

Aus dem Heinrich-Pette-Institut für experimentelle Virologie und Immunologie Hamburg

PD. Dr. Martina Sterneck

Sequenzanalysen von Hepatitis-B-Virusvarianten  
bei fulminanter Hepatitis B und Hepatitis D

## **DISSERTATION**

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg

vorgelegt von

Jochen Gerlach

aus Halle/Saale

Hamburg, 1999

Angenommen von dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg am: 14.12.1999

Gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität Hamburg

Sprecher: Prof. Dr. H.-P. Leichtweiß

Referent: Priv. Doz. Dr. M. Sterneck

Koreferent: Prof. Dr. R. Laufs

## Inhaltsverzeichnis

<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>6</b>
<b>1.1 Die Hepatitis-B-Virus (HBV)-Infektion unter besonderer Berücksichtigung der unterschiedlichen Verläufe</b>	<b>6</b>
<b>1.2 Molekularbiologische und immunologische Aspekte des HBV</b>	<b>8</b>
1.2.1 Historische Entwicklung	8
1.2.2 Molekularbiologische Eigenschaften des Hepatitis B Virus (HBV)	8
1.2.3 Immunologie der HBV-Infektion	12
<b>1.3 Molekularbiologische und immunologische Aspekte des Hepatitis D Virus (HDV)</b>	<b>14</b>
1.3.1 Historische Entwicklung	14
1.3.2 Molekularbiologische Eigenschaften des HDV	14
1.3.3 Immunologie der HDV-Infektion	16
<b>1.4 Pathogenetische Modelle der fulminanten Hepatitis B</b>	<b>17</b>
1.4.1 Eine erhöhte virale Replikationsfähigkeit als pathogenetisches Modell	18
1.4.2 Zytopathische virale Eigenschaften als möglicher Pathomechanismus	18
1.4.3 Veränderte virale Immunogenität als möglicher Pathomechanismus	18
<b>1.5 Assoziationen von HBV-Varianten mit einem fulminanten Krankheitsverlauf</b>	<b>20</b>
1.5.1 Die Precore-Stopkodonmutation in Position 1896	20
1.5.2 Mutationen in der Core-Promotor-Region	21
<b>1.6 Analyse kompletter HBV-Genome von Patienten mit fulminanter Hepatitis B/D</b>	<b>21</b>
<b>1.7 Problemstellung</b>	<b>22</b>
<b>1.8 Ziel der Arbeit</b>	<b>23</b>
<b>2 MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>24</b>
<b>2.1 Patienten</b>	<b>24</b>
<b>2.2 Serologische Marker der Hepatitis-B/D-Virus-Infektionen</b>	<b>24</b>

<b>2.3 DNA-Isolierung aus dem Serum</b>	<b>25</b>
<b>2.4 Amplifikation der DNA</b>	<b>25</b>
<b>2.5 Herstellung von Einzelstrang-DNA</b>	<b>29</b>
<b>2.6 Sequenzierung des Virusgenoms</b>	<b>30</b>
<b>2.7 Vergleichende Sequenzanalyse</b>	<b>31</b>
<b>3 ERGEBNISSE</b>	<b>33</b>
<b>3.1 Veränderungen der HBV-Population bei fulminanter Hepatitis B/D</b>	<b>33</b>
3.1.1 Vergleich der Nukleinsäuresequenz	33
3.1.2 Vergleich der Aminosäuresequenz	42
<b>3.2 Veränderungen der HBV-Population bei Patienten mit fulminanter HBV/HDV-Reinfektion nach Lebertransplantation</b>	<b>47</b>
3.2.1 Veränderungen der HBV-Nukleotidsequenz im Verlauf	47
3.2.2 Veränderungen der Aminosäuresequenz im Verlauf	48
3.2.3 Hepatische Expression von HBV- und HDV-Antigenen	49
<b>3.3 HBV-Varianten bei fulminanten Hepatitiden mit und ohne HDV-Koinfektion</b>	<b>50</b>
<b>4 DISKUSSION</b>	<b>51</b>
<b>4.1 Ziel dieser Studie</b>	<b>51</b>
<b>4.2 Originalität der vorliegenden Arbeit</b>	<b>52</b>
<b>4.3 Methodische Aspekte</b>	<b>53</b>
<b>4.4 Mutationen im HBV-Genom von 6 Patienten mit FHB/D</b>	<b>54</b>
4.4.1 Allgemeine Aspekte von HBV-Mutanten	54
<b>4.5 HBeAg-defekte Virusvarianten bei FHB/D</b>	<b>54</b>
4.5.1 Hypothesen zur Bedeutung von HBeAg für den fulminanten Verlauf	56
4.5.2 Nukleotidveränderungen in der Core-Promotor-Region	57
4.5.3 Weitere Mutationen in Bereichen mit transkriptionsregulierenden Eigenschaften	58

4.5.4 Die Untersuchung kompletter HBV-Genome bei FHB/D	59
4.5.5 Der Einfluß einer HDV-Koinfektion auf die HBV-Population	60
<b>4.6 Virusvarianten mit erhöhter Replikationsrate</b>	<b>61</b>
<b>4.7 Zusammenfassender Überblick über die von uns nachgewiesenen Mutationen</b>	<b>63</b>
<b>4.8 Vergleich von kompletten HBV-Genomen bei chronischer und bei fulminanter Hepatitis B/D</b>	<b>64</b>
4.8.1 Virusvarianten mit einem Pre-S2-Defekt	65
4.8.2 Virusvarianten mit einem HBeAg-Defekt	66
4.8.3 Escape-Varianten unter Anti-HBs-Hyperimmunglobulintherapie	67
4.8.4 Die Immunabwehr als bedeutender Faktor bei der Entwicklung einer fulminanten Hepatitis nach Lebertransplantation	67
4.8.5 Direkt zytopathische Effekte viraler Proteine bei der Entwicklung einer fulminanten Hepatitis	68
4.8.6 Zusammenfassender Überblick über die Virusvarianten bei fulminanter Reinfektion nach Lebertransplantation	69
<b>4.9 Bedeutung der erhobenen Befunde und Schlußfolgerungen neuer Aspekte</b>	<b>70</b>
<b>5 ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>72</b>
<b>6 LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>74</b>
<b>7 DANKSAGUNG</b>	<b>93</b>
<b>8 LEBENSLAUF</b>	<b>94</b>

## **1 Einleitung**

### **1.1 Die Hepatitis-B-Virus (HBV)-Infektion unter besonderer Berücksichtigung der unterschiedlichen Verläufe**

Die Hepatitis-B-Virus (HBV)-Infektion gehört mit weltweit über 200 Millionen Virusträgern zu den häufigsten Infektionskrankheiten. In Endemiegebieten wie Asien und Afrika sind teilweise über 10% der Bevölkerung betroffen. Im Mittelmeerraum beträgt die Hepatitis-B-Surface-Antigen (HBs-Ag)-Trägerrate 2-5%, in Nordeuropa und Nordamerika 0,2-1%. Die Übertragung der Hepatitis B erfolgt perinatal, parenteral oder sexuell.

Die Hepatitis B variiert in ihrer klinischen Präsentation erheblich. Man unterscheidet inapparente (ca. 65% der Fälle), akute (ca. 25% d.F.), chronische (ca. 10% d.F.) und fulminante (ca. 1% d.F.) Verläufe. Die akut verlaufende Hepatitis B ist durch Allgemeinsymptome, wie Müdigkeit, Gelenksbeschwerden und Fieber, gekennzeichnet. 70 % der Patienten entwickeln einen Ikterus. Das histologische Bild wird durch ödematös aufgelockerte, lymphohistiozytär infiltrierte Portalfelder sowie disseminierte Einzelzellnekrosen, sogenannte Councilman-bodies, bestimmt. Die fulminante Hepatitis, die in ca. 1% der Fälle auftritt, weist eine Letalität von etwa 80% auf. Definitionsgemäß bezeichnet man nach Trey und Davidson einen Hepatitisverlauf als fulminant, wenn sich innerhalb von acht Wochen nach Auftreten eines Ikterus` ein schwerer Leberschaden mit hepatischer Enzephalopathie ausbildet (Trey et Davidson, 1979). Das histologische Bild wird hierbei von massiven multilobulären Lebernekrosen mit großem Parenchymverlust beherrscht. Das Retikulumfasergestützte ist über große Areale nur noch mit Zellschutt angefüllt. Lediglich die Portalfelder sind noch erhalten und werden von wenigen Lymphozyten infiltriert. Periportal befinden sich noch kleine Gruppen überlebender Hepatozyten (Riede und Schaefer, 1993).

Eine nicht erfolgreiche Elimination von HBV führt zur Viruspersistenz. Diese kann klinisch stumm und ohne histologische Veränderungen sein (HBsAg-Trägerstatus) oder sich in einer chronischen Verlaufsform der Hepatitis B äußern. Ein HBsAg-Trägerstatus kann in eine chronische Hepatitis B übergehen, wobei vermutet wird, daß dies durch die Selektion bestimmter Virusvarianten bedingt ist. Dabei wird, je nach histologischer

Entzündungsaktivität, in chronisch-persistierende Hepatitis und chronisch-aggressive Hepatitis unterschieden. Während die chronisch-persistierende Form durch die scharf auf die Portalfelder begrenzten entzündlichen lymphohistiozytären Infiltrate gekennzeichnet wird, ist die chronisch-aggressive Form von einer erheblichen Entzündung der Portalfelder in Verbindung mit sog. Mottenfraßnekrosen charakterisiert. Die chronische Hepatitis kann zu einem zirrhotischen Umbau der Leber führen. Sowohl bei Patienten mit HBsAg-Trägerstatus als auch bei Patienten mit chronischer HBV-Infektion besteht das Risiko (10-15%), daß sich ein hepatozelluläres Karzinom entwickelt.

Auch die Hepatitis-D-Virus (HDV)-Infektion tritt weltweit auf. Voraussetzung für die Hepatitis-D-Virus-Infektion ist das Vorliegen einer HBV-Infektion, da das HDV selbst replikationsinkompetent ist und zur Vermehrung das Hepatitis-B-Virus benötigt. Daher ähnelt das epidemiologische Verteilungsmuster dem der HBV-Infektion. Die Hepatitis D tritt gehäuft im Mittelmeerraum auf, während sie in Deutschland eher selten ist und meist auf Risikogruppen beschränkt bleibt. Der Übertragungsmodus ist mit dem der Hepatitis B identisch. Man unterscheidet die Simultaninfektion, bei der das HDV gleichzeitig mit dem HBV übertragen wird, von der Superinfektion, bei der ein HBsAg-Träger mit dem HDV infiziert wird. Die Hepatitis-B/D-Koinfektion ähnelt vom klinischen Verlauf her der Hepatitis B, zeigt jedoch in einem höheren Prozentsatz (etwa 2%) einen fulminanten Verlauf (Smedile et al., 1982; Kroogsgaard et al., 1988). Auf der anderen Seite scheint die Anwesenheit des HDV aber die Letalität einer fulminanten Hepatitis zu verringern (Saracco et al., 1988). HDV-Superinfektionen verlaufen in der Mehrzahl der Fälle chronisch-aggressiv. Die Seroprävalenz von HDV bei Patienten mit akuter, chronischer und fulminanter Hepatitis ist drei- bis zehnmal höher als bei asymptomatischen HBV-Trägern (Hadler et al., 1991).

## **1.2 Molekularbiologische und immunologische Aspekte des HBV**

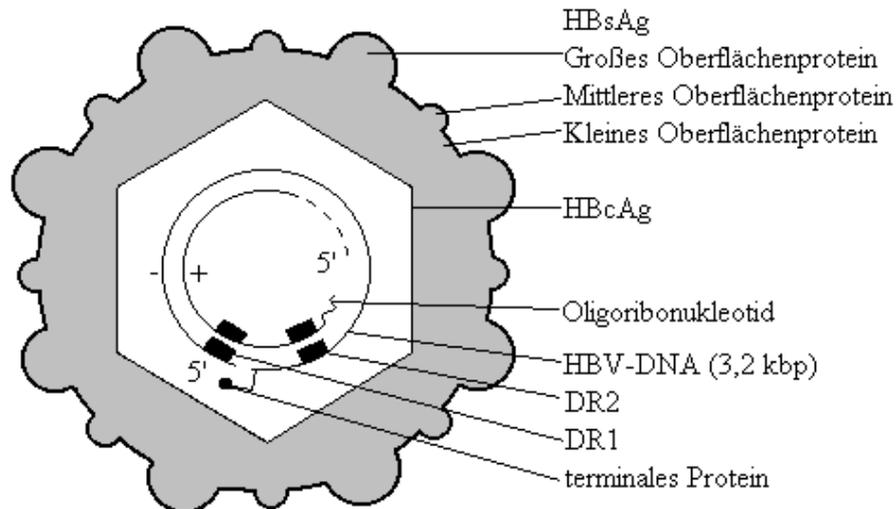
### **1.2.1 Historische Entwicklung**

Die Entdeckung des sogenannten Australia-Antigens leitete die molekularbiologische Charakterisierung des HBV ein (Blumberg et al., 1965). Die Arbeitsgruppe um Blumberg fand deutliche Präzipitatlinien bei der Ouchterlony-Doppeldiffusion zwischen dem Serum eines australischen Ureinwohners und dem hämatologisch erkrankter Patienten, die zahlreiche Bluttransfusionen erhalten hatten. So wurde ursprünglich vermutet, daß ein Zusammenhang zwischen dem neu entdeckten Antigen und der Entwicklung einer akuten Leukämie bestünde.

