gen 6. Diese entstehen durch die zwei unterschiedlichen Formen der nested-PCR, die hier angewendet worden sind. Während für Gen 5 beim zweiten Amplifikationszyklus 2 interne Primer verwendet wurden, wurde bei dem Nachweis für Gen 6 nur ein einziger interner Primer angewandt und somit eine semi-nested-PCR durchgeführt, die mit Sicherheit weniger sensitiv ist als die normale nested PCR für Gen 5. Der Nachweis von beiden Genen bei 4 der Patienten schließt eine Kontamination der Proben aus. Die Primer wurden mehrfach verwendet und führten in verschiedenen Städten und Ländern zu erfolgreichen Ergebnissen. Ein weiterer Hinweis für die Zuverlässigkeit der angewandten Methode ist die Übereinstimmung der Ergebnisse der Liquid-Hybridisierung und der nested-PCR. Zu bemängeln ist jedoch, dass die Autorin in der Kontrollgruppe von 12 Patienten nur bei 2 sowohl Liquid-Hybridisierung als auch nested-PCR für beide Gene angewandt hat und sich bei den anderen 10 Proben nur mit der Liquid-Hybridisierung für Gen 5 zufrieden gegeben hat. Auch in der

Patientengruppe ist ein Mangel an Standardisierung zu kritisieren. Es wurde nicht bei allen Proben dieselbe Untersuchung durchgeführt. So wurde teilweise nur Liquid-Hybridisierung für Gen 5 durchgeführt oder aber in Einzelfällen Liquid-Hybridisierung und nested-PCR für beide Gene angewandt. Dadurch lassen sich die verschiedenen Untersuchungen nicht miteinander vergleichen. Aufgrund dieser erheblichen Mängel sind die Ergebnisse und die daraus gezogenen Schlüsse über einen pathogenetischen Zusammenhang anzuzweifeln und müssen erneut diskutiert werden.

Dieser Aufgabe widmete sich Bobo [9] ein Jahr später (1997). Sie versuchten bei 10 Patienten mit EHGA mittels der RT-PCR-EIA (non-isotopic reverse transcriptase polymerase chain reaction enzym immunoassay) Rotaviren der Gruppe A, B und C in Lebergewebe und Gallengangsresten nachzuweisen. Bei diesen Patienten handelt es sich um Kinder mit einem Durchschnittsalter von 3 Monaten. Es dienten 14 Patienten mit anderen Lebererkrankungen beispielsweise neonatale Hepatitis, Fulminante Hepatitis, α-1-Antitrypsinmangel etc. als Kontrollgruppe. Sowohl bei den 10 Patienten der Untersuchungsgruppe mit EHGA als auch den 14 der Kontrollgruppe konnte keine Virus-RNA in irgendeiner Probe gefunden werden. Zur Überprüfung dieser Ergebnisse wurde zusätzlich ein Southern Blot für GCR (Group C Rotavirus) mit den gleichen amplifizierten Proben durchgeführt, der ebenfalls für alle negativ ausfiel. Diese Ergebnisse von Bobo [9] stehen im totalen Widerspruch zu den Ergebnissen von Riepenhoff-Talty [89], bei deren Studie 50 % aller EHGA-Proben für GCR positiv waren**. Bobo** [9] **kommt deshalb zum Schluss, dass es keinen Zusammenhang zwischen Rotavirus C-Infektion und EHGA gibt.** Zur Gewährleistung der Verlässlichkeit der Methode wurden als Positivkontrolle Rotavirusbestände der Gruppe A und C verwendet. Außerdem wurde zur Kontrolle des richtigen Ablaufs der PCR ein β-Aktin housekeeping Gen bestimmt, das in jeder Probe positiv nachgewiesen werden konnte und somit den ordnungsgemäßen Ablauf der PCR bestätigt. Für jede einzelne Gruppe der Rotaviren (A, B, C) wurde eine individuelle RT-PCR-EIA, die spezifischer und sensitiver für das Agens ist entwickelt, um die Chance eines Nachweises zu maximieren. An der Studie ist auffällig, wie die Autorin selbstkritisch bemängelt, dass nur 6 der 10 Patienten mit EHGA unmittelbar nach Diagnosestellung untersucht wurden. Die anderen 4 Proben wurden erst während einer Lebertransplantation (im

Alter von 13, 17, 19 Monate sowie 10 Jahre) entnommen. Für die 4 Patienten wäre eine Aussage über die Kausalität einer eventuell nachgewiesenen Infektion für die EHGA nicht zuverlässig, da keine Aussage über den Zeitpunkt der Infektion getroffen werden kann. Eine eventuelle Infektion, die hier ohnehin nicht nachgewiesen werden konnte, könnte bei bereits bestehender Gallengangsatresie begonnen haben. Außerdem konnte bei 2 Proben die β-Aktin-mRNA nur in Lebergewebe nachgewiesen werden, der Nachweisversuch in Gallengangsresten verlief frustran. Dies könnte ein Anzeichen dafür sein, dass die Effektivität der PCR bei diesen Proben vermindert ist. Als weitere Kritik fügt die Autorin selbst hinzu, dass die verwendeten Leberproben eventuell nicht aussagekräftig genug sind, da EHGA primär eine Erkrankung der Gallengänge ist. Die Autorin stellt ihre Ergebnisse denen von Riepenhoff-Talty [89] entgegen und kommt zu dem Schluss, dass ein eventueller Zusammenhang in Studien von einem erheblich größeren Umfang untersucht werden müßten um ein repräsentatives Bild zu erhalten. Auf diese Weise könnte versucht werden einer der beiden gegensätzlichen Aussagen mehr Gewicht zu verleihen.

1998 griff Tyler [125], die schon 1995 von Steele [115] diskutierte Möglichkeit einer Beziehung zwischen Reovirus Typ 3-Infektion und EHGA auf. Er verwendete dieselbe Methode wie Steele [115], eine nested-RT-PCR. Jedoch wurden von Tyler [125] Primer gegen das L1-Gensegment des Virus verwendet. Diese wurden aber bereits in der Arbeit von Steele [115], aufgrund einer schon erwähnten Problematik der erhöhten Mutationsrate, scharf kritisiert. Das im Vergleich zu Steele [115] etwas umfangreichere Patientengut bestand aus 23 Patienten mit EHGA, 9 mit Choledochuszyste (CDC) und 33 mit anderen hepatobiliären Erkrankungen sowie aus 17 bei einer Autopsie entnommenen Proben, bei denen keine Leber- oder Gallenkrankheit bekannt war. Es wurden jedoch 3 EHGA-Patienten aus der Studie ausgeschlossen, da sie zusätzlich ein Polysplenia Syndrom hatten und deshalb getrennt betrachtet wurden. Die Diagnose der Patienten wurde histologisch gesichert. Für die Versuche wurde frisches Gewebe von Leber, Gallenblase, Choledochuszyste oder Gallengängen verwendet. Die Verwendung von Primern, die das L1-Gensegment codieren, wurde von dem Autor gewählt, da diese Region die Matrize einer RNA abhängigen RNA-Polymerase des Reovirus ist und in hoher Konzentration in den Serotypen 1 und 3 enthalten ist. Durch die RT-PCR konnte