Fortgesetzt wurde diese Entwicklung durch die Beschreibung des sogenannten Dane-Partikels (Dane et al., 1970). Hierbei wurden Sera von Patienten mit einer als „Australia-Antigen-positiv“ bezeichneten Hepatitis untersucht und elektronenmikroskopisch aufgearbeitet. Neben den bereits beschriebenen 22 nm-Partikeln konnten darüber hinaus 42 nm durchmessende Partikel dargestellt werden. Diese zeichneten sich gegenüber den sehr viel kleineren Partikeln durch eine weitgehende morphologische Uniformität aus und hatten zusätzlich eine gewisse Ähnlichkeit mit bereits bekannten Viren. In den elektronenmikroskopischen Aufnahmen konnte die Arbeitsgruppe um Dane neben der Hülle auch bereits eine Nukleokapsidstruktur erkennen. Es folgten die Charakterisierung der HBV-DNA (Robinson et al., 1974) sowie die Aufdeckung der hepadnaviralen Replikationsmechanismen (Summers et Mason, 1982).

### **1.2.2 Molekularbiologische Eigenschaften des Hepatitis B Virus (HBV)**

Das HBV gehört zusammen mit einigen tierischen Hepatitisviren zur Familie der Hepadnaviridae. Es besteht aus einer im Durchmesser 42 nm großen äußeren Hülle, die aus den Oberflächenproteinen (Hepatitis-B-Antigen, HBsAg) zusammengesetzt ist, die in eine Lipidhülle integriert sind. Im Inneren der Hülle findet sich eine Nukleokapsidstruktur, die aus den Core-Proteinen (HBcAg) zusammengesetzt ist. Das Nukleokapsid enthält das virale DNA-Genom mit einer Länge von etwa 3200 Basenpaaren und die damit assoziierte virale DNA-Polymerase / reverse Transkriptase.



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung der HBV-Struktur (entlehnt bei Blum et al., 1993)

Das HBV-Genom ist mit seinen 3200 Basenpaaren eines der kleinsten unter den DNA-Viren und dementsprechend sehr kompakt aufgebaut. Es enthält vier offene, einander überlappende Leseraster: Das Core-Gen (C-Gen) kodiert das Hepatitis-B-e-Antigen (HBeAg) und das Nukleokapsidprotein (Core-Protein), das Surface-Gen (S-Gen) kodiert drei Hüllproteine (großes, mittleres und kleines Oberflächenprotein), das Polymerase-Gen (P-Gen) kodiert die virale Polymerase mit ihren verschiedenen funktionellen Domänen und das X-Gen kodiert das transaktivierende X-Protein. Das Genom enthält darüber hinaus eine Vielzahl von Sequenzen, denen eine regulierende Bedeutung im Rahmen der Transkription, Replikation und Assembly zugeschrieben wird.

Das HBV-Genom wird asymmetrisch über ein RNA-Intermediat mit Hilfe einer reversen Transkriptase repliziert: Die nur unvollständig doppelsträngige DNA des Virions wird post infectionem im Kern des Hepatozyten komplettiert und zirkulär kovalent geschlossen (ccc-DNA). Mit der hepatozellulären RNA-Polymerase II wird eine 3,5 kb lange RNA synthetisiert, die als Prägenom/C-mRNA bezeichnet wird. Als Matrize hierfür dient der Minusstrang der ccc-DNA. Die mRNA wird sowohl zur Synthese von Core- und Pol-Proteinen als auch als Matrize für die DNA-Minusstrang-Synthese genutzt. Dieser Prozeß wird von der viruskodierten Reversen Transkriptase katalysiert. Die Initiation erfolgt innerhalb einer 11 bp langen, repetitiven DNA-Sequenz (DR1, DR=direkt repeats). Während der DNA-Minusstrang-Synthese wird das Prägenom bis auf die letzten 18 Basen am 5'-Ende

durch die viruskodierte RNase abgebaut. Durch Umlagerung dieses Oligonukleotids an die DR2-Sequenz des DNA-Minusstranges entsteht der Primer für die DNA-Plusstrang-Synthese. Hierbei erfolgt die Synthese über die DNA-abhängige DNA-Polymerase des Pol-Proteines. Als Matrize dient der DNA-Minusstrang. Eine vollständige Synthese des DNA-Plusstranges ist für die Verpackung und Sekretion des Virions nicht notwendig.

Im offenen Leseraster des C-Gens befinden sich zwei Initiationskodons im identischen Leseraster. Dadurch wird dieser Bereich in die Precore- sowie in die Core-Region geteilt (Galibert et al., 1979). Startet die Translation an der ersten Initiation, so wird das 25-kD-Precore-Protein synthetisiert. Nach posttranslationaler Modifikation wird es als HBeAg von der Zelle sezerniert. Die Expression der Core-Region, d.h. Translationsstart am zweiten Initiationskodon, führt zur Synthese des 21-kD-Core-Protein, dem Nukleokapsidprotein (Miyanojara et al., 1986).

Der Leseraster des S-Genes beherbergt drei Initiationskodons im gleichen Leseraster. Dementsprechend unterscheidet man die Pre-S1-, die Pre-S2- und die S-Region. Diese kodieren die drei Hüllproteine des HBV: Je nach Translationsstart entstehen das kleine (small surface protein), das mittlere (middle surface protein, Pre-S2-Protein) bzw. das große Oberflächenprotein (large surface protein, Pre-S1-Protein). Neben der Funktion für die Struktur und den Aufbau des HBV besitzen diese Proteine vermutlich noch zahlreiche andere Aufgaben. So trägt das Pre-S1-Protein an seinem Aminoterminus eine Bindungsstelle für den hepatozellulären Rezeptor (Neurath et al., 1986; Pontisso et al., 1989) und erscheint damit wichtig für die Infektiosität des HBV zu sein (Bruss et al., 1991). Das Pre-S2-Protein vermag, humanes Serumalbumin zu binden, und ist über diesen Mechanismus eventuell bei der hepatozytenspezifischen Infektion bedeutungsvoll (Krone et al., 1990). Das Hepatitis-B-Surface-Antigen (HBsAg) trägt eine stark immunogene, gruppenspezifische Determinante „a“, die allen Subtypen gemeinsam ist, sowie zwei zusätzliche Subtypdeterminanten, „d“ oder „y“ bzw. „w“ oder „r“. Damit resultieren vier Hauptsubtypen des HBsAg (adw, adr, ayw und ayr) (Bancroft et al., 1972).

Das P-Gen kodiert ein Protein mit einem kalkulierten Molekulargewicht von 93,2 kD. Das Protein verfügt über folgende funktionelle Domänen: Das terminale Protein, dem eine Initiationsfunktion zugeschrieben wird, die Spacer-Region, die DNA-Polymerase/Reverse

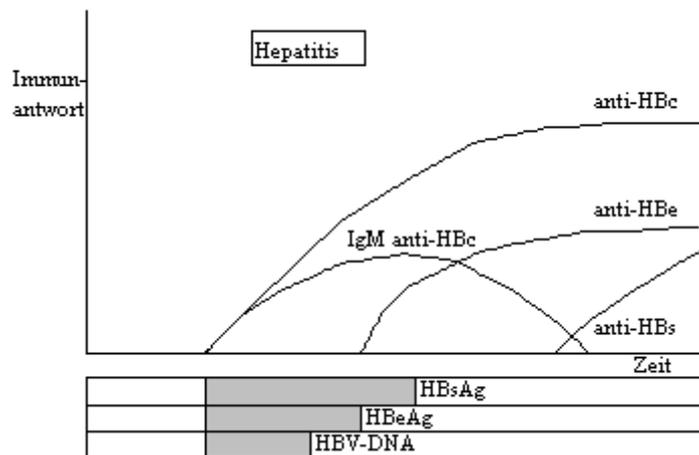
Transkriptase und die RNase H, die den Abbau der prägenomischen RNA bewirkt. Darüber hinaus erfüllt die Polymerase eine wichtige Funktion im Rahmen des Virion-Assembly (Bartenschlager und Schaller, 1992).

Die Funktion des X-Genes bzw. seines Produktes HBxAg ist nicht vollständig geklärt. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß es einen aktivierenden Einfluß auf die Transkription des HBV sowie anderer viraler Sequenzen und auf eine Vielzahl zellulärer Gene ausübt (Kekule et al., 1993). Die pathobiochemische Bedeutung dieser Fähigkeit ist weitgehend unverstanden. Das HBxAg scheint *in vitro* nicht notwendig für die HBV-Replikation und -Genexpression zu sein (Blum et al., 1992). Ergebnisse im Waldmurmeltiermodell (Woodchuck-Hepatitis-Virus) deuten auf eine Notwendigkeit des X-Genes im Rahmen der Infektion hin (Chen et al., 1992 und 1993). Darüber hinaus spielt das X-Gen vermutlich eine Rolle bei der Entstehung des hepatozellulären Karzinoms. So wurden integrierte X-Gensequenzen in Karzinomzellen gefunden (Takada et al., 1990 und Wollersheim et al., 1987).

Neben Regionen, die Proteine kodieren, wurden im HBV-Genom auch regulatorische Elemente identifiziert (Yen, 1993). Die vier Promotoren, d.h. X-Promotor (XP), Core Promotor (CP), Surface Promotor I (SP I) und Surface Promotor II (SP II), sowie die beiden Enhancer I und II (ENH I und ENH II) sind innerhalb der vier offenen Leserahmen lokalisiert. Diese Elemente haben eine herausragende Bedeutung für die biologischen Eigenschaften des HBV. So steuern die Promotoren SP I (Nukleotidposition 2711-2822) und SP II (Nukleotidposition 3002-3182) die Expression und Sekretion der Oberflächenproteine (Chang et al., 1989; Raney et al., 1989). Im Enhancer I X-Promotor (ENH I-XP, Nukleotidposition 963-1354) sowie im Enhancer II-Core Promotor (ENH II-CP, Nukleotidposition 1591-1850) wird die Virusreplikation und die Expression des HBeAg, des X- und des Core-Proteins reguliert (Treinin et al., 1987; Lopez-Cabrera et al., 1990; Yee et al., 1989). Innerhalb dieser Bereiche wurden verschiedene Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren identifiziert (Raney et al., 1997).

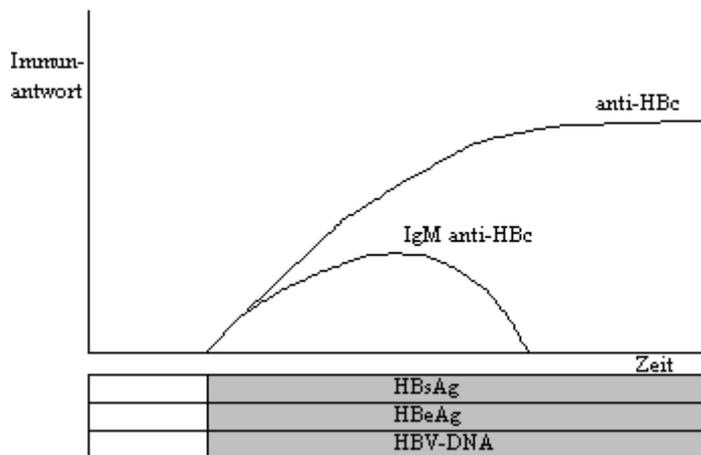
### 1.2.3 Immunologie der HBV-Infektion

Die Diagnose einer akuten Hepatitis B basiert auf dem Vorliegen von Antikörpern der Klasse IgM gegen die Core-Region (IgM-anti-HBc). Der zusätzliche Befund einer HBsAg-Positivität ist darüber hinaus wegweisend, kann jedoch in 10% fehlen. In der Regel sind jedoch bereits vor Ausbruch der klinischen Erkrankung HBsAg, HBeAg und HBV-DNA nachweisbar. Sofern die Hepatitis B ausheilt, erscheinen nach dem ersten Antikörper anti-HBc die Antikörper anti-HBe und anschließend anti-HBs im Serum. IgM-anti-HBc können bis zu 12 Monate nach der Erkrankung im Serum detektierbar bleiben. Anti-HBs und anti-HBc sind nach einer ausgeheilten Infektion in der Regel lebenslang nachweisbar (siehe Abbildung 2).



**Abbildung 2:** Schematische Abbildung über die Immunologie einer akuten HBV-Infektion (entlehnt bei Classen, Diehl, Kochsiek, 1991)

Bei einer chronisch verlaufenden HBV-Infektion persistiert das HBsAg länger als sechs Monate (siehe Abbildung 3), Anti-HBs wird nicht gebildet.



**Abbildung 3:** Schematische Abbildung über die Immunologie einer chronischen HBV-Infektion (entlehnt bei Classen, Diehl, Kochsiek, 1991)

Alle Hüllproteine sind Ziele sowohl der B- als auch der T-Zell-Erkennung. Entsprechende Epitope finden sich im Pre-S- und im S-Bereich. Die wichtigste Antigen determinante des HBsAg ist die sogenannte „a“-Determinante. Dieses Epitop beinhaltet die Aminosäuren 124-147 des S-Proteins und scheint in seiner Erkennbarkeit stark konformationsabhängig zu sein. Es wird vermutet, daß diese Region eine Doppelschleife bildet, die durch Disulfidbrücken zwischen den Cysteinen stabilisiert wird. Veränderungen dieser Bindungsverhältnisse führen zu einem Verlust dieses B-Zell-Epitopes (Antoni et al., 1994; Ashton-Rickart et al., 1989; Mangold et al., 1993). Neben diesen B-Zell-Epitopen wurden im HBsAg auch Bereiche als zytotoxische-T-Lymphozyten (CTL)-Epitope identifiziert (Bertoletti et al., 1994).

Für das HBeAg sind zwei wichtige B-Zell-Epitope beschrieben, zum einen im Aminosäurenbereich 76-89, zum anderen in dem Bereich der Aminosäuren 126-135 (Imai et al., 1982; Ferns und Tedder, 1984). Das bekannteste B-Zell-Epitop des HBcAg befindet sich im Aminosäurenbereich 74-89 (Salfeld et al., 1989). Darüber hinaus sind jedoch noch weitere HBcAg-Epitope existent (Schödel et al., 1992). Die MHC-II-restringierte T-Helferzellantwort zielt auf ein immundominantes Epitop im Aminosäurenbereich 50-69, seltener auf Epitope der Aminosäurenbereiche 1-20 sowie 117-131 (Ferrari et al., 1991). Eine entscheidende Bedeutung wird jedoch der MHC-I-vermittelten T-Zell-Zytotoxizität zugeschrieben. Ein CTL-Epitop, welches im Zusammenhang mit HLA-A2 spezifisch präsentiert wird, liegt im Aminosäurenbereich 18-27 der Core-Region (Penna et al., 1991; Bertoletti et al., 1992).

## **1.3 Molekularbiologische und immunologische Aspekte des Hepatitis D Virus (HDV)**

### **1.3.1 Historische Entwicklung**

Das HDV wurde 1977 im Rahmen der Untersuchung von Leberbiopsien HBsAg-positiver Patienten mit chronischer Hepatitis entdeckt (Rizzetto et al., 1977). Rizzetto stellte fest, daß markierte humane Immunglobuline anti-HBc-positiver Serumproben nicht nur mit nachweislich HBcAg enthaltenden Lebergeweben reagierten, sondern auch mit solchen, die kein HBcAg enthielten. Weitere Studien zeigten, daß die neue Antikörperfraktion weder für zelluläre noch für Hepatitis-B-virale Antigene spezifisch war. Trotz dieser Tatsache konnten die nun als Anti-delta Antikörper (anti-HD) bezeichneten Immunglobuline nur in HBsAg-positiven Sera detektiert werden. Die Entwicklung eines Radioimmunoassays und die nachfolgenden Untersuchungen von Sera aus Italien, Japan und den USA zeigten eine enge Assoziation von anti-HD mit der HBV-Infektion (Rizzetto et al., 1979, 1980). Tierexperimentelle Transmissionsstudien identifizierten das Delta-Agens als ein separates defektes Virus, welches das HBV benötigt, um eine Infektion verursachen zu können (Rizzetto et al., 1980). Diese Untersuchungen charakterisierten zugleich die klinischen Ereignisse der Delta-Ko- und Superinfektion.

In den darauffolgenden Jahren erfolgte ein bedeutender Fortschritt im molekularbiologischen, immunologischen und klinischen Verständnis des HDV.

### **1.3.2 Molekularbiologische Eigenschaften des HDV**

Das HDV ist ein kleines RNA-Virus, das aus einem im Durchmesser 36nm großen sphärischen Partikel mit einer Dichte von 1,25 g/ml besteht (Bonino et al., 1984). Das HDV-Partikel enthält eine einzelsträngige kovalent geschlossene RNA von knapp 1700 Nukleotiden Länge. Die Virushülle des HDV besteht aus Oberflächenantigenen des Helfervirus HBV. Während die Relation der Pre-S1-, Pre-S2- und S-Proteine beim infektiösen HBV-Partikel 1:1:4 (Heermann et al., 1984; s.o.) beträgt, weisen diese Proteine in der HDV-Hülle ein Verhältnis von 1:5:95 auf (Bonino et al., 1986). Damit ähnelt diese HDV-Hülle den nicht infektiösen subviralen Partikeln des HBV, die gewöhnlich in großem Überschuß im Serum gefunden werden können.

Die etwa 1700 Nukleotide enthaltende RNA des HDV-Genomes ist mit einer Basenpaarung von bis zu 70% hochgradig selbstkomplementär (Wang et al., 1986). Das HDV-Genom zeigt Ähnlichkeiten mit denen einiger Pflanzenviren.

Die Analyse der genomischen Sequenz hinsichtlich ihres kodierenden Potentials ergab verschiedene offene Leserahmen sowohl des genomischen als auch des antigenomischen Stranges. Für einen offenen Leserahmen, der z.T. hochkonserviert ist, wurde gezeigt, daß er die Information für das Delta-Antigen (HDAg) trägt. Diese Region befindet sich auf dem antigenomischen Strang und reicht von Position 1598 bis 1010 für die kleine Form des HDAg bzw. bis 953 für die große Form (Wang et al., 1986).

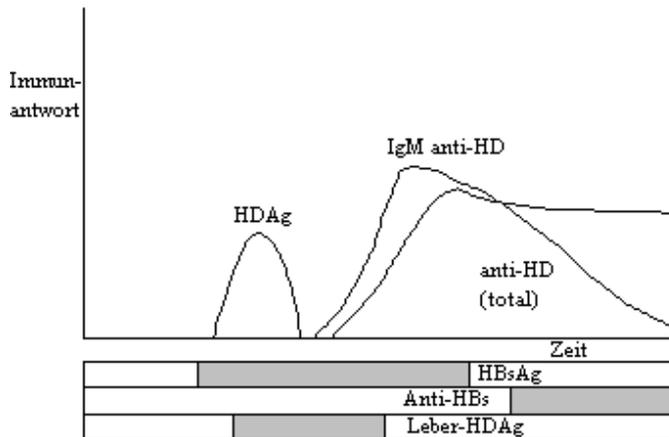


**Abbildung 4:** Antigenomische HDV-RNA mit der Antigen-kodierenden Region (modifiziert nach Polish et al., 1993)

Das HDAg, dessen beide Formen Molekulargewichte von 24 kD bzw. 27 kD aufweisen, ist ein basisches, ein- oder mehrfach phosphoryliertes Protein. Es akkumuliert in den Kernen infizierter Hepatozyten und kann als RNA-bindendes Protein fungieren. Während die kleine Form des HDAg wichtig für die Replikation zu sein scheint, schreibt man der großen Form eine Bedeutung beim Zusammenbau des HDV zu (M.-F. Chang et al., 1988, und F.-L. Chang et al., 1991).

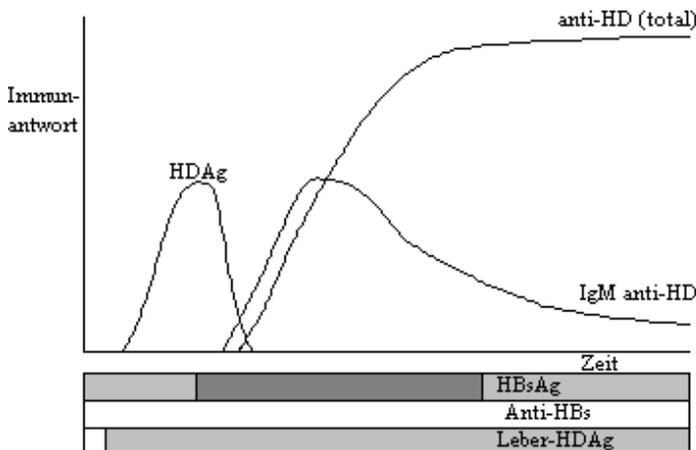
### 1.3.3 Immunologie der HDV-Infektion

Die führenden serologischen Marker der HDV-Infektion sind das HDV-Antigen sowie der Antikörper IgM-anti-HDV. Die Hepatitis D kann als Simultan- bzw. Koinfektion oder als Superinfektion auftreten. Für erstere ist der Nachweis von IgM-anti-HBc (neben IgM-anti-delta und HDAg) typisch.



**Abbildung 5:** Schematische Darstellung der Immunologie einer HDV-Koinfektion (entlehnt bei Polish et al., 1993)

Bei einer HDV-Superinfektion, also einer HDV-Infektion eines chronischen HBsAg-Trägers, ist kein IgM-anti-HBc nachweisbar, die Antikörper IgM-anti-HD bzw. anti-HD und das HDAg können jedoch im Serum gefunden werden.



**Abbildung 6:** Schematische Darstellung der Immunologie einer HDV-Superinfektion (entlehnt bei Polish et al., 1993)

## 1.4 Pathogenetische Modelle der fulminanten Hepatitis B

Für die Pathogenese der fulminanten Hepatitis B sind prinzipiell zwei verschiedene Hypothesen denkbar: Zum einen könnte eine bestimmte Prädisposition des Wirtes und zum anderen die Infektion mit besonders virulenten Virusvarianten den fulminanten Verlauf bedingen. Schließlich ist auch die Kombination aus beiden genannten Faktoren als Voraussetzung für einen fulminanten Infektionsverlauf denkbar. Folgende Aspekte sprechen jedoch für die pathogenetische Bedeutung bestimmter HBV-Varianten:

- In der Literatur sind mehrere epidemische Ausbrüche fulminanter HBV-Infektionen beschrieben worden, die in allen Fällen auf einen einzelnen Überträger als Infektionsquelle zurückgeführt werden konnten (Liang et al., 1991; Oren et al., 1989; Ogata et al., 1993). Bei einer dieser Untersuchungen wurden Schimpansen mit der isolierten Viruspopulation infiziert, worauf sie eine für diese Spezies ungewöhnlich schwere Hepatitis B entwickelten (Ogata et al., 1993).
- In der Literatur wird keine Assoziation zwischen einer FHB und bestimmten MHC-Klasse I oder II des Wirtes beschrieben.
- Nukleotidsequenzanalysen einiger Regionen des HBV-Genoms ließen Assoziationen zwischen dem Auftreten bestimmter Mutationen und einem fulminanten Infektionsverlauf erkennen.

Durch welche Genomveränderungen die biologischen Eigenschaften des HBV dahingehend modifiziert werden, daß eine erhöhte Pathogenität und damit ein fulminanter Infektionsverlauf resultiert, ist bisher unbekannt. Vermutet wird, daß folgende phänotypischen Charakteristika entscheidend sein könnten:

- Varianten mit einer erhöhten Replikationsfähigkeit
- Varianten mit zytopathischen Eigenschaften
- Varianten mit einer veränderten Immunogenität.

#### **1.4.1 Eine erhöhte virale Replikationsfähigkeit als pathogenetisches Modell**

Varianten, die im Vergleich zum Wildtypvirus eine erhöhte Replikationskompetenz aufweisen, könnten innerhalb kurzer Zeit zahlreiche Hepatozyten infizieren. Im Rahmen der sich anschließenden Immunantwort des Wirtes würde ein ausgedehnter Leberschaden resultieren. Darüber hinaus ist durch die hohe Replikationsrate eine intrazelluläre Akkumulation viraler Proteine mit einem direkt zytopathischen Effekt möglich. Zusätzlich könnten Hepatozyten mit einer intrazellulären Anreicherung viraler Proteine für den Angriff des Immunsystems besonders sensibel sein. Im transgenen Mausmodell führte die Akkumulation von S-Protein zur Sensibilisierung der Hepatozyten gegenüber einem Zytokin-induzierten Zelltod (Chisari et al., 1987). In vitro konnte ein direkt zytotoxischer Effekt einer intrazellulären Akkumulation des Core-Proteins für Hepatomazellen gezeigt werden (Roingeard et al., 1990).