in 11 der 20 Patientenproben mit EHGA (= 55 %) Reovirus-RNA entdeckt werden, ebenso wurden 7 von 9 der Choledochuszystenproben (= 78 %) positiv getestet. Ebenso stellte sich bei 7 der 33 Patienten (= 21 %) mit anderen hepatobiliären Erkrankungen und bei 2 von 12 Autopsiefällen (= 12 %) ein positives Ergebnis ein. **Im Gegensatz zu Steele** [115] **sieht Tyler** [125] **eine signifikante Erhöhung der Reovirusinfektion bei EHGA und CDC.** Da die Patienten der EHGA-Gruppe alle jünger als zwölf Monate alt waren, und somit wesentlich jünger als die der Kontrollgruppe und der Autopsiefälle, wurden die Patienten, die älter als ein Jahr waren ausgeschlossen und die Ergebnisse erneut miteinander verglichen, um so die Fehlerquelle „Altersunterschied" zu vermeiden. Auch bei dieser erneuten Analyse bestätigten sich die signifikanten Ergebnisse. Die „verblindete" Studie wurde in verschiedenen Labors von jeweils anderen Untersuchern, die mit der Fragestellung des Experimentes nicht vertraut waren, durchgeführt und beurteilt, um so eine neutrale Auswertung der Ergebnisse zu gewährleisten. Die Sensitivität der RT-PCR wurde extra in einer Reihenverdünnung überprüft um die minimal benötigte Viruslast für ein positives Ergebnis ($\leq$ 100 Kopien) zu ermitteln. Das Primerset wurde so gewählt, dass es eine große Variabilität von Reovirusisolationen (Prototypen der Reovirusstränge T1L, T2f, etc.) toleriert und identifizieren kann. Hierdurch wird gewährleistet, dass diese RT-PCR alle Prototypen identifizieren kann. Als Positivkontrolle wurde auch hier die Anwesenheit von β-Aktin-mRNA gemessen. Die Tatsache, dass in manchen Proben sehr wohl Doppelstrang-Reovirus-RNA, jedoch keine positive Kontrolle (Einzelstrang-mRNA) nachgewiesen wurde, führt der Autor darauf zurück, dass die Doppelstrang-RNA stabiler ist.

1998 zeigte Fischler [36] erneut, dass eine Cytomegalievirus-Infektion eine ursächliche Rolle für die Entstehung einer EHGA spielen könnte. Die möglichen pathologischen Mechanismen für diesen Zusammenhang wurden in dieser Arbeit nicht untersucht. Es wurden in der Studie 59 Kinder (29 Mädchen und 30 Jungen) untersucht. Alle Kinder zeigten eine Gelbsucht sowie biochemische Zeichen einer Cholestase. Bei 21 der Patienten konnte eine EHGA diagnostiziert werden (= 35 %), die anderen hatten eine intrahepatische neonatale Cholestase anderer Genese (z.B. α-1-Antitrypsinmangel, progressive familiäre intrahepatische Cholestase, Trisomie 21). 54 Mütter der aufgeführten Kinder wurden ebenfalls in die Studie aufgenommen. Als Kontrollgruppe

dienten 35 Kinder ohne Cholestase sowie 111 gesunde Schwangere. In der Studie wurde versucht mit Hilfe eines ELISA, einen serologischen Nachweis von Antikörpern gegen folgende Viren zu erbringen (CMV, Herpes-simplex 1 und 2, Rubella, Toxoplasmose gondii, EBV, Enterovirus, Adenovirus, Influenza A und B, RSV und Parainfluenza Typ 1- 3 sowie Hepatitis-A und-B). Bei der Durchführung dieses Tests wurde eine höhere Seroprävalenz von CMV entdeckt. Die von Fischler [36] durchgeführte Studie ergab die in der Tabelle 1 (S.17) bereits dargestellten Ergebnisse.
Das für diese Arbeit besonders relevante Resultat war, dass 8 von 21 Kindern mit der Diagnose EHGA CMV-IgG positiv waren. Aufgrund dieser überraschenden Ergebnisse entschloss sich der Autor zusätzlich eine PCR mit den vorhandenen Proben durchzuführen, um eventuell vorhandene CMV-DNA nachzuweisen. Von den bei 40 der 59 Kinder durchgeführten Leberbiopsien war das Material nur bei 25 Proben ausreichend um eine PCR anzuschließen. 18 der 25 Proben stammten von EHGA-Patienten und 7 von Patienten mit intrahepatischer Cholestase. Bei 9 von 18 EHGA-Patienten (= 50 %) konnte CMV-DNA nachgewiesen werden**. Aufgrund dieser Ergebnisse kommt Fischler** [36] **zum Schluss, dass eine CMV-Infektion in der Entstehung der EHGA eine Rolle spielen könnte.** Die PCR und ELISA-Methode können in dieser Studie als sehr verlässlich angesehen werden, da nur brauchbares Material verwendet wurde und auch Kontrollgruppen miteinbezogen waren.

Im selben Jahr berichtete Drut [30] in einer retrospektiven Fall-Kontroll-Studie über das mögliche Bestehen eines Zusammenhangs zwischen der Infektion des Humanen Papillomavirus und der Extrahepatischen Gallengangsatresie. Hierbei wurde in Paraffin-gebettetes Gewebe verwendet, das in der Zeit von 1982 bis 1996 von 18 Patienten mit EHGA entnommen und archiviert worden war. Als Kontrollgruppe wurde Gewebematerial verwendet, das von 30 verstorbenen Patienten mit verschiedenen Diagnosen (z.B. Meningitis, Sepsis, plötzlicher Kindstod), jedoch keiner hepatobiliären Erkrankung, bei der Obduktion entnommen wurde. Zur Untersuchung wurde die sogenannte nested-PCR auf die HPV-Typen 6, 16, 18 und 33 angewandt. Dabei wurde das Material von 16 der 18 EHGA-Patienten positiv getestet.

Es ergab sich folgende HPV-Typen-Verteilung:

* 10 positive Fälle waren HPV-Typ 6
* 4 positive Fälle waren HPV-Typ 18
* 2 positive Fälle waren HPV-Typ 6 und 18

Histologisch konnte bei den EHGA-Fällen kein Unterschied zwischen HPV positiven und HPV negativen Fällen festgestellt werden. Im Gegensatz dazu, wurde bei keinem der 30 Kontrollpatienten HPV-DNA amplifiziert. **Drut** [30] **folgert aus seinen Ergebnissen, dass aufgrund der hohen Prävalenz der HPV-DNA in EHGA-positiven Proben ein möglicher Zusammenhang zwischen HPV-Infektion und der Gallengangsatresie gegeben ist.**

Sokal [113] untersuchte 1998 die Ursache der Fulminanten Hepatitis (FH) im Hinblick auf eine akute Parvovirus B19-Infektion. Für diese retrospektive Studie zog er eine Kontrollgruppe von 82 Patienten mit EHGA zu, die sich aufgrund einer anstehenden Lebertransplantation zu dieser Zeit in stationärer Behandlung befanden. Als Methode wurde auch hier die nested-PCR gewählt. Dabei wurde in 4 von 41 Fällen mit Fulminanter Hepatitis das PVB 19-Genom nachgewiesen, während in der für die vorliegende Studie interessanten Kontrollgruppe in allen 82 Fällen kein Nachweis einer PVB 19-Infektion erbracht werden konnte. **Aus diesem Ergebnis ergibt sich kein Anhalt für eine mögliche Assoziation zwischen einer PVB 19-Infektion und der EHGA.** Die mögliche Beziehung einer Parvovirus-Infektion und FH soll nicht Gegenstand dieser Arbeit sein und wird deshalb nicht weiter ausgeführt.

1999 griff Jevon [52] abermals die Diskussion über einen möglichen pathogentischen Zusammenhang der CMV-Infektion und EHGA auf. Er untersuchte retrospektiv 12 Proben von Kindern, die in den 5 Jahren zuvor, während der Operation einer EHGA einer Gallengangsbiopsie unterzogen wurden, mittels PCR und in-situ-Hybridisierung. Histologisch konnten keine Anzeichen einer CMV-Infektion festgestellt werden. In keiner der 12 Gewebebiopsien war die Amplifizierung von CMV-DNA möglich. Auch die in-situ-Hybridisierung an allen Proben ergab kein positives Ergebnis. **Aufgrund dieser Ergebnisse hält Jevon** [52], **im Gegensatz zu Fischler** [36] **und Tarr** [122], **eine Rolle des CMV-Virus bei der Entstehung der Gallengangsatresie für**

unwahrscheinlich. Anders als Tarr [122], der nur einen Antikörpernachweis durchführte, wurde von Jevon [52] die sensitivere PCR verwendet. Fischler [36] benutzte jedoch beide Methoden und erhielt positive Ergebnisse, so dass sich diese Aussagen widersprechen. Jevon [52] erwähnt jedoch auch die Möglichkeit, dass die Viruslast bei eventuell infizierten Patienten so niedrig gewesen sein könnte, dass sie durch die PCR nicht erfasst werden konnte, was aufgrund von vorangegangenen gelungenen Experimenten dem Autor jedoch unwahrscheinlich erscheint.