#### **1.4.2 Zytopathische virale Eigenschaften als möglicher Pathomechanismus**

Neben hochreplizierenden Varianten könnten auch Mutanten, die eine Überexpression oder einen Sekretionsblock viraler Proteine aufweisen, eine hepatozelluläre Akkumulation dieser Proteine bewirken. So scheint die Retention von HBsAg, von Core Protein und von X-Protein zytopathisch zu wirken (Chisari et al., 1987; Roingeard et al., 1990).

#### **1.4.3 Veränderte virale Immunogenität als möglicher Pathomechanismus**

Varianten mit Mutationen in Bereichen wichtiger immunogener Epitope könnten möglicherweise eine veränderte Art und Intensität der Immunantwort bewirken (Chisari et al., 1992). Zum einen ist eine gesteigerte Immunogenität dieser Varianten und damit eine stärkere Aktivierung zytotoxischer T-Lymphozyten (CTL), die zu einer beschleunigten Zerstörung des Leberparenchyms führt, vorstellbar (Thomas et al., 1991). Zum anderen könnten Mutationen in Bereichen von Bindungsstellen neutralisierender Antikörper oder von Erkennungssequenzen für CTLs auch zur Folge haben, daß die Virusvariante der Immunantwort des Wirtes entkommen kann (Chisari et al., 1992). Derartige „Immune Escape“-Varianten könnten sich initial ungehindert im Leberparenchym ausbreiten. Richtet

sich die Immunantwort des Wirtes zu einem späteren Zeitpunkt gegen andere virale Epitope, ist ein schwerer, ausgedehnter Parenchymschaden die mögliche Folge.

## **1.5 Assoziationen von HBV-Varianten mit einem fulminanten Krankheitsverlauf**

Endemisch auftretende, fulminant verlaufende Hepatitiden, die auf einen einzelnen chronisch infizierten HBV-Träger als Infektionsquelle zurückgeführt werden konnten (Liang et al., 1991; Kosaka et al., 1993), legen die Vermutung nahe, daß Virusvarianten mit veränderten molekularbiologischen und immunologischen Eigenschaften für die Schwere der Krankheitsverläufe verantwortlich sind. Bisherige Studien stützen sich fast ausschließlich auf die Sequenzierung subgenomischer Regionen und postulieren auf dieser Grundlage die Assoziation verschiedener Virusvarianten mit einem fulminanten Verlauf der HBV-Infektion.

### **1.5.1 Die Precore-Stopkodonmutation in Position 1896**

So wurde die G-zu-A-Punktmutation in Nukleotidposition 1896, die zu einem Stopkodon in der Precore-Region führt, gehäuft bei Patienten mit fulminant verlaufenden Hepatitiden in Japan (Yotsumoto et al., 1991; Hasegawa et al., 1991; Omata et al., 1991), in Israel (Liang et al., 1991) sowie im Mittelmeergebiet (Carman et al., 1991) gefunden. Durch diese Mutation wird eine Expression des HBeAgs unmöglich.

Im Gegensatz dazu war in Gebieten mit geringerer HBV-Prävalenz, wie in den Vereinigten Staaten und Frankreich, die fulminant verlaufenden Hepatitiden nur selten mit den erwähnten Varianten assoziiert (Laskus et al., 1993; Liang et al., 1994; Feray et al., 1993). Desweiteren werden solche Mutanten auch bei Patienten mit chronischer Hepatitis oder bei asymptomatischen Trägern gefunden (Okamoto et al., 1990; Carman et al., 1989). Auch tierexperimentelle Studien, bei denen Precore-Stopkodonmutanten keine fulminante Hepatitis verursachen, stellen die vermutete Kausalität in Frage (Chen et al., 1992).

Der durch diese Variante möglicherweise ausgelöste Pathomechanismus ist derzeit unbekannt. Eventuell bewirkt das Fehlen von HBeAg eine veränderte Immunantwort des Wirtes. Die Möglichkeit einer veränderten Replikationseffizienz dieser Variante als pathogenetischer Faktor wird derzeit kontrovers diskutiert (Lamberts et al., 1993; Hasegawa et al., 1994).

### **1.5.2 Mutationen in der Core-Promotor-Region**

Darüber hinaus wurden Mutationen, die mit einer fulminanten Hepatitis B (FHB) assoziiert sind, in der Core-Promotor-Region beschrieben. Hier befinden sich Bindungsstellen verschiedener Transkriptionsfaktoren, die für die virale Genexpression und die Synthese prägenomischer RNA bedeutend sind. Dementsprechend können Mutationen in diesem Bereich die virale Replikationseffizienz und HBeAg-Expression beeinflussen. Eine A-zu-T-Punktmutation in Nukleotidposition 1762 sowie ein G-zu-A-Austausch in Nukleotidposition 1764 wurde gehäuft im HBV-Genom von Patienten mit FHB beobachtet (Sato et al., 1995). Ähnlich wie bei der Precore-Stopkodon-Variante treten diese Veränderungen unterschiedlich häufig in Gebieten mit hoher bzw. geringer Hepatitis-B-Prävalenz auf. So ist das Vorkommen derartiger Mutanten in endemischen Regionen deutlich höher als in nicht endemischen (Kaneko et al., 1995; Laskus et al., 1995). Diese Virusvarianten werden jedoch auch bei Patienten mit chronisch-aggressiver Hepatitis und bei asymptomatischen Trägern gefunden (Horikita et al., 1994). In-vitro-Studien konnten zeigen, daß diese T-1762/A-1764 Mutationen zu einer reduzierten HBeAg-Expression führen (Okamoto et al., 1994; Sato et al., 1995) und damit ebenfalls einen Defekt bezüglich der HBeAg-Expression als phänotypische Ähnlichkeit mit der Precore-Stopkodonvariante A-1896 aufweisen.

### **1.6 Analyse kompletter HBV-Genome von Patienten mit fulminanter Hepatitis B/D**

Die Aussagekraft vieler Studien über die Assoziationen bestimmter Mutationen im HBV-Genom mit einem fulminanten Krankheitsverlauf sind dadurch limitiert, daß sie nur Ausschnitte des Genomes analysierten und die restlichen Bereiche unberücksichtigt ließen. Nur zwei Arbeiten waren zu Beginn der Studie veröffentlicht, die das gesamte HBV-Genom bei FHB analysierten (Ogata et al., 1993; Hasegawa et al., 1994). Betrachtet man deren Ergebnisse, fällt auf, daß in allen Genomregionen zahlreiche, zum Teil bislang unbeschriebene Mutationen zu finden waren. In diesen beiden Untersuchungen wurde jedoch nur die Sequenz eines einzelnen klonierten HBV-Moleküls bestimmt. Es ist jedoch bekannt, daß im Serum jedes Patienten verschiedene Virusvarianten koexistieren. Ziel sollte daher sein, die Struktur der dominierenden Viruspopulation zu bestimmen sowie mehrere Virussubpopulationen als Heterogenität zu erfassen. Durch die von uns angewandte Technik

der direkten Sequenzierung der PCR amplifizierten Virusgenome kann dieser Forderung entsprochen werden.

## **1.7 Problemstellung**

Die Pathogenese der fulminanten Hepatitis B, einschließlich der fulminanten, HDAg-positiven HBV-Infektion und der fulminant exazerbierenden Hepatitis B, ist weitgehend ungeklärt. Vermutlich spielen sowohl virale als auch wirtsspezifische Faktoren eine Rolle. Um die Bedeutung der viralen Einflüsse zu klären, ist zunächst die strukturelle Analyse der kompletten Virusgenome dieser Patienten erforderlich.

Eine weitere Unklarheit auf dem Gebiet der fulminanten Hepatitiden ist die Frage, inwiefern das HDV den fulminanten Verlauf beeinflußt und ob bei delta-positiven Patienten andere HBV-Varianten vorliegen als bei Patienten ohne HDV-Koinfektion.

Zu Beginn dieser Studie existierten nur wenige Arbeiten (Ogata et al., 1993; Hasegawa et al., 1994), die unter dem Aspekt des fulminanten Hepatitis B Verlaufes das gesamte virale Genom untersuchten. Es lagen keine Daten über den Einfluß einer bestehenden HDV-Koinfektion auf die HBV-Population bei einer fulminanten Hepatitis B/D vor. Die Veränderungen des gesamten HBV-Genoms von Patienten, die wegen einer chronischen Hepatitis B ein Lebertransplantat erhielten und anschließend eine fulminante Exazerbation der Infektion erlitten, ist im Verlauf bisher nicht dokumentiert worden.

## 1.8 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Studie war also, folgende Fragen zu untersuchen:

- Sind bestimmte Mutationen im gesamten HBV-Genom mit einer fulminanten HBV/HDV-Infektion assoziiert?
- Existieren Unterschiede im HBV-Genom zwischen Patienten mit fulminanten HBV-Infektion und fulminanter HBV/HDV-Infektion?
- Welchen Veränderungen unterliegt die HBV-Population im Verlauf einer fulminanten Reinfektion nach Lebertransplantation unter Immunsuppression?

Hierzu wurde eine strukturelle Analyse des gesamten HBV-Genoms von sechs Patienten mit fulminanter HBV/HDV-Infektion durchgeführt, um so eventuelle Rückschlüsse auf Veränderungen der biologischen Eigenschaften der HBV und damit auf die Pathophysiologie der FHB ziehen zu können. Parallel zu dieser Arbeit wurde als Vergleichsgruppe die HBV-Genomstruktur von neun Patienten mit fulminanter HBV-Infektion ohne HDV-Koinfektion untersucht.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Patienten**

In dieser Studie wurden Seren von sechs Patienten mit fulminanter HBV-HDV-Koinfektion untersucht. Vier dieser Patienten erlitten eine fulminante Hepatitis B/D. Die verbleibenden zwei Patienten entwickelten nach einer Lebertransplantation eine fulminante Reinfektion bei vorbestehender chronischer HBV-/HDV-Infektion. Von diesen Patienten wurde HBV-DNA kurz vor der Lebertransplantation sowie zum Zeitpunkt der fulminanten Exazerbation analysiert. Keiner der Patienten war mit dem Hepatitis C Virus (HCV) oder dem Humanen Immundefizienzvirus (HIV) infiziert. Bei Patient 3 war kein HBsAg, jedoch HBV-DNA nachweisbar, so daß insbesondere unter Berücksichtigung einer positiven anti-HDV-IgM eine Hepatitis B/D erwiesen ist.

Patienten	Alter	Ge- schlecht	Herkunft	Anti- Delta-Ak	HBsAg	Anti-HBc IgM	Anti-HBe	HBeAg	Verlauf
1	25 J.	m	Italien	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	gestorben
2	23 J.	w	Italien	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	gestorben
3	18 J.	m	Italien	positiv	negativ	negativ	negativ	negativ	überlebt
4	45 J.	m	Italien	positiv	positiv	positiv	negativ	negativ	gestorben
5	50 J.	m	Italien	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	gestorben
6	37 J.	w	Indien	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	gestorben

**Tabelle 1:** Übersicht der Patientendaten einschließlich serologischer Charakteristika

### **2.2 Serologische Marker der Hepatitis-B/D-Virus-Infektionen**

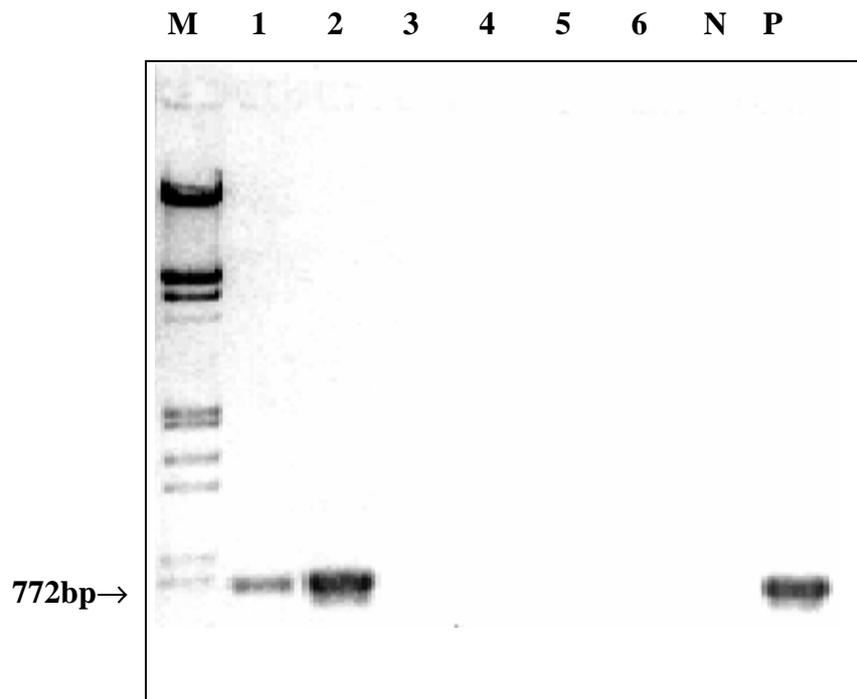
Serologische Marker der HBV- und der HDV-Infektion wurden mit Hilfe von kommerziell erhältlichen Assays von Abbott Laboratories, Chicago, IL, bestimmt, die polyklonale Antikörper zur Detektion von HBeAg und HBsAg einsetzen. Antikörper gegen das HCV wurden mit „Enzyme-linked immunoassays“ (ELISA) der Firma Ortho Diagnostic Systems, Tokyo, Japan, untersucht.

### 2.3 DNA-Isolierung aus dem Serum

Die Isolierung der DNA erfolgte in Anlehnung an Protokolle von Sambrook (Sambrook et al., 1989). Es wurden 380 µl der jeweiligen Serumprobe für 4 h bei 65°C mit Lysepuffer, bestehend aus 20 mM Tris/HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA, 0,1 % SDS und 0,5 mg/ml Proteinase K (Boehringer Mannheim, BRD), inkubiert. Dadurch konnten die Serumproteine unter konsequenter Schonung der DNA abgebaut werden. Die Trennung der DNA von den Proteinresten erfolgte durch eine anschließende Extraktion mit 500 µl Phenol und eine Zentrifugation für 10 min bei 10.000g. Die sich im Überstand befindende DNA wurde mit 500 µl Chloroform extrahiert und mit Isopropanol (96%) und 150 mM Natriumacetat in Gegenwart von t-RNA für 12 h bei -20°C gefällt. Das gewonnene Pellet wurde in Ethanol (75%) gewaschen und nach erneuter Zentrifugation (5 min, 10.000 g) in 20 µl Wasser resuspendiert.

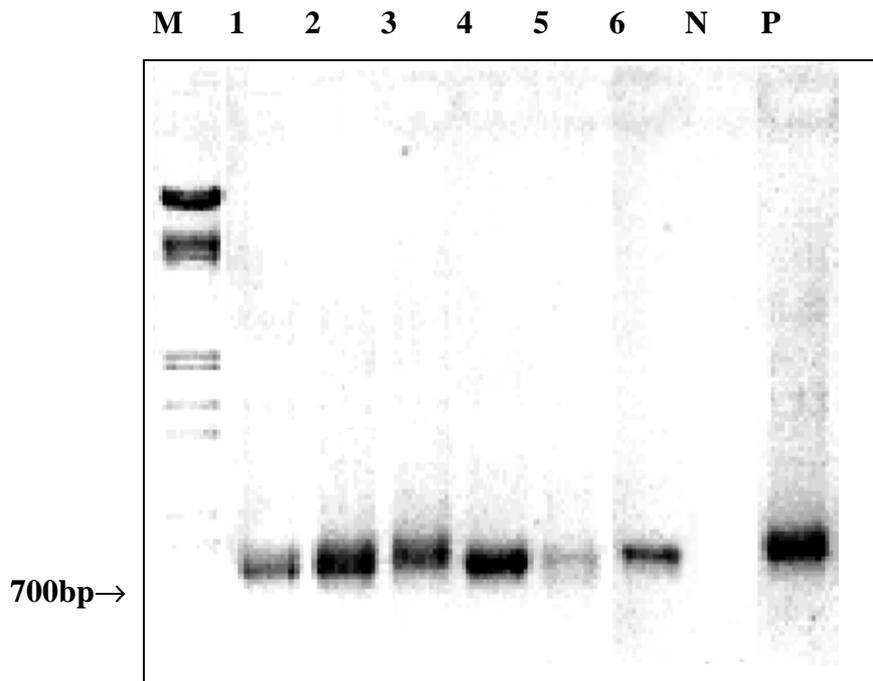
### 2.4 Amplifikation der DNA

Die Amplifikation des gesamten HBV-Genoms erfolgte mittels vier verschiedener Polymerase-Kettenreaktionen (polymerase chain reaction, PCR) von einander überlappenden HBV-DNA-Fragmenten. Die PCR wurde in einem Volumen von 25 µl in Gegenwart von 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris/HCl (pH 8,3), 200 mM dNTP (Boehringer Mannheim), 0,5 U *Taq* DNA Polymerase (Boehringer Mannheim), 0,25 µM der jeweiligen Primer und 1 µl der extrahierten DNA-Suspension durchgeführt. Nach initialer Denaturierung der DNA bei 80°C für 90 sec (hot start) folgten 30 Zyklen unter den nachstehenden Bedingungen: Denaturierung der DNA für 30 sec bei 94°C, „Annealing“, d.h. Bindung der Primer an die DNA-Stränge, für 30 sec bei 55°C und Kettenverlängerung für 90 sec bei 72°C. Ein Aliquot von 5 µl des PCR-Produktes wurde einer Elektrophorese (Spannung: 3-5 V/cm Elektrodenabstand) in einem 1,5 %igen Agarosegel (Typ I EEO Agarose; Sigma, München) unterzogen, mit Ethidiumbromid (1µg/ml) angefärbt und unter UV-Licht ausgewertet. Durch den in der Elektrophorese mit eingesetzten DNA-Längenmarker konnte die Größe der amplifizierten DNA-Fragmente abgeschätzt werden (Abbildung 7). Jede PCR wurde zusätzlich mit einer Positiv- und einer Negativkontrolle durchgeführt.



**Abbildung 7:** PCR-Produkt nach der Elektrophorese im Agarosegel am Beispiel des Fragmentes I, M steht für Längenmarker, 1-6 steht für die PCR-Produkte der jeweiligen Patienten, N steht für Negativ-, P für Positivkontrolle

Falls kein Amplifikationsprodukt als Bande sichtbar war, wurde 1  $\mu$ l des PCR-Produktes erneut amplifiziert. Für diese zweite, sogenannte nested PCR wurden intern gelegene Primer eingesetzt. Diese Reaktion erfolgte unter oben genannten Bedingungen für 25 Zyklen (hot start 90 sec bei 80°C, anschließend 30 sec 94°C/ 30 sec 55°C/ 90 sec 72°C). Anschließend wurde erneut ein Aliquot von jeweils 5  $\mu$ l der Produkte einer Elektrophorese in einem 1,5 %igen Agarosegel bei einer Spannung von 3-5V/cm Elektrodenabstand unterzogen. Danach wurde das Gel wiederum angefärbt und unter UV-Licht ausgewertet (Abb. 8).



**Abbildung 8:** Nested PCR-Produkt nach der Elektrophorese im Agarosegel am Beispiel des Fragmentes I, M steht für Längenmarker, 1-6 steht für die PCR-Produkte der jeweiligen Patienten, N steht für Negativ-, P für Positivkontrolle

Folgende Primer wurden bei der Amplifizierung der vier genomischen Fragmente verwendet (A, I, P, M geben äußere, innere, Plus- und Minus-Primer an). Die Nukleotidpositionen wurden entsprechend der Nomenklatur nach Galibert (Galibert et al., 1979) angegeben.

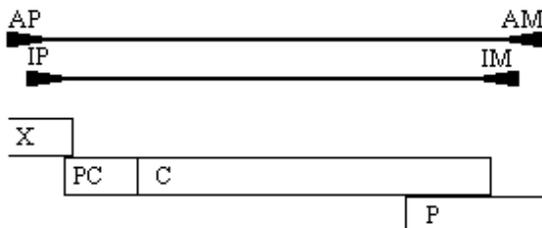
Primer für Fragment I:

AP: 5'-CTGTTTGTAAAGACTGGGAGGAGTTGGGGGAGG (1715-1749)

AM: 5'-GATTAAAGACAGGTACAGTAGAAGAATAAAGCCC(2520-2487)

IP: 5'-GTAAAGGTCTTTGTACTAGGAGGCTGTAGGC (1757-1788)

IM: 5'-AGTAAAGTTCCCCACCTTATGAGTCCAAGG (2486-2457)



**Abbildung 9:** Schematische Darstellung der Lokalisation des Fragmentes I

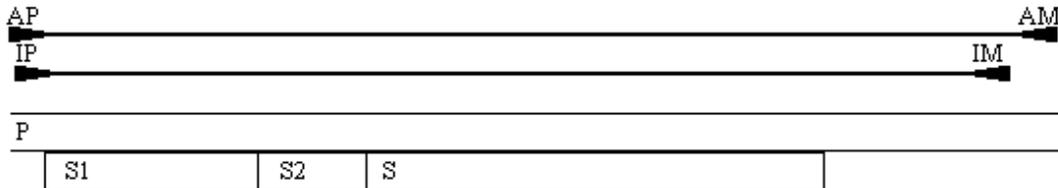
Primer für Fragment II:

AP: 5'-GCCTCATTTTGTGGGTCACCATATTCTTGGG (2802-2832)

AM: 5'-GGGGGTTGCGTCAGCAAACACTTGGC (1200-1175)

IP: 5'-GGGTCACCATATTCTTGGGAACAAGA (2813-2839)

IM: 5'-AGAAAGGCCTTGTAAGTTGGCG (1121-1101)



**Abbildung 10:** Schematische Darstellung der Lokalisation des Fragmentes II

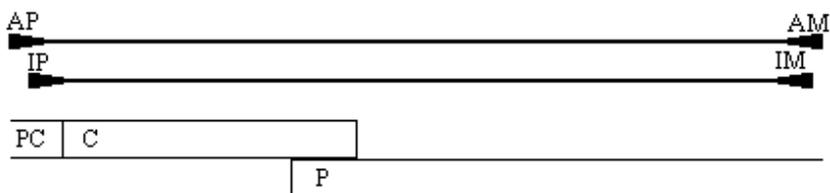
Primer für Fragment III:

AP: 5'-CTTTTTCACCTCTGCCTAATCATCTC (1820-1845)

AM: 5'-CCTGAGCCTGAGGGCTCCACCCAA (3061-3037)

IP: 5'-TTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGT (1863-1899)

IM: 5'-ACCCCAAAGGCCTCCGTGCGGT (3043-3021)



**Abbildung 11:** Schematische Darstellung der Lokalisation des Fragmentes III

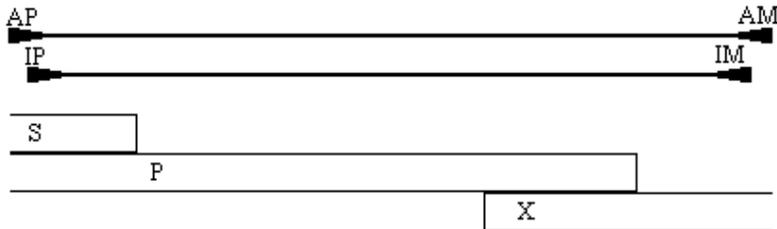
Primer für Fragment IV:

AP: 5'-ATTCCTATGGGAGTGGGCCTCAGCCCGTT (634-662)

AM: 5'-GGTGAAAAAGTTGCATGGTGCTGGTG (1829-1804)

IP: 5'-CTCAGTTTACTAGTGCCATTTGTTTCAGT (671-698)

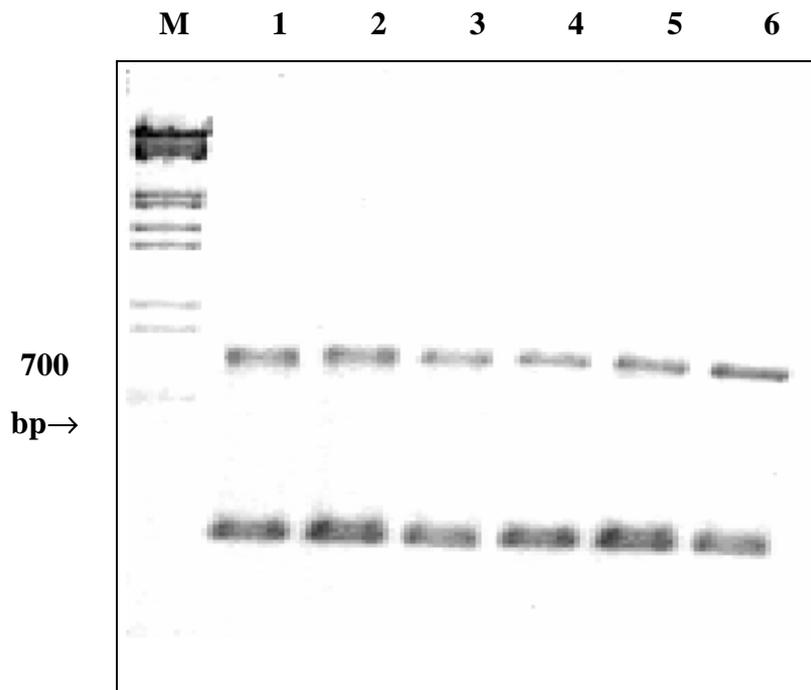
IM: 5'-AGACCAATTTATGCCTACAGCCTCCTA (1800-1773)



**Abbildung 12:** Schematische Darstellung der Lokalisation des Fragmentes IV

## 2.5 Herstellung von Einzelstrang-DNA

Die Einzelstränge wurden durch eine asymmetrische PCR hergestellt. Dies geschah in einem Endvolumen von 100  $\mu$ l unter Einsatz von 1  $\mu$ l des jeweiligen PCR-Produktes, 1 mM des Plus-Strang-Primers und 6,67  $\mu$ M des Minus-Strang-Primers, bzw. umgekehrt, d.h. jeweils ein Primer im Überschuß. Nach 25 Amplifikationszyklen, die unter den oben beschriebenen Bedingungen durchgeführt wurden, wurde ein Aliquot von jeweils 5  $\mu$ l der Produkte einer Elektrophorese in einem 1,5 %igen Agarosegel bei einer Spannung von 3-5 V/cm Elektrodenabstand unterzogen. Danach wurde das Gel wiederum angefärbt und unter UV-Licht ausgewertet (Abb. 13), wobei eine charakteristische Doppelbande zu erkennen war, welche die Einzel- bzw. Doppelstränge darstellte. Anschließend erfolgte die Aufreinigung der nun asymmetrischen PCR-Produkte über einer Zentrifugationssäule (Centricon 100; Amicon), wobei die eingesetzten Primer entfernt wurden.