Domiati-Saad [28] untersuchte im Jahr 2000 zum ersten Mal den Zusammenhang von fünf verschiedene Virustypen und der Neonatalen Riesenzellhepatitis (GCH) sowie der EHGA. Bei dieser Studie wurde archiviertes, gefrorenes Lebergewebe von 10 GCH-Patienten sowie 9 Patienten mit der Diagnose EHGA verwendet. Diese Proben wurden in der Zeit von 1988-1998 gesammelt. Der Kontrolle dienten 8, während einer Autopsie entnommene Proben, altersgleicher Patienten ohne Lebererkrankungen. Die Proben wurden mittels nested-PCR sowie ^{32}P-Hybridisierung auf die Viren HPV, EBV, PVB 19, CMV und HHV 6 untersucht. Die Viren HPV, EBV und PVB 19 konnten in keiner der Proben nachgewiesen werden. Für das Cytomegalievirus wurden jedoch 2 GCH-Proben und 1 EHGA-Probe positiv getestet. Alle 8 Kontrollproben waren auf CMV negativ. Bei der Untersuchung der Proben auf das HHV 6-Virus wurde sowohl 1 GCH-Probe sowie 2 EHGA-Proben als auch 2 der Kontrollproben positiv getestet. **Auf Grund dieser Ergebnisse geht Domiati-Saad** [28] **davon aus, dass die Viren HPV, EBV und PVB 19 im Zusammenhang mit der Genese von GCH und EHGA keine Rolle spielen. Im Bezug auf das CMV vertritt Domiati-Saad** [28] **die Meinung, dass ihre Ergebnisse die bereits früher aufgestellten Hypothesen über den Zusammenhang von der CMV-Infektion und der Entstehung von GCH und EHGA stützen.** Die positiven Ergebnisse auf HHV 6 sind ihrer Meinung nach aufgrund der hohen Prävalenz in der Bevölkerung problematischer zu betrachten. Dies wird auch durch das positive Ergebnis bei 2 der Kontrollproben bestätigt. **Über das HHV 6 lässt sich keine Aussage über einen ursächlichen Zusammenhang treffen,** so dass es bezüglich des HHV 6 noch weiterer Studien bedarf. Die von Domiati-Saad [28] verwendeten Methoden sind als sehr verlässlich anzusehen, da es sich bei der nested-

PCR um eine sehr sensitive Methode handelt und diese durch den Schritt der Hybridisierung noch weiter spezifiziert werden konnte.

In der Untersuchung von Saito 2004 [91] wurden, wie bereits bei Tyler [125] und Steele [115], Proben von Patienten mit EHGA mittels nested-RT-PCR auf die Anwesenheit von Reovirus-RNA getestet. Er verwendete dieselben Primer wie Tyler [125] gegen das L3-Gensegment des Virus. Es wurden 136 Proben aus hepatobiliärem Gewebe (Leber, Leberpforte, Gallenblase und Ductus choledochus) untersucht, die von 67 Patienten im Zeitraum von 1987 bis 2002 entnommen wurden. Die Proben stammten von 26 Patienten mit EHGA und 28 mit angeborener Erweiterung der Gallengänge. Als Kontrolle dienten 13 Proben von Patienten, die an anderen Erkrankungen wie z.B. Neonataler Hepatitis, Wilmstumor oder Hepatoblastom litten. Die ebenfalls getesteten 65 Stuhlproben stammten von 10 Patienten mit EHGA, einem Patienten mit angeborener Erweiterung der Gallengänge und 4 Kontrollpatienten. Zusätzlich zur nested-RT-PCR wurden die Stuhlproben unter einem Elektonenmikroskop untersucht. Weder in den hepatobiliären Proben noch in den Stuhlproben konnte durch die RT-PCR Reovirus-RNA nachgewiesen werden. Auch elektronenmikroskopisch konnten in keiner Probe Viruspartikel gefunden werden. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu denen von Tyler [125], in dessen Arbeit 55 % der EHGA-Proben positiv waren. **Aufgrund dieser Resultate ist Saito** [91] **derselben Ansicht wie Steele** [115] **und sieht keinen kausalen Zusammenhang zwischen Reovirusinfektion und Erkrankung.**

V.4 Diskussion eigener Ergebnisse versus Ergebnisse aus der Literaturrecherche

Im Folgenden werden die eigenen Ergebnisse mit den Ergebnissen derjenigen Autoren verglichen, welche die gleiche Fragestellung bearbeiteten und dabei dieselben Virustypen mit derselben Methode (PCR) untersucht haben.
Es soll aufgezeigt werden, inwiefern die Ergebnisse der anderen Autoren aus der Literatur die eigenen Ergebnisse unterstützen können bzw. im Widerspruch zu diesen stehen.

Tab. 7 Vergleich der eigenen Ergebnisse bezogen auf die Ergebnisse und Fallzahl einer Literaturrecherche

Autor	Fallzahl der untersuchten EHGA-Patienten	positive Fälle für den jeweils untersuchten Virustyp
Riepenhoff-Talty (1996) [89]	18	9 Rotavirus C
	10	0 Rotavirus A
Bobo (1997) [9]	10	0 Rotavirus A
	10	0 Rotavirus B
	10	0 Rotavirus C
Fischler (1998) [36]	18	9 CMV
Jevon (1999) [52]	12	0 CMV
Domiati-Saad (2000) [28]	9	0 EBV
	9	1 CMV
Junginger (2005)	22	3 CMV
	23	2 EBV
	19	0 Rotavirus C
	2	0 Rotavirus A

CMV

In den eigenen Versuchen waren 3 von 22 Proben (= 13,6 %) positiv auf CMV.

Bei Fischler [36] wurden 50 % der 18 Patienten mit EHGA mittels PCR auf CMV positiv getestet. Die Untersuchungen von Domiati-Saad [28] ergab eine Rate von 11,1 % positiver Fälle. Jevon [52] erzielte bei seinen 12 Patienten kein einziges positives Resultat. Die Unterschiede sind also eklatant. Kritisch muß angemerkt werden, dass bei all diesen Studien die Fallzahl sehr gering war und daher die Aussagekraft sehr einschränkt ist. Hier könnte der schon erwähnte Fehler 2. Art aufgetreten sein, so dass die geringen Patientenzahlen einen falsch negativen oder positiven Zusammenhang vortäuschen können. Außerdem sind die (geringen) positiven Ergebnisse mit 13,6 % in der eigenen Studie, die 11,1 % aus der Studie von Domiati-Saad [28] und 0 % von

Jevon [52] sicherlich nicht ausreichend hoch um eine klare Verbindung zwischen Infektion und Erkrankung herzustellen.

EBV

Für das Epstein-Barr-Virus gibt es nur Daten aus der Studie von Domiati-Saad [28] und der eigenen. Bei Domiati-Saad [28] war keine der 9 Patientenproben positiv und bei der eigenen Untersuchung gab es nur 8,7 % positive Proben. Die 2 Patientenproben, in denen das EBV-Virus nachgewiesen werden konnte, wiesen die größte Zeitspanne zwischen Geburt und Entnahmezeitpunkt der Probe auf. Somit besteht die Möglichkeit, dass die EBV-Infektion postnatal stattgefunden hat. Deshalb ist keine sichere Aussage über Infektionszeitpunkt und Kausalität für die Entstehung einer EHGA möglich. Übereinstimmend mit Domiati-Saad [28] sprechen die eigenen Ergebnisse gegen einen Zusammenhang zwischen EBV-Infektion und EHGA.