**Abbildung 13:** Produkte einer Asymmetrischen PCR zur Herstellung von DNA-Einzelsträngen an Beispiel des Fragmentes I, Einzelstrang mit Plusausrichtung, M steht für Längenmarker, 1-6 steht für die asymmetrischen PCR-Produkte der jeweiligen Patienten,

## 2.6 Sequenzierung des Virusgenoms

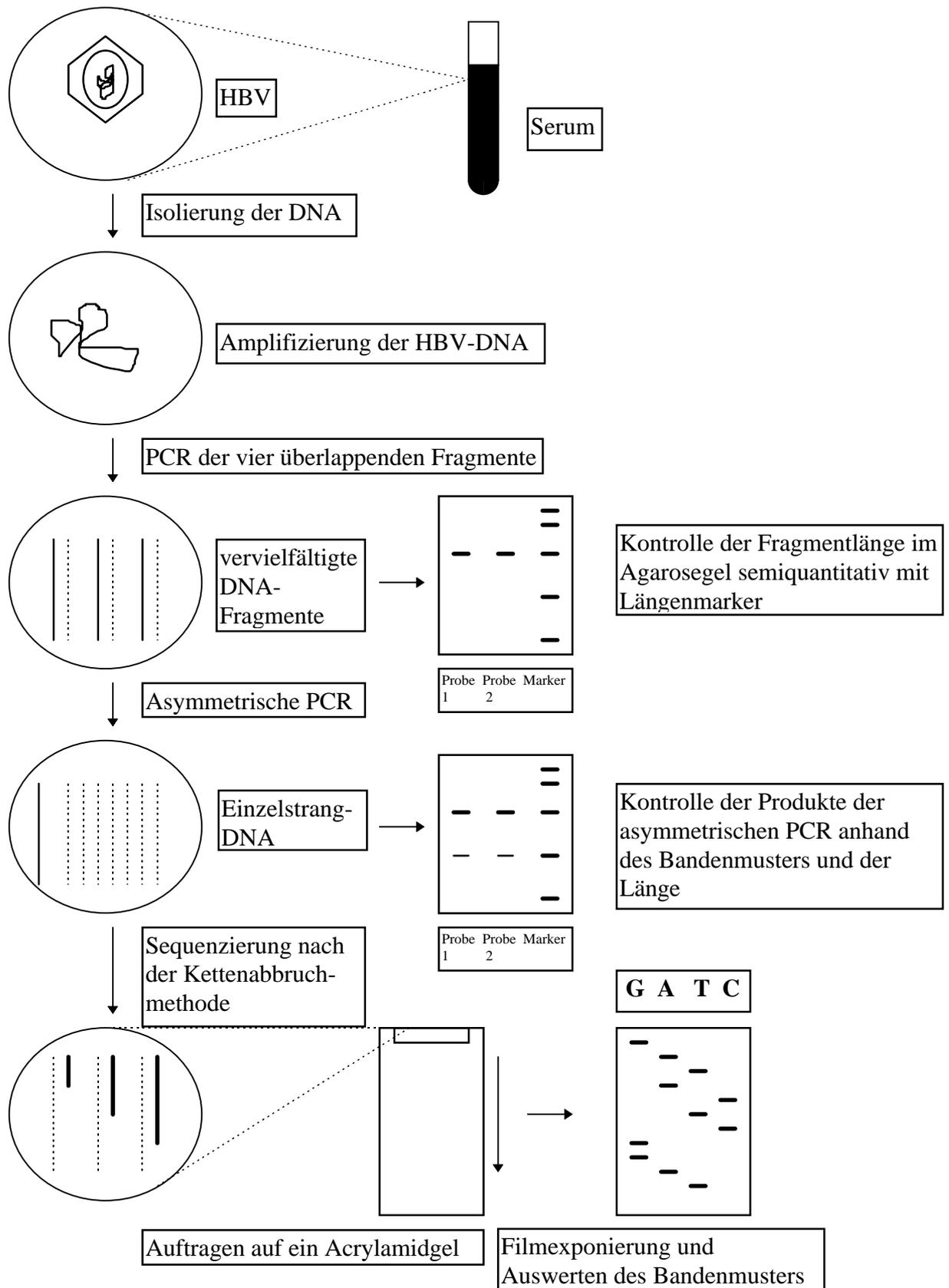
Die Sequenzierung der gewonnenen Einzelstränge erfolgte direkt mit der Technik der Kettenabbruchmethode. Diese beruht auf einer Verhinderung der Elongation während der DNA-Synthese durch den anteiligen Einsatz von Dideoxynukleosidtriphosphaten (ddNTP). Die dadurch entstehenden, unterschiedlich langen DNA-Fragmente können elektrophoretisch aufgetrennt werden und lassen so deren Sequenz erkennen.

Die Sequenzierung der DNA-Einzelstränge wurde mit Hilfe von  $^{35}\text{S}$ -markiertem dATP unter Benutzung eines Sequenzierungskits (USB; Denver, CO) durchgeführt. Für die Sequenzierungsreaktion wurden 7  $\mu\text{l}$  der DNA-Probe mit 2 pmol Sequenzierungsprimer in einem Endvolumen von 10  $\mu\text{l}$  für 2 min bei 65°C inkubiert und anschließend schonend abgekühlt. Nach Zusatz von 0,7  $\mu\text{l}$   $^{35}\text{S}$ -dATP, 1  $\mu\text{l}$  100 mM DDT, 2  $\mu\text{l}$  dNTP-Mix (je 1,5 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP) und 2  $\mu\text{l}$  1:8 verdünnter Sequenase wurden je 3,5  $\mu\text{l}$  dieses Ansatzes zu 2,5  $\mu\text{l}$  des vorgelegten Terminationsmixes, welcher jeweils ddATP, ddTTP, ddCTP bzw. ddGTP enthält (USB; Denver, USA), gegeben. Nach 10 minütiger Sequenase-Reaktion bei 37°C wurde durch den Zusatz von 4  $\mu\text{l}$  „Stopping-Lösung“ (USB; Denver, USA)

dieser Vorgang beendet. Sowohl Plus- als auch Minusstrang wurden direkt sequenziert, wofür 32 verschiedene Sense- und 30 Antisense-Primer zur Verfügung standen. In den überlappenden Regionen wurden einige Sequenzierungsprimer für zwei Fragmente benutzt. Die elektrophoretische Auftrennung der Nukleinsäuren erfolgte in einem 0,25 mm dicken Sequenzgel, bestehend aus 6 %igem Acrylamid, 0,2 %igem Bisacrylamid und 7 M Harnstoff, 400 µl TEMED (N,N,N,N'-Tetraethylendiamin) und 10 %igem Ammoniumpersulfat (APS) in 50 ml TBE-Puffer (89 mM Tris-HCl, 89 mM Borsäure, 2,5 mM EDTA). Vor dem Auftragen der Proben wurden diese für 2 min bei 75°C denaturiert. Die Elektrophorese wurde in einer vertikalen Elektrophoresekammer bei einer Gellänge von 60 cm unter einer Spannung von 2,5 kV durchgeführt.

## **2.7 Vergleichende Sequenzanalyse**

Die Auswertung der Nukleotidsequenzen erfolgte unter Zuhilfenahme des Computerprogrammes "MacVector". Die erhaltenen Daten wurden mit 35 kompletten HBV-DNA-Sequenzen von Patienten ohne fulminante HBV-Infektion verglichen, die der Genomdatenbank des National Center for Biological Information (NCBI) entnommen wurden. Hierbei wurde zwischen „einzigartigen“ Mutationen, d.h. solchen, die in den Vergleichssequenzen nicht auftraten, und „seltenen“ Mutationen, d.h. Veränderungen, die in den Vergleichssequenzen nicht öfter als dreimal auftraten, unterschieden. Darüber hinaus wurden die HBV-Genome bei fulminanter Hepatitis mit HDV-Koinfektion mit HBV-Genomen fulminanter Hepatitiden, bei denen keine zusätzliche HDV-Infektion vorlag, verglichen.



**Abbildung 14:** Vereinfachte schematische Darstellung der Methodik

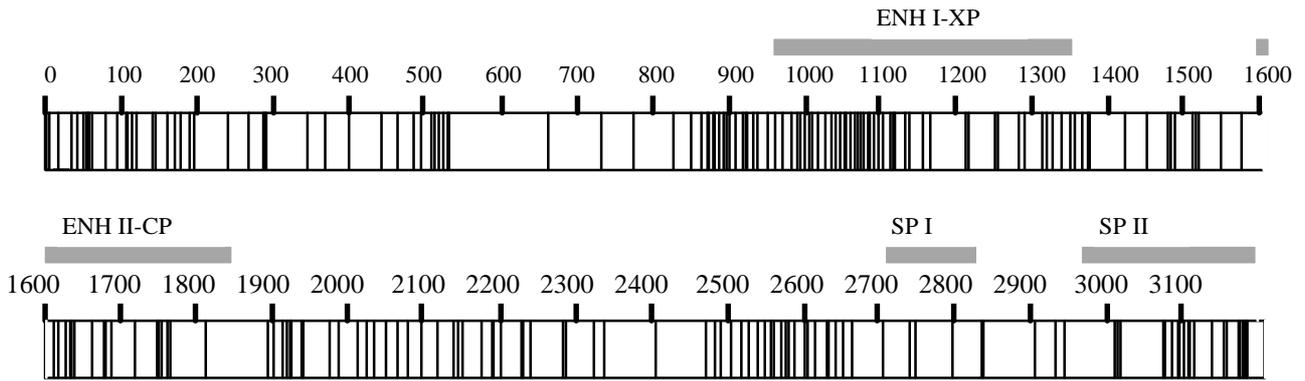
## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Veränderungen der HBV-Population bei fulminanter Hepatitis B/D**

In dieser Studie wurde die gesamte virale Nukleotidsequenz von vier Patienten mit fulminanter HBV/HDV-Infektion sowie von zwei weiteren Patienten, die nach einer orthotopen Lebertransplantation eine fulminante Reinfektion nach vorbestehender chronischen HBV/HDV-Infektion erlitten, untersucht. Bei den zuletzt genannten Patienten wurden die Viruspopulationen sowohl vor der Lebertransplantation, also zum Zeitpunkt der chronischen HBV/HDV-Infektion, als auch während der fulminanten Reinfektion nach Transplantation untersucht. Dies erfolgte durch eine direkte Sequenzierung von vier einander überlappenden, PCR-amplifizierter HBV-DNA-Fragmente. Hierdurch wurde es möglich, sowohl die Nukleotidsequenz der jeweils dominanten Viruspopulation, als auch das Vorliegen von Heterogenitäten zusätzlich existenter Subpopulationen zu erfassen. Mit dieser Methode war es möglich, die Sequenz von Quasispezies zu untersuchen, die mindestens einen Anteil von 20% an der Gesamtviruspopulation ausmachten.

#### **3.1.1 Vergleich der Nukleinsäuresequenz**

Sämtliche untersuchten HBV-DNA-Genome waren dem Genotyp D zuzuordnen. Daher wurden Nukleinsäureaustausche im Vergleich zu der von Galibert et al. 1979 beschriebenen Sequenz (Genotyp D, Subtyp ayw 3) analysiert. Die folgende Darstellung verdeutlicht die Verteilung der Mutationen in den sechs untersuchten HBV-Populationen zum Zeitpunkt des fulminanten Verlaufes im HBV-Genom (orientiert am Genotyp D, Subtyp ayw 3). Funktionell wichtige Nukleotidregionen wurden durch graue Balken markiert. Die Zahlen oberhalb des Rahmens, der das HBV-Genom darstellt, bezeichnen die jeweiligen Nukleotidpositionen, die senkrechten Striche innerhalb des Rahmens repräsentieren jeweils eine gefundene Mutation.