Rotaviren

Für die Beurteilung von Rotaviren in Zusammenhang mit der EHGA wurde der eigenen Studie, die Studie von Riepenhoff-Talty von 1996 [89] zugrunde gelegt. Es wurde dieselbe Methodik mit denselben Primern verwendet, so dass die Ergebnisse verglichen werden können. Ein Unterschied bestand allerdings im Probenmaterial. Riepenhoff-Talty [89] verwendete sowohl Leber-, Gallen-, Gallengangs- und Stuhlproben. In der eigenen Arbeit wurde jedoch ausschließlich Leber- und Leberpfortengewebe verwendet. Außerdem wurde von Riepenhoff-Talty [89], im Gegensatz zur eigenen Arbeit, eine Kontrollgruppe eingesetzt, die aber für die PCR-Untersuchung nur aus 2 Patienten bestand. Sie wandte zudem mit der Liquid-Hybridisierung eine zweite Methode an, die jedoch zu denselben Ergebnissen geführt hat wie die PCR und diese somit unterstreicht.
Obwohl in beiden Arbeiten dieselben Methoden verwendet wurden, ergaben sich widersprüchliche Ergebnisse für Rotavirus C. Riepenhoff-Talty [89] erhielt in ihrer Arbeit 50 % positive Ergebnisse, während in der eigenen Arbeit 0 % der getesteten Proben positiv waren.
Somit widerspricht die eigene Schlussfolgerung der Conclusion von Riepenhoff-Talty [89] und unterstützt die Ergebnisse von Bobo [9], die ebenfalls bei ihren 10 Patienten kein positives Ergebnis erhielt und deshalb auch davon ausgeht, dass kein

Zusammenhang zwischen Rotavirus C und der Genese von EHGA besteht. Der Arbeit von Bobo [9] wurde identisch zur eigenen Untersuchung der PCR-Untersuchung ein β-Aktin-mRNA-Nachweis vorangestellt, mit dem aufgezeigt werden konnte, welche der von Bobo [9] und uns verwendeten Proben intaktes Gewebe enthielten. Auch hier handelte es sich bei dem Probenmaterial ausschließlich um Lebergewebe. Ähnlich wie Riepenhoff-Talty [89] verwendete auch Bobo [9] eine zweite Methode in ihrer Untersuchung, den Southern Blot, und bestätigte damit alle eigenen Ergebnisse.
Der Nachweis von Rotavirus A in den Proben gelang weder Riepenhoff-Talty [89], Bobo [9] noch in der eigenen Arbeit, so dass in dieser Hinsicht kein Autor von einem pathogenetischen Zusammenhang ausgeht.

VI ZUSAMMENFASSUNG UND SCHLUSSFOLGERUNG

Zur Klärung der Pathogenese der Extrahepatischen Gallengangsatresie wurden verschiedene Theorien aufgestellt und epidemiologische, histologische, immunhistochemische sowie virologische Untersuchungen durchgeführt.

Diese Arbeit soll zur Frage über eine mögliche infektiöse, virale Ursache bei der Entstehung der EHGA beitragen.

Es findet sich eine umfangreiche Literatur, die sich mit derselben Fragestellung befasst hat. Dabei konzentrierten sich die Untersuchungen auf die Virustypen Reovirus Typ 3, Cytomegalievirus, Epstein-Barr-Virus, Humanes Herpesvirus Typ 6, Hepatitis-Viren, humanes Papillomavirus, Parvovirus B19 sowie Rotaviren. Trotzdem konnte die große Anzahl der Arbeiten bisher nicht zu einem eindeutigen Ergebnis führen. Sowohl die Ergebnisse über Untersuchungen zu den einzelnen Virustypen als auch die Schlussfolgerung der Autoren bezüglich einer möglichen viralen Genese der EHGA sind gegensätzlich. Positive und negative Ergebnisse stehen sich gegenüber und lassen kein eindeutiges Fazit zu.

Die Gründe dieser Unterschiede in den Ergebnissen haben mehrere Ursachen. So wurden beispielsweise von den einzelnen Autoren unterschiedliche Methoden angewendet, deren Ergebnisse nur schwer vergleichbar sind; auch wenn sich die Techniken teilweise nur in Nuancen unterscheiden. Die gegensätzlichen Ergebnisse können auch Folge der extrem kleinen Fallzahlen sein, die sich aus dem seltenen Auftreten der EHGA ergeben. Diese Problematik kennzeichnet die publizierten Arbeiten, da die niedrige Inzidenz der Erkrankung ein großes Patientenkollektiv nicht zulässt.

Die Mehrzahl der Autoren spricht sich aufgrund ihrer Untersuchungen gegen eine Virusgenese der EHGA aus. Dieses Verständnis wird durch die eigenen Ergebnisse bestätigt. Mittels PCR konnten für die Viren Herpes-simplex-Virus Typ 1 und Typ 2, Humanes Herpesvirus Typ 6, Varizella-Zoster-Virus, Hepatitis-B-, -C- und G-Virus, Adenovirus, Enteroviren, Coxsackie-A- und -B-Virus, ECHO-Virus (ECHO), Respiratory Syncytial Virus, Parvovirus B19, Rotavirus C und A nur negative Ergebnisse erzielt werden. Nur bei Untersuchungen für das Cytomegalovirus waren 13,6 % sowie für das Epstein-Barr-Virus 8,7 % der Ergebnisse positiv. Schon die

Prozentzahlen alleine sprechen nicht für einen kausalen Zusammenhang zwischen Infektion und Erkrankung, da sie mit dieser Größenordnung die natürliche Durchseuchungsrate ausdrücken. Auch hier müssen in der Wertung der Ergebnisse wieder weitere Faktoren wie die geringe Fallzahl und die natürliche Durchseuchungsrate miteinbezogen werden. Es kann also auch für diese Virusarten nicht von einem kausalen Zusammenhang ausgegangen werden, so dass die eigenen Ergebnisse eine Virusgenese ebenso wenig bestätigen, wie auch der Großteil der Literatur.

Auch die Theorien der peri- oder postnatalen Schädigung der extrahepatischen Gallengänge durch andere Noxen wie pathologische Gallensäuren, Pankreassaftreflux oder exogene Einflüsse sowie die Theorie einer immunologischen Genese konnten in der Literatur bisher weder eindeutig widerlegt noch bestätigt werden. Widersprüchlich ist auch die Theorie der genetischen Disposition, welche mit Resultaten aus der Zwillingsforschung für unwahrscheinlich erklärt werden kann, da bei allen Untersuchungen meist nur ein Zwilling an EHGA erkrankt war [100].

Die Pathogenese der EHGA lässt sich am besten mit einer Hemmungsmissbildung erklären, für die es in der Literatur keine eindeutigen Widersprüche gibt. Hier wird eine Fehlentwicklung der embryonalen/fetalen Vorstufen der Gallengänge durch eine Entwicklungsstörung vermutet [5, 83, 100, 102]. Auch die Theorie einer lokalen Ischämie ist als Ursache für die Entstehung wahrscheinlich [100, 102]. Jedoch könnte auch eine Kombination dieser beiden Ursachen in Frage kommen. So kann auch bei einer Entwicklungshemmung der embryonalen Gallengänge, die wahrscheinlich Folge einer reduktiven mesenchymalen Störung ist, eine lokale Ischämie mit dem Resultat einer ischämischen Obliteration der Gallengänge auftreten.