**Abbildung 15:** Schematische Darstellung der Verteilung der Mutationen über das gesamte Genom bei den untersuchten Viruspopulationen der sechs Patienten (siehe Text)

Folgende Tabelle gibt die genaue Position aller nachgewiesenen Mutationen der Viruspopulationen während der fulminanten Hepatitis an.

Pos.	D	1	2	3	4	5	6
1	T	-	C	-	C	C	C
6	C	-	-	-	-	-	<b>A</b>
13	C	T	-	-	-	-	-
36	G	-	-	-	-	<b>a</b>	<b>a</b>
42	G	-	-	-	-	<b>A</b>	-
44-52		-	-	-	-	∅	∅
53	T	-	-	-	<b>C</b>	<b>G</b>	<b>G</b>
54	T	-	-	<b>A</b>	-	-	-
80	<b>A</b>	<b>G</b>	-	-	-	-	-
96	T	C	C	C	C	C	C
105	C	-	-	-	-	-	T
106	C	-	-	-	-	-	<b>A</b>
111	C	-	-	-	<b>A</b>	-	-
113	T	-	-	-	-	-	<b>A</b>
144	C	-	-	-	<b>T</b>	-	<b>T</b>
148	G	-	-	-	-	<b>A</b>	-
162	<b>A</b>	<b>G</b>	-	-	-	-	-
176	T	-	-	-	-	<b>C</b>	-
183	G	-	-	-	-	<b>C</b>	-
190	T	-	-	-	-	-	<b>G</b>
196	G	-	-	-	<b>A</b>	-	-
242	C	-	-	-	-	-	<b>r</b>
273	A	-	-	-	-	<b>G</b>	-
287	A	-	-	-	-	<b>e</b>	-
288	C	-	-	-	<b>A</b>	-	-
289	T	-	-	-	<b>G</b>	<b>C</b>	-
346	T	C	C	C	C	C	C
373	C	-	-	<b>T</b>	-	-	-
400	C	-	-	-	-	<b>A</b>	-
441	T	-	-	-	-	<b>K</b>	-
472	T	-	-	-	<b>g</b>	-	-
493	C	-	-	-	-	-	<b>T</b>
499	<b>A</b>	<b>C</b>	<b>C</b>	-	<b>C</b>	<b>C</b>	<b>T</b>
517	<b>C</b>	<b>T</b>	-	-	-	-	-
518	C	-	-	-	-	-	<b>A</b>
520	<b>G</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>C</b>	-
528	T	-	<b>C</b>	<b>C</b>	<b>C</b>	-	<b>C</b>
532	T	-	-	-	-	-	<b>C</b>
533	A	-	<b>C</b>	<b>C</b>	<b>C</b>	-	-
667	C	-	-	<b>T</b>	-	-	-
732	C	-	-	-	<b>T</b>	-	-
774	G	-	-	<b>A</b>	-	-	-
825	T	-	-	-	-	<b>e</b>	-
852	G	-	-	-	-	-	<b>A</b>
861	T	-	-	<b>C</b>	-	-	-
867	T	-	<b>G</b>	-	-	-	-
868	C	-	-	-	-	-	<b>T</b>
870	<b>A</b>	<b>g</b>	-	-	-	-	-
871	A	-	-	-	-	-	<b>C</b>
876	T	-	-	-	-	<b>C</b>	<b>C</b>
882	T	-	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>C</b>	-	<b>C</b>
895	T	<b>A</b>	-	-	-	-	-
898	T	-	-	<b>C</b>	-	-	-
906	C	-	-	-	-	-	<b>A</b>
918	A	-	-	-	-	-	<b>T</b>
925	A	-	<b>G</b>	-	<b>G</b>	-	-
926	T	-	-	<b>g</b>	-	-	-

938	A	-	-	-	<b>e</b>	-	-
Pos.	D	1	2	3	4	5	6
942	A	-	-	<b>C</b>	-	-	-
949	A	-	-	-	-	-	<b>C</b>
961	A	-	-	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>G</b>
969	G	-	-	-	-	-	<b>A</b>
987	A	-	-	-	-	-	<b>T</b>
993	A	-	<b>G</b>	-	-	-	-
994	C	-	-	-	-	<b>A</b>	-
996	A	-	-	<b>e</b>	-	-	<b>T</b>
1002	G	-	-	<b>a</b>	-	-	-
1005	T	<b>C</b>	-	-	-	-	-
1008	T	-	-	-	<b>G</b>	-	-
1011	G	-	-	-	<b>A</b>	-	-
1023	C	-	<b>T</b>	-	-	-	-
1026	T	-	<b>W</b>	-	-	-	-
1029	T	-	<b>Y</b>	<b>C</b>	-	<b>C</b>	-
1032	A	-	-	<b>g</b>	-	-	-
1041	T	-	<b>A</b>	-	-	-	-
1044	T	-	-	-	-	-	<b>e</b>
1050	G	-	<b>C</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>
1053	<b>G</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>
1059	<b>T</b>	<b>C</b>	<b>Y</b>	<b>C</b>	<b>C</b>	<b>C</b>	<b>A</b>
1062	G	-	-	<b>A</b>	-	-	-
1067	<b>C</b>	<b>T</b>	-	-	-	-	-
1068	A	-	-	-	-	<b>t</b>	-
1074	T	-	<b>A</b>	-	-	-	-
1077	A	-	-	-	-	-	<b>g</b>
1078	T	-	<b>G</b>	-	<b>G</b>	-	-
1080	T	-	<b>k</b>	<b>G</b>	-	-	<b>G</b>
1083	G	-	-	-	-	<b>R</b>	-
1086	G	-	-	-	-	<b>a</b>	-
1092	C	-	-	-	-	-	<b>T</b>
1102	<b>C</b>	<b>t</b>	-	-	-	-	-
1120	C	-	-	<b>T</b>	-	-	-
1122	G	-	<b>R</b>	-	-	-	-
1123	T	-	<b>A</b>	-	-	-	-
1131	A	-	<b>G</b>	-	-	-	-
1135	C	-	<b>A</b>	-	-	-	-
1155	C	-	<b>T</b>	-	-	-	-
1167	A	-	<b>W</b>	-	-	-	-
1217	T	-	-	-	<b>C</b>	-	-
1219	A	-	-	-	<b>t</b>	-	-
1249	T	-	-	<b>C</b>	<b>C</b>	<b>C</b>	<b>C</b>
1250	C	-	-	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>a</b>
1287	C	-	-	<b>A</b>	-	-	-
1293	T	-	-	<b>C</b>	-	-	-
1315	<b>G</b>	-	<b>A</b>	-	-	-	-
1320	C	-	<b>S</b>	-	-	-	-
1323	A	-	-	-	-	-	<b>C</b>
1332	T	-	-	-	-	-	<b>G</b>
1347	C	-	-	-	-	-	<b>T</b>
1350	<b>A</b>	<b>C</b>	<b>C</b>	<b>T</b>	<b>C</b>	<b>C</b>	<b>C</b>
1361	A	-	-	-	-	-	<b>T</b>
1370	<b>T</b>	<b>a</b>	-	-	-	-	-
1371	T	-	-	-	-	<b>C</b>	-
1422	T	-	-	-	-	-	<b>e</b>
1449	T	-	<b>C</b>	<b>C</b>	<b>C</b>	-	<b>C</b>

E  
N  
H  
I  
X  
P

1479	A	-	-	<b>G</b>	-	-	-
1480	C	-	-	<b>A</b>	-	-	-
Pos.	D	1	2	3	4	5	6
1484	C	-	<b>M</b>	-	-	-	-
1509	C	-	-	-	-	-	<b>T</b>
1512	A	-	<b>G</b>	-	<b>C</b>	-	<b>G</b>
1515	G	-	-	-	-	-	<b>a</b>
1544	A	-	-	<b>C</b>	-	-	-
1574	A	-	<b>T</b>	-	-	-	-
1611	G	-	-	<b>M</b>	-	-	-
1613	G	-	-	-	-	<b>a</b>	-
1631	C	-	<b>Y</b>	-	-	-	-
1634	A	-	<b>G</b>	-	-	-	-
1635	A	-	-	<b>T</b>	-	-	<b>T</b>
1637	<b>A</b>	<b>C</b>	<b>C</b>	<b>C</b>	-	<b>C</b>	<b>C</b>
1638	T	-	<b>Y</b>	-	-	-	-
1662	A	-	<b>G</b>	-	-	-	-
1676	<b>A</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>
1677	G	-	-	<b>A</b>	-	-	-
1689	A	-	-	-	<b>G</b>	-	-
1724	T	-	-	-	-	-	<b>e</b>
1753	T	-	-	-	-	<b>e</b>	-
1754	T	-	-	-	-	-	<b>G</b>
1757	G	-	-	-	<b>A</b>	-	<b>A</b>
1762	A	-	-	-	<b>T</b>	-	-
1764	G	-	-	-	<b>A</b>	-	-
1816	G	-	<b>T</b>	-	-	-	<b>T</b>
1896	G	<b>A</b>	-	-	-	<b>A</b>	-
1899	G	-	-	-	-	<b>A</b>	-
1909	C	-	<b>T</b>	-	-	-	<b>T</b>
1912	C	-	-	-	-	-	<b>t</b>
1913	C	-	-	-	-	-	<b>T</b>
1915	T	-	-	-	-	-	<b>G</b>
1934	A	-	-	-	<b>T</b>	-	-
1936	T	-	<b>e</b>	-	<b>A</b>	<b>e</b>	-
1976	T	-	-	-	<b>A</b>	-	-
1987	T	-	-	-	<b>A</b>	-	-
2013	A	-	-	-	<b>T</b>	-	-
2020	A	-	-	-	<b>T</b>	-	-
2035	T	-	-	-	<b>C</b>	-	-
2047	A	-	<b>t</b>	-	-	-	-
2065	C	-	-	-	-	-	<b>A</b>
2080	T	-	-	-	-	-	<b>G</b>
2100	C	-	-	-	<b>A</b>	-	-
2121	T	-	-	-	-	-	<b>G</b>
2138	G	-	-	-	-	-	<b>A</b>
2140	<b>G</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>
2143	T	-	-	-	-	-	<b>C</b>
2146	A	-	-	-	-	-	<b>G</b>
2177	A	-	-	-	<b>g</b>	-	-
2192	A	-	-	-	-	-	<b>C</b>
2194	G	-	-	-	-	-	<b>A</b>
2200	C	-	-	-	-	-	<b>R</b>
2226	C	-	-	-	<b>t</b>	-	-
2227	T	-	-	-	<b>g</b>	<b>C</b>	-
2237	<b>G</b>	<b>C</b>	-	-	-	-	-
2287	T	-	-	-	-	-	<b>C</b>
2289	C	-	-	-	-	-	<b>M</b>

E  
N  
H  
I  
C  
P

2318	C	-	-	-	-	-	T
2337	C	A	-	-	-	-	-
2405	C	-	-	-	-	a	-
Pos.	D	1	2	3	4	5	6
2477	G	-	-	-	-	A	A
2486	T	-	-	-	-	-	G
2489	G	t	-	-	-	-	-
2507	A	T	-	-	-	-	-
2519	T	-	-	-	-	-	C
2525	T	-	C	-	-	-	-
2534	A	-	-	G	-	-	-
2537	A	-	-	-	-	-	C
2547	A	-	-	G	-	-	-
2555	T	-	-	-	-	-	C
2561	C	-	-	-	-	t	-
2574	A	-	-	-	g	-	-
2575	A	-	-	G	-	-	-
2588	G	-	-	-	-	-	A
2600	A	-	T	-	-	-	-
2603	C	T	-	-	-	-	-

2609	T	-	-	-	-	-	C
2624	A	-	-	G	-	G	-
Pos.	D	1	2	3	4	5	6
2625	T	-	-	-	-	-	C
2636	T	-	-	-	C	-	-
2645	C	T	T	T	T	T	T
2660	G	-	-	-	-	-	T
2675	A	-	-	-	-	-	G
2705	T	-	-	-	-	-	e
S 2738	T	-	-	-	-	-	C
P 2744	C	-	-	-	-	-	T
I 2801	C	-	t	-	-	-	-
2838	G	-	-	-	-	-	A
2840	T	-	-	-	-	-	G
2907	T	-	-	-	-	C	-
2928	C	-	t	-	-	-	-
2937	A	-	-	-	-	G	-
S 3008	T	-	-	-	C	-	-
P 3012	T	-	-	-	-	-	A
II 3013	T	-	-	-	-	-	Y