LITERATURVERZEICHNIS

1. **A-Kader** H.H., Nowicki M.J., Kuramoto K.I., Baroudy B., Zeldis J.B., Balistreri W.F. **(1994)**
Evaluation of the role of hepatitis C virus in biliary atresia
Pediatr Infect Dis J 13: 657-659

2. **Alagille** D. **(1984)**
Extrahepatic biliary atresia
Hepatology 4: 7S-10S

3. **Ando** K., Miyano T., Fujimoto T., Ohya T., Lane G., Tawa T., Tokita A., Yabuta K. **(1996)**
Sibling occurrence of biliary atresia and biliary dilatation
J Pediatr Surg 31: 1302-1304

4. **Ayas** M.F., Hillemeier A.C., Olson A.D. **(1996)**
Lack of evidence for seasonal variation in extrahepatic biliary atresia during infancy
J Clin Gastroenterol 22: 292-294

5. **Bachmann** C. **(2004)**
Histomorphologischer Vergleich der Befunde der Leberpforte bei Extrahepatischer Gallengangsatresie und der Entwicklung des Gallengangsystems bei Rattenembryonen in den Carnegiestadien 20-23 als Beitrag zur Pathogenese der Extrahepatischen Gallengangsatresie
Med. Dissertation, Universität Tübingen 2004

6. **Balistreri** W.F., Tabor E., Gerety R.J. **(1980)**
Negative serology for hepatitis A and B viruses in 18 cases of neonatal cholestasis
Pediatrics 66: 269-271

7. **Balistreri** W.F. **(1985)**
Neonatal cholestasis
J Pediatr 106: 171-184

8. **Bates** M.D., Bucuvalas J.C., Alson M.H., Ryckman F.C. **(1998)**
Biliary atresia: Pathogenesis and treatment
Sem Liver Dis 18: 281-293

9. **Bobo** L., Ojeh C., Chiu D., Machado A., Colombani P., Schwarz K. **(1997)**
Lack of evidence for rotavirus by polymerase chain reaction/enzyme immunoassay of hepatobiliary samples from children with biliary atresia
Pediatr Res 41: 229-234

10. **Broome** U., Nemeth A., Hultcrantz R., Scheynius A. **(1997)**
Different expression of HLA-DR and ICAM-1 in livers from patients with biliary atresia and Byler´s disease
J Hepatol 26: 857-862

11. **Brown** T.A. **(1996)**
Gentechnologie für Einsteiger
2. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford

12. **Brown** W.R., Sokol R.J., Levin M.J., Silverman A., Tamaru T., Lilly J.R., Hall R.J., Cheney M. **(1988)**
Lack of correlation between infection with reovirus 3 and extrahepatic biliary atresia or neonatal hepatitis
J Pediatr 113: 670-676

13. **Carmi** R., Magee C.A., Neill C.A., Karrer F.M. **(1993)**
Extrahepatic biliary atresia and associated anomalies: etiologic heterogeneity suggested by distinctive patterns of association
Am J Med Genet 45: 683-693

14. **Chandra** R.S. **(1974)**
Biliary atresia and other structural anomalies in the congenital polysplenia syndrome
J Pediatr 85: 649-655

15. **Chang** M.H., Huang H.H., Huang E.S., Kao C.L., Hsu H.Y., Lee C.Y. **(1992)**
Polymerase chain reaction to detect human cytomegalovirus in livers of infants with neonatal hepatitis
Gastroenterology 103: 1022-1025

16. **Chen** K., Gavaler J.S., Van Thiel D.H., Whiteside T. **(1989)**
Phenotypic characterization of mononuclear infiltrate present in liver of biliary atresia
Dig Dis Sci 34: 1564-1570

17. **Cox** K.L, Berquist W.E., Castillo R.O. **(1999)**
Paediatric liver transplantation: indications, timing and medical complications
J Gastroenterol Hepatol 14: S61-S66

18. **Cunningham** M.L., Sybert V.P. **(1988)**
Idiopathic extrahepatic biliary atresia: recurrence in sibs in two families
Am J Med Genet 31: 421-426

19. **Danesino** C., Spadoni E., Buzzi A. **(1999)**
Familial biliary atresia
Am J Med Genet 85: 195

20. **Danks** D.M., Campbell P.E., Jack I., Rogers J., Smith A.L. **(1977)**
Studies of the aetiology of neonatal hepatitis and biliary atresia
Arch Dis Child 52: 360-367

21. **Davenport** M., Savage M., Mowat A.P. **(1993)**
Biliary atresia splenic malformation syndrome: An etiologic and prognostic subgroup
Surgery 113: 662-668

22. **Davenport** M., Dhawan A. **(1998)**
Epidemiologic study of infants with biliary atresia
Pediatrics 101: 729-730

23. **Davenport** M., Hadzic N. **(2003)**
Prenatal diagnosis of liver and biliary tract disease
Semin Neonatol. 8: 347-355

24. **Desmet** V.J. **(1992)**
Congenital disease of intrahepatic bile ducts: variations on the theme "ductal plate malformation"
Hepatology 16: 1069-1083

25. **Dillon** P.W., Belchis D.B., Tracy T.T., Cilley R.E., Hafer L., Krummel T.M. **(1994)**
Increased expression of intercellular adhesion molecules in biliary atresia
Am J Pathol 145: 263-267

26. **Dillon** P.W., Belchis D., Minnick K. Tracy T. **(1997)**
Differential expression of the major histocompatibility antigens and ICAM-1 on bile duct epithelial cells in biliary atresia
Tohoku J Exp Med 181:33-40

27. **Dimmick** J.E., Bove K.E., Mc Adams A.J. **(1975)**
Letter: Extrahepatic biliary atresia and the polysplenia syndrome
J Pediatr 86: 644-645

28. **Domiati-Saad** R., Dawson D.B., Margraf L.R., Finegold M.J., Weinberg A.G., Rogers B.B. **(2000)**
Cytomegalovirus and human herpesvirus 6, but not human papillomavirus, are present in neonatal giant cell hepatitis and extrahepatic biliary atresia
Pediatr Dev Pathol 3: 367-373

29. **Donop** C.F. **(1852)**
De ictero specialisme neonatorum
Inaug.Diss. Berlin 1852

30. **Drut** R., Drut R.M., Gomez M.A., Rua E.C., Lojo M.M. **(1998)**
Presence of human papillomavirus in extrahepatic biliary atresia
J Pediatr Gastroenterol Nutr 27: 530-535

31. **Dussaix** E., Hadchouel M., Tardieu M., Alagille D. **(1984)**
Biliary atresia and reovirus type 3 infection
N Engl J Med 310: 658

32. **Eisenstein** B.I. **(1990)**
The polymerase chain reaction: A new method of using molecular genetics for medical diagnosis
New. Engl. J. Med. 322: 178-183

33. **Enders** G. **(1983)**
Virus- und andere Infektionen in der Schwangerschaft: Diagnostik und Prävention
Z.Geburtsh. u. Perinat. 187: 109-116

34. **Enders** G. **(1991)**
Infektionen und Impfungen in der Schwangerschaft: Infektionen der Mutter und des Feten; Schutzimpfungen in der Schwangerschaft
2. Aufl., Urban & Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore

35. **Erhart** N.A., Sinatra F.R. **(1994)**
Biliary atresia, intestinal malrotation, partial abdominal heterotaxia, and craniofacial anomalies in a newborn with intrauterine opiate exposure
J Pediatr Gastroenterol Nutr 18: 478-480

36. **Fischler** B., Ehrnst A., Forsgen M., Örvell C., Nemeth A. **(1998)**
The viral association of neonatal cholestasis in Sweden: A possible link between cytomegalovirus infection and exrahepatic biliary atresia
J Pediatr Gastroenterol Nutr 27: 57-64

37. **Gaytant** M.A., Steegers E.A., Semmekrot B.A., Merkus H.M., Galama J.M. **(2002)**
Congenital cytomegalovirus infection: review of the epidemiology and outcome
Obstet Gynecol Surv. 57: 245-256

38. **Glaser** J.H., Balistreri W.F., Morecki R. **(1984)**
Role of reovirus type 3 in persistent infantile cholestasis
J Pediatr 105: 912-915

39. **Goldberg** G.N., Fulginiti V.A., Ray G., Ferry P., Jones J.F., Cross H., Minnich L. **(1981)**
In utero Epstein-Barr virus (infectious mononucleosis) infection
JAMA 246: 1579-1581

40. **Gouvea** V., Glass R., Woods P., Taniguchi K., Clark H.F., Forrester B., Fang Z.-Y. **(1990)**
Polymerase chain reaction amplification and typing of Rotavirus nucleic acid from stool specimens
J Clin Microbiol 28: 276-282

41. **Gouvea** V., Allen J.R., Glass R.I., Fang Z.-Y, Bremont M., Cohen J., McCrae M.A., Saif L.J., Sinarachatanant P., Caul E.O. **(1991)**
Detection of group B and C Rotaviruses by polymerase chain reaction
J Clin Microbiol 29: 519-523

42. **Hadchouel** M., Hugon R.N., Odievre M. **(1981)**
Immunoglobulin deposits in the biliary remnants of extrahepatic biliary atresia: a study by immune-peroxidase staining in 128 infants
Histopathol. 5: 217-222

43. **Hadzic** N., Davenport M., Tizzard S., Singer J., Howard E.R., Mieli-Vergani G. **(2003)**
Long-term survival following Kasai portoenterostomy: is chronic liver disease inevitable?
J Pediatr Gastroenterol Nutr. 37: 430-433

44. **Harper** L.V., Hilton A.C., Jones A.F. **(2003)**
RT-PCR for the pseudogene-free amplification of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene (gapd)
Mol Cell Probes. 17: 261-265

45. **Harris** R.C., Anderson D.H. **(1960)**
Intrahepatic bile ducts atresia in two sets of twins of monozygotic twins
J. Ped. 107: 420-422

46. **Hart** M.H., Kaufman S.S., Vanderhoof J.A., Erdman S., Linder J., Markin R.S., Kruger R., Antonson D.L. **(1991)**
Neonatal Hepatitis and extrahepatic biliary atresia associated with cytomegalovirus infection in twins
Am J Dis Child 145: 302-305

47. **Ho** C.-W., Shioda K., Shirasaki K., Takahashi S., Tokimatsu S., Maeda K. **(1993)**
The pathogenesis of biliary atresia: a morphological study of the hepatobiliary system and the hepatic artery
J Pediatr Gastroenterol Nutr 16: 53-60

48. **Holmes** J.B. **(1916)**
Congenital obliteration of the bile ducts: Diagnosis and suggestions for treatment
Am J Dis Chil 11: 405-431

49. **Houwen** R.H., Kerremans I.I., van Steensel-Moll H.A., van Romunde L.K., Bijleveld C.M., Schweizer P. **(1988)**
Time-space distribution of extrahepatic biliary atresia in The Netherlands and West Germany
Z Kinderchir 43: 68-71

50. **Hyams** J.S., Glaser J.H., Leichtner A.M., Morecki R. **(1985)**
Discordance for biliary atresia in two sets of monozygotic twins
J Pediatr 107: 420-422

51. **Ikeda** S., Sera Y., Yoshida M., Ohshiro H., Ueno M., Izaki T., Akizuki M., Hamamoto R. **(1999)**
Extrahepatic biliary atresia with trisomy 18 (abstract)
Pediatr. Surg-Int. 15: 137-138

52. **Jevon** G.P., Dimmick J.E. **(1999)**
Biliary atresia and cytomegalovirus infection: a DNA study
Pediatr Dev Pathol 2: 11-14

53. **Joncas** J.H., Alfieri C., Leyritz-Wills M., Brochu P., Jasmine G., Boldogh I., Huang E.S. **(1981)**
Simultaneous congenital infection with Epstein-Barr-virus and cytomegalovirus
New Engl J Med. 304: 1399-1403

54. **Jurado** A., Jara P., Camarena C., Hierro L., Lahoz C., Palomino P. **(1997)**
Is extrahepatic biliary atresia an HLA-associated disease ?
J Pediatr Gastroenterol Nutr 25: 557-558

55. **Karrer** F.M., Hall R.J., Lilly J.R. **(1991)**
Biliary atresia and the polysplenia syndrome
J Pediatr Surg. 26: 524-527

56. **Kasai** M., Watanabe K., Yamagata A., Takamura U. **(1957)**
Surgical treatment of biliary atresia
Nihonijishinpo 15: 1730

57. **Kasai** M., Suzuki S. **(1959)**
A new operation for noncorrectable biliary atresia: hepatic portoenterostomy
Shujutsu 13: 733

58. **Kasai** M., Kinura S., Asakura Y., Suzuki H., Taira Y., Ohashi E. **(1968)**
Surgical treatment of biliary atresia
J Pediatr Surg .3: 665-675

59. **Klippel** C.H. **(1972)**
A new theory of biliary atresia
J Pediatr Surg. 7: 651-653

60. **Kobayashi** H., Puri P., O´Briain D.S., Surana R., Miyano T. **(1997)**
Hepatic overexpression of MHC class II antigens and macrophage-associated antigens (CD68) in patients with biliary atresia of poor prognosis
J Pediatr Surg. 32: 590-593

61. **Koopmans** M., Monroe S.S., Coffield L.M., Zaki S.R. **(1993)**
Optimization of extraction and PCR amplification of RNA extracts from paraffin-embedded tissue in different fixatives
J Virol Methods. 43: 189-204

62. **Kwok** S., Higuchi R. **(1989)**
Avoiding false positives with PCR
Nature 339: 237-238

63. **Lachaux** A., Descos B., Plauchu H., Wrigth C., Louis D., Raveau J., Hermier M. **(1988)**
Familial extrahepatic biliary atresia
J Pediatr Gastroenterol Nutr 7: 280-283

64. **Ladd** W.E. **(1928)**
Congenital atresia and stenosis of the bile ducts
J Amer Med Assoc 91: 1082-1085

65. **Lamireau** T., Le Bail B., Boussarie L., Fabre M., Vergnes P., Bernard O., Gautier F., Bioulac-Sage P., Rosenbaum J. **(1999)**
Expression of collagens type I and IV, osteonectin and transforming growth factor beta-1 (TGFβ1) in biliary atresia and paucity of intrahepatic bile ducts during infancy
J Hepatol 31: 248-255

66. **Landing** B.H. **(1974)**
Considerations of the pathogenesis of neonatal hepatitis, biliary atresia and choledochal cyst: the concept of infantile obstructive cholangiopathy
Prog Pediatr Surg 6:113-139

67. **Landing** B.H., Mahnovski V., Dahms B. **(1981)**
Considerations of certain aspects of the pathogenesis of neonatal hepatitis and biliary atresia
In: Javitt NB (ed) Neonatal hepatitis and biliary atresia. Castle House, Tunbridge Wells, pp: 315-321

68. **Liberek** A., Gora-Gebka M., Bako W., Rytlewska M., Kozielska E., Korzon M. **(2000)**
Various types of cholestatic jaundice in infants - causes and diagnostic problems
Med Sci Monit 6: 548-554

69. **Lunzmann** K., Schweizer P. **(1999)**
The influence of cholangitis on the prognosis of extrahepatic biliary atresia
Eur J Pediatr Surg. 9: 19-23

70. **Minnick** K.E., Kreisberg R., Dillon P.W. **(1998)**
Soluble ICAM-1 (sICAM-1) in biliary atresia and its relationship to disease activity
J Surg Res 76: 53-56

71. **Miyano** T., Suruga K., Suda K. **(1979)**
Abnormal choledocho-pancreatico-ductal junction related to etiology of infantile obstruction jaundice disease
J Pediatr Surg. 14: 16-18