3075	T	-	-	-	-	-	C
Pos.	D	1	2	3	4	5	6
3076	T	-	-	G	-	-	A
3087	T	-	-	-	-	e	-
3098	C	-	-	t	-	-	-
S 3099	C	-	-	T	-	-	-
P 3102	C	-	-	-	-	-	T
II 3107	A	-	-	-	G	-	-
3108	T	-	-	-	-	G	-
3115	T	-	-	A	-	-	-
3138	G	-	-	C	-	-	-
3154	A	-	-	-	G	G	G
3155	A	-	C	-	-	-	-
3170-3172		-	-	-	-	∅	∅
3173	T	-	-	-	-	-	C
3174	G	-	-	-	-	C	-
3176	A	-	-	-	-	G	-

**Tabelle 2:** Darstellung aller Mutationen in der dominanten HBV-Population von Patient 1-6. Regionen mit regulatorischer Bedeutung (ENH I-XP, ENH II-CP, SP I, SP II) sind in der linken Positionsspalte schattiert; Mutationen, die im Vergleich zu den 35 Genomen chronischer Hepatitiden einzigartig sind, wurden als Großbuchstaben fettgedruckt und schattiert, solche die bei diesem Vergleich selten auftraten (nicht mehr als 3mal) wurden als Kleinbuchstaben fettgedruckt und schattiert dargestellt. Die Nomenklatur richtet sich nach den Empfehlungen der International Union of Biochemistry (Heterogenitäten: M= A oder C, Y= T oder C, K= G oder T, W= A oder T, R= A oder G, S= G oder C). Deletionen wurden mit dem Symbol ∅ dargestellt. Abkürzungen: Pos.: Nukleotidposition mit Mutation, D: Nukleotid des Referenzgenoms vom Genotyp D (ayw), 1-6: Nukleotidaustausche, die in den HBV-Populationen der Patienten 1-6 im Vergleich zum Referenzgenom auftraten

Die HBV-Genome aller Patienten mit fulminanter Hepatitis wiesen Mutationen in allen Regionen des Genoms auf. Insgesamt wurden 25 Positionen identifiziert, an denen häufig, mindestens jedoch in drei von sechs Sequenzen, Mutationen auftraten. Hierbei handelte es sich um die Nukleotidpositionen 1, 96, 346, 499, 520, 528, 533, 882, 961, 1050, 1053, 1059, 1080, 1249, 1250, 1350, 1449, 1512, 1637, 1676, 1909, 1936, 2140, 2645 und 3154. An 24 dieser Positionen traten allerdings auch bei den 35 Vergleichs-HBV-Genomen von Patienten ohne FHB oft, d.h. mehr als dreimal, Nukleinsäureaustausche auf. Eine Ausnahme bildete diesbezüglich die Position 1936. Hier traten zwei T-zu-C-Austausche, welche in den Vergleichsgenomen nur einmal auftraten, sowie ein „einzigartiger“, d.h. in den Vergleichsgenomen nicht aufgetretener, T-zu-A-Austausch auf. Die möglichen funktionellen Auswirkungen dieser Mutationen sind derzeit unbekannt.

Mutationen in Bereichen sogenannter "cis-acting regulatory elements" fanden besondere Beachtung (in Tabelle 2 schwach schattiert dargestellt), da Veränderungen der hier befindlichen Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren wesentliche Veränderungen der viralen Eigenschaften nach sich ziehen könnten. In der Region des Surface Promotor I (Nukleotid 2711-2822, Chang et al., 1989) wurden nur in zwei Sequenzen Mutationen gefunden, von denen eine als „selten“ einzustufen ist. In fünf HBV-Genomen fanden sich Mutationen im Bereich des Surface Promotor II (Nukleotid 3002-3202, Raney et al., 1989). Sechs dieser Mutationen waren in den Vergleichsdaten nicht beschrieben, zwei weitere Mutationen konnten als „selten“ eingestuft werden. In der Region des Enhancer I-X-Promotor (Nukleotid 963-1354, Chang et al., 1989 und Treinin et al., 1987) sowie des Enhancer II-Core Promotor (Nukleotid 1591-1850, Yee et al., 1989 und Lopez-Cabrera et al., 1990) traten Mutationen in allen untersuchten HBV-Genomen auf. Besonders im Bereich des Enhancer I-X-Promotor war eine deutliche Akkumulation von Nukleotidaustauschen zu verzeichnen (wie in Abb. 16 dargestellt). Zusätzlich zu den eigenen Befunden (als P1-6 bezeichnet) wurde zum Vergleich die Mutationsverteilung von neun weiteren HBV-Genomen von Patienten mit FHB (Sterneck et al., 1996; als V1-9 bezeichnet) sowie die der von Hasegawa 1994 (als FH-Strang bezeichnet) und Ogata 1993 (als HT-Strang bezeichnet) beschriebenen Stränge dargestellt. Diese beiden Isolate stellen die zuerst komplett sequenzierten HBV-Genome von Patienten mit FHB dar.



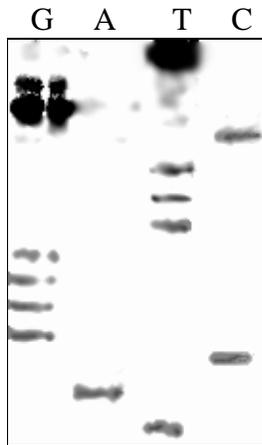
fulminanten Strängen V1-9 (siehe Text). Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren (C/EBP, NF1, HNF3, HNF4, RXR, PPAR, EF-C:RFX1, AP1, SP1) wurden unterstrichen



Ein A-zu-T-Austausch in Position 1762 und ein G-zu-A-Austausch in Position 1764, von denen vermutet wurde, sie seien mit fulminanten Verläufen assoziiert, fanden sich nur in einer der HBV-Populationen der Patienten. In Nukleotidposition 1816 (Precore-Start-Kodon) wurde im HBV-Genom der Patienten 2 und 6 ein G-zu-T-Austausch nachgewiesen, der zu einem Verlust der Expression von HBeAg führt. Eine Precore-Stopkodon-Mutation in Position 1896 fand sich in zwei weiteren Fällen (Patienten 1 und 5, siehe Abbildung 18). Damit sind vier der untersuchten HBV-Genome nicht zur HBeAg-Expression fähig.

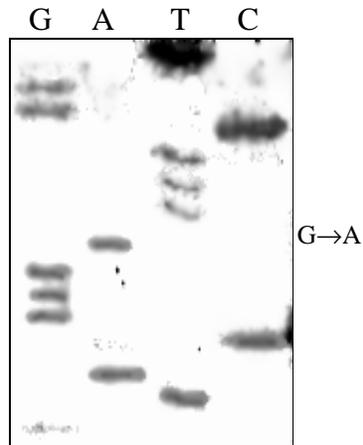
Nukleotidpositionen: 1889-1902

Wildtyp



Nukleotidpositionen: 1889-1902

Precore-Stopkodon-  
mutation



**Abbildung 18:** Darstellung der Precore-Stopkodonmutante in Position 1896 im Sequenzgel

In zwei von sechs Fällen wurde eine von D. Fernholz et al. 1991 beschriebene Virusvariante gefunden, die eine Pre-S2-Startkodondeletion sowie eine Deletion von neun weiteren Nukleotiden (Position 44-52) im Pre-S2-Gen aufwies (siehe Abbildung 19).

Nukleotidbereich: 3163-3182

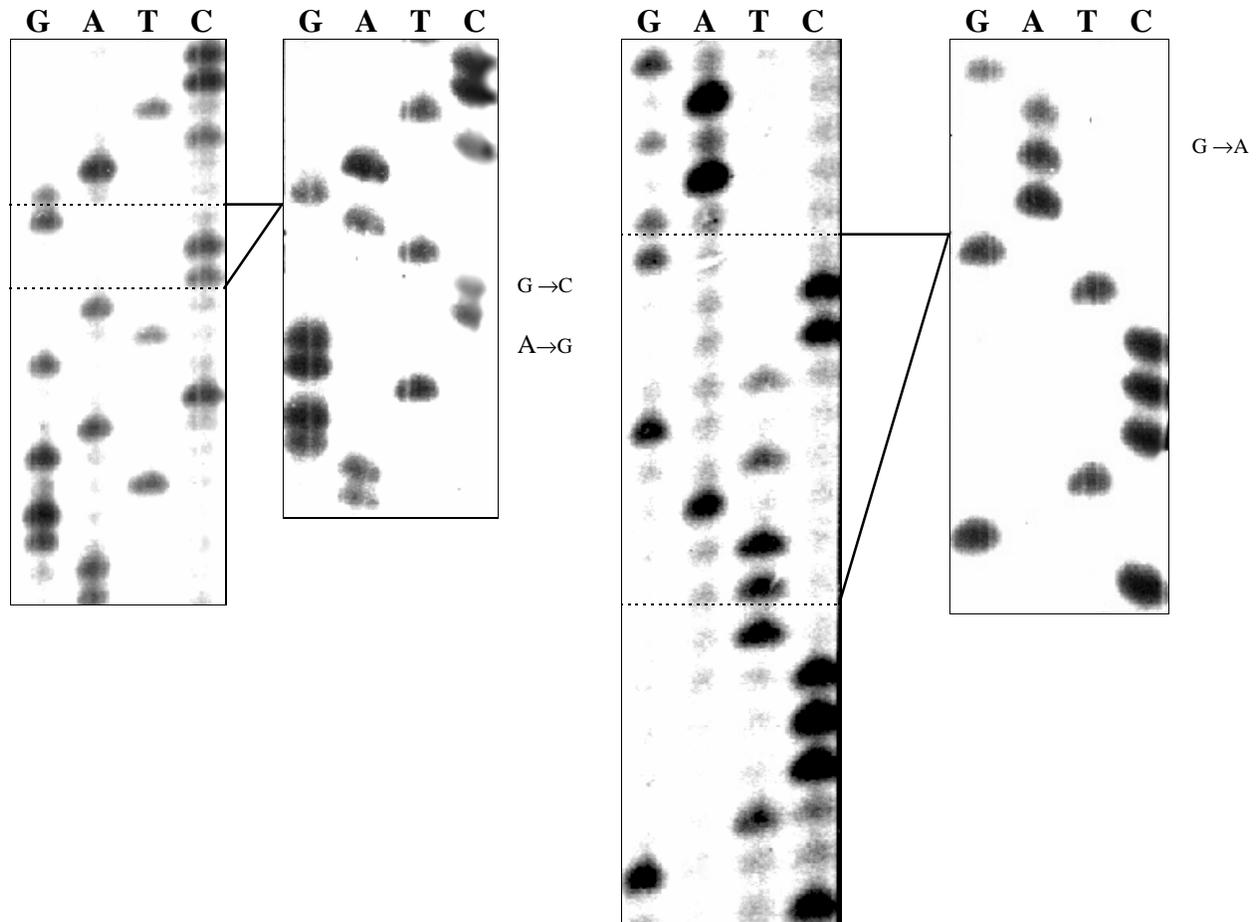
Nukleotidbereich: 39-60

Wildtyp:

Deletierte Mutante:

Wildtyp:

Deletierte Mutante:



**Abbildung 19:** Die Pre-S2-Deletionsmutation im Sequenzgel

### 3.1.2 Vergleich der Aminosäuresequenz

Aminosäureaustausche zeigten sich in allen vier offenen Leserahmen. Die folgenden Tabellen zeigen die Veränderungen der Aminosäuresequenzen der Proteine von den sechs untersuchten Fällen unter Berücksichtigung der Häufigkeit im Vergleich zu 35 Vergleichsgenomen ohne FHB. Als Referenz wurde die Aminosäuresequenz des Genotyps D gewählt.

<b>Precore-Protein:</b>							
AA	D	1	2	3	4	5	6
1	M	-	I	-	-	-	I
28	W	s	-	-	-	s	-
	t	-	-	-	-	t	-
	p	-	-	-	-	p	-
29	G	-	-	-	-	D	-
<b>Core-Protein</b>							
5	P	-	-	-	-	S	-
12	T	-	-	-	S	-	-
26	S	-	-	-	T	-	-
29	D	-	-	-	E	-	-
38	Y	-	-	-	F	-	-
40	E	-	-	-	D	-	-
67	T	-	-	-	N	-	-
74	V	-	-	-	-	G	-
80	A	-	-	-	-	T	-
93	M	-	-	-	v	-	-
109	T	-	-	-	m	-	-
113	E	Q	-	-	-	-	-
130	P	-	-	-	-	Q	-
169	Q	-	-	-	-	K	-
<b>X-Protein</b>							
AA	D	1	2	3	4	5	6
17	C	-	-	-	-	r	-
26	C	-	R	R	R	-	R
36	T	-	-	D	-	-	-
46	P	-	-	-	-	-	S
47	T	-	A	-	P	-	A
48	D	-	-	-	-	-	n
80	E	-	-	K	-	-	-
88	I	-	-	F	-	-	F
97	T	-	A	-	-	-	-
102	A	-	-	T	-	-	-
106	T	-	-	-	A	-	-
127	I	-	-	-	T	M	-
130	K	-	-	-	M	-	-
131	V	-	-	-	