72. **Morecki** R., Glaser J.H., Cho S., Balistreri W.F., Horwitz M.S. **(1982)**
Biliary atresia and reovirus type 3 infection
N Engl J Med 307: 481-484

73. **Morecki** R., Glaser J.H., Johnson A.B., Kress Y. **(1984)**
Detection of reovirus type 3 in the porta hepatis of an infant with extrahepatic biliary atresia: Ultrastructural and immunocytochemical study
Hepatology 4: 1137-1142

74. **Morgan** W.W., Rosenkrantz J.B., Hill R.B.Jr. **(1966)**
Hepatic arterial interruption in the fetus. An attempt to simulate biliary atresia
J Pediatr Surg. 1: 342-345

75. **Morris** B.D., Nuss D., Winship W.S. **(1977)**
Biliary atresia in a twin
S Afr Med J 51: 469-470

76. **Mowat** A.P. **(1996)**
Biliary atresia into the 21st century: a historical perspective
Hepatology 23: 1693-1695

77. **Mullis** K.B. **(1990)**
Eine Nachtfahrt und die Polymerase- Kettenreaktion
Spektrum der Wissenschaft 6: 60-67

78. **Nakada** M., Nakada K., Kawaguchi F., Wakisaka M., Kashimura T., Yamate N., Maeyama S., Uchikoshi T. **(1997)**
Immunologic reaction and genetic factors in biliary atresia
Tohoku J Exp Med 181: 41-47

79. **Ohkawa** H., Sawaguchi S., Yamazaki Y., Sakaniwa M., Ishikawa A. **(1981)**
The production of anomalous pancreatico-biliary ductal union in canine models
Z. Kinderch 23: 328-331

80. **Oppenheimer** E.H., Esterly J.R. **(1973)**
Cytomegalovirus infection: a possible cause of biliary atresia
Lancet 2: 1031-1032

81. **Parashar** K., Tarlow M.J., McCrae M.A. **(1992)**
Experimental reovirus type 3-induced murine biliary tract disease
J Pediatr Surg. 27: 843-847

82. **Petersen** C., Kuske M., Bruns E., Biermanns D., Wussow P.V., Mildenberger H. **(1998)**
Progress in developing animal models for biliary atresia
Eur J Pediatr Surg 8: 137-141

83. **Petersen** M., Drews U., Schweizer P. **(2001)**
Induction of bile ducts in embryonic liver by mesenchyme: a perspective for the treatment of biliary atresia?
Eur J Pediatr Surg. 11: 382-390

84. **Pickett** L.K., Briggs H.C. **(1969)**
Biliary obstruction secondary to hepatic vascular ligation in fetal sheep
J Pediatr Surg. 4: 95-99

85. **Poovorawan** Y., Chongsrisawat V., Tanunytthawongse C., Norapaksunthorn T, Mutirangura Y., Chandrakamol B. **(1996)**
Extrahepatic biliary atresia in twins: zygotic determination by short tandem repeat loci (abstract)
J Med Assoc Thai 79: S119-124

86. **Qian** Y., Jiang B., Saif L., Kang S., Ojeh C.K., Green K.Y. **(1991)**
Molecular analysis of the gene 6 from a porcine group C rotavirus that encodes the NS 34 equivalent of group A rotaviruses
Virology 184: 752-757

87. **Ramm** G.A., Nair V. G., Bridle K.R., Shepherd R.W., Crawford D.H.G. **(1998)**
Contribution of hepatic parenchymal and nonparenchymal cells to hepatic fibrogenesis in biliary atresia
Am J Pathol 53: 527-535

88. **Riepenhoff-Talty** M., Schaekel K., Clark H.F., Mueller W., Uhnoo I., Rossi T., Fisher J., Ogra P.L. **(1993)**
Group A Rotaviruses produce extrahepatic biliary obstruction in orally inoculated newborn mice
Pediatr Res 33: 394-399

89. **Riepenhoff-Talty** M., Gouvea V., Evans M.J., Svensson L., Hoffenberg E., Sokol R.J., Uhnoo I., Greenberg S.J., Schäkel K., Zhaori G., Fitzgerald J., Chong S., El-Yousef M., Nemeth A., Brown M., Piccoli D., Hyams J., Ruffin D., Rossi T. **(1996)**
Detection of group C rotavirus in infants with extrahepatic biliary atresia
J Infect Dis 174: 8-15

90. **Rosensweig** J.N., Omori M., Page K., Potter C.J., Perlman E.Z., Thorgeirsson S.S., Schwarz K.B. **(1998)**
Transforming growth factor-β1 in plasma and liver of children with liver disease
Pediatr Res 44: 402-409

91. **Saito** T., Shinozaki K., Matsunaga T., Ogawa T., Etoh T., Muramatsu, Kawamura K., Yoshida H., Ohnuma N., Shirasawa H. **(2004)**
Lack of evidence for reovirus infection in tissues from patients with biliary atresia and congenital dilatation of the bile duct
J Hepatol 40: 203-211

92. **Santos** D.V., Souza M.M., Goncalves S.H., Cotta A.C., Melo L.A., Andrade G.M. **(2000)**
Congenital cytomegalovirus infection in a neonatal intensive care unit in brazil evaluated by PCR and association with perinatal aspects
Rev Inst Med Trop Sao Paulo 42: 129-132

93. **Schaffner** F., Popper H. **(1969)**
Cholestasis is the result of hypoactive, hypertropic smooth endoplasmatic reticulum in the hepatocyte
Lancet II: 335

94. **Schier** F., Schier C. **(1988)**
Ätiologie und Pathogenese der extrahepatischen Gallengangsatresie
Ergeb Inn Med Kinderheilkd 57: 37-55

95. **Schreiber** R.A., Kleinman R.E. **(1993)**
Genetics, immunology, and biliary atresia: an opening or a diversion?
J Pediatr Gastroenterol Nutr 16: 111-113

96. **Schrimpf** G. **(2002)**
Gentechnische Methoden: Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor
3. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin

97. **Schweizer** M., Schweizer P. **(1992)**
Die Extrahepatische Gallengangsatresie. Vergleich zwischen operativer und nicht-operativer Therapie
Monatsschr. Kinderheilkd. 140: 422-425

98. **Schweizer** P. **(1974)**
Modell einer extrahepatischen Gallengangsatresie
Z. Kinderchir. 15: 90-94

99. **Schweizer** P. **(1980)**
Die Cholestase im Kindesalter aus chirurgischer Sicht
Monatsschr. Kinderheilkd. 128: 292-301

100. **Schweizer** P., Müller G. **(1984)**
Gallengangsatresie: Cholestase- Syndrome im Neugeborenen- und Säuglingsalter
Bibliothek für Kinderchirurgie
Hippokrates Verlag, Stuttgart

101. **Schweizer** P. **(1986)**
Treatment of extrahepatic bile duct atresia: results and long-term prognosis after hepatic portoenterostomy
Pediatr Surg Int 1:30-36

102. **Schweizer** P., Kerremans J. **(1988)**
Discordant findings in extrahepatic bile duct atresia in 6 sets of twins
Z Kinderchir 43:72-75

103. **Schweizer** P., Lunzmann K. **(1998)**
Extrahepatic bile duct atresia: how efficient is the hepatoporto-enterostomy?
Eur J Pediatr Surg. 8:150-154

104. **Schweizer** P., Kirschner H.J., Schittenhelm C. **(1999)**
Anatomy of the porta hepatis (PH) as rational basis for the hepatoporto-enterostomy (HPE)
Eur J Pediatr Surg. 9: 13-18

105. **Schweizer** P., Schweizer M., Schellinger K., Kirschner H.J., Schittenhelm C. **(2000)**
Prognosis of extrahepatic bile-duct atresia after hepatoportoenterostomy
Pediatr Surg Int 16: 351-355

106. **Schweizer** P., Kirschner H., Schittenhelm C. **(2001)**
Anatomy of the porta hepatis as a basis for extended Hepatoporto-Enterostomy for extrahepatic biliary atresia - a new surgical technique
Eur J Pediatr Surg. 11: 15-18

107. **Schweizer** P., Petersen M., Jeszberger N., Ruck P., Dietz K. **(2003)**
Immunohistochemical and molecular biological investigations regarding the pathogenesis of extrahepatic biliary atresia - part 1: immunohistochemical studies
Eur J Pediatr Surg. 13: 7-15

108. **Silveira** T.R., Salzano F.M., Howard E.R., Mowat A.P. **(1991a)**
Congenital structural abnormalities in biliary atresia: Evidence for etiopathogenic heterogeneity and therapeutic implications
Acta Paediatr Scand 80: 1192-1199

109. **Silveira** T.R., Salzano F.M., Howard E.R., Mowat A.P. **(1991b)**
Extrahepatic biliary atresia and twinning
Brazilian J Med Biol Res 24: 67-71

110. **Silveira** T.R., Salzano F.M., Donaldson P.T., Mieli-Vergani G., Howard E.R., Mowat A.P. **(1993)**
Association between HLA and extrahepatic biliary atresia
J Pediatr Gastroenterol Nutr 16: 114-117

111. **Simon** C. **(1995)**
Pädiatrie: Lehrbuch der Kinderheilkunde und Jugendmedizin
7. Auflage, Schattauer, Stuttgart, New York

112. **Smith** B.M., Laberge J.-M., Schreiber R., Weber A.M., Blanchard H. **(1991)**
Familial biliary atresia in three siblings including twins
J Pediatr Surg. 26: 1331-1333

113. **Sokal** E.M., Melchior M., Cornu C., Vandenbroucke A.-T., Buts J.P., Cohen B.J., Burtonboy G. **(1998)**
Acute parvovirus B19 infection associated with fulminant hepatitis of favourable prognosis in young children
The Lancet 352: 1739-1741

114. **Sokol** R.J., Endo N., Ohara J.I. **(1991)**
Reovirus 3 RNA not detected by polymerase chain reaction in tissues from infants with extrahepatic biliary atresia
Hepatology 14: 125A

115. **Steele** M.I., Marshall C.M., Lloyd R.E., Randolph V.E. **(1995)**
Reovirus 3 not detected by reverse transcriptase-mediated polymerase chain reaction analysis of preserved tissue from infants with cholestatic liver disease
Hepatology 21: 697-702

116. **Strickland** A.D., Shannon K. **(1982)**
Studies in the etiology of extrahepatic biliary atresia: Time-space clustering
J Pediatr 100: 749-753

117. **Strickland** A.D., Shannon K., Coln C.D. **(1985)**
Biliary atresia in two sets of twins
J Pediatr 107: 418-419

118. **Szavay** P.O., Leonhardt J., Czech-Schmid G., Petersen C. **(2002)**
The role of reovirus type 3 infection in an established murin model for biliary atresia
Eur J Pediatr Surg. 12: 248-250

119. **Tan** C.E., Chan V.S., Yong R.Y., Vijayan V., Tan W.L., Fook Chong S.M., Ho J.M.,Cheng H.H. **(1995)**
Distortion in TGF beta 1 peptide immunolocalization in biliary atresia: comparison with the normal pattern in the developing human intrahepatic bile duct system
Pathol Int. 45: 815-824

120. **Tanaka** M., Ishikawa T., Sakaguchi M. **(1993)**
The pathogenesis of biliary atresia in Japan: immunohistochemical study of HBV-associated antigen
Acta Pathol Jpn 43: 360-366

121. **Tanano** H., Hasegawaw T., Kawahara H., Sasaki T., Okada A. **(1999)**
Biliary atresia associated with congenital structural anomalies
J Pediatr Surg. 34: 1687-1690

122. **Tarr** P.I., Haas J.E., Christie D.L. **(1996)**
Biliary atresia, cytomegalovirus, and age at referral
Pediatrics 97: 828-831

123. **Thomson** J.II **(1892)**
On congenital obliteration of the bile-ducts
Edinb Med. J. 37: 604-616

124. **Tolle** T., Roggendorf M. **(1993)**
Die Bedeutung der Polymerase-Kettenreaktion in der Diagnostik von Virusinfektionen
Immun. Infect. 21: 165-170

125. **Tyler** K.L., Sokol R.J., Oberhaus S.M., Le M., Karrer F.M., Narkewicz M.R., Tyson R.W., Murphy J.R., Low R., Brown W.R. **(1998)**
Detection of reovirus RNA in hepatobiliary tissues from patients with extrahepatic biliary atresia and choledochal cysts
Hepatology 27: 1475-1482

126. **Varty** K., Kapila L. **(1993)**
Biliary and anorectal atresia
J Pediatr Surg. 28: 953-954

127. **Vazquez** J., Lopez Gutierrez J.C., Gamez M., Lopez-Santamaria M., Murcia J., Larrauri J., Diaz M.C., Jara P., Tovar J.A. **(1995)**
Biliary atresia and the polysplenia syndrome: its impact on final outcome
J Pediatr Surg. 30: 485-487

128. **Werlin** S.L. **(1981)**
Extrahepatic biliary atresia in one of twins
Acta Paediatr Scand 70: 943-944

129. **Wilson** G.A., Morrison L.A., Fields B.N. **(1994)**
Association of the reovirus S1 gene serotype 3-induced biliary atresia in mice
J Virol 68: 6458-6465

130. **Witzleben** C.L. **(1976)**
Editorial: Etiology(ies) of infantile obstructive cholangiopathy
J Pediatr 88: 909-910

131. **Witzleben** C.L., Buck B.E., Schnaufer L., Brzosko W.J. **(1978)**
Studies on the pathogenesis of biliary atresia
Lab Invest 38: 525-532

132. **Yoon** P.W, Bresee J.S., Olney R.S., James L.M., Khoury M.J. **(1997)**
Epidemiology of biliary atresia: A population-based study
Pediatrics 99: 376-382

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. P. Schweizer. Ihm verdanke ich die Überlassung des Themas und die Möglichkeit diese Dissertation anfertigen zu können. Vor allem möchte ich mich für seine hervorragende Betreuung, seine Geduld und seine unermüdliche Unterstützung bei der Erstellung der Arbeit bedanken.

Herrn Dr. med. A. Guglielmetti danke ich für die Unterstützung bei der methodischen Durchführung im Labor und seine wertvollen Ratschläge.

Sehr dankbar bin ich Herrn Stefan Reichert für seine hilfreiche und umfassende Unterstützung.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Judith Vanessa Junginger
Geburtsdatum	22.03.1978
Geburtsort	Tübingen
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch
Eltern	Irmgard Junginger Dr. med. Wilfried Junginger

Schulausbildung

1984-1988	Grundschule WHO, Tübingen
1988-1997	Geschwister-Scholl-Schule, Tübingen
1997	Abschluss der Allgemeinen Hochschulreife

Berufausbildung

10/1997	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
01.09.1999	Ärztliche Vorprüfung
2000-2002	Famulaturen in Kinderchirurgie sowie Gynäkologie an der Universitätsklinik Tübingen, Praxisfamulatur in einer Allgemeinmedizinische Praxis in Stuttgart sowie eine Famulatur in Anästhesie und Intensivmedizin in der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik Tübingen
22.03.2001	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
28.03.2003	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04/2003-03/2004	Praktisches Jahr 1. Chirurgie: Allgemeinchirurgie und Kinderchirurgie an der Universitätsklinik Tübingen 2. Innere Medizin: Kantonsspital Luzern/ Schweiz 3. Gynäkologie: Universitäts-Frauenklinik Tübingen
07.05.2004	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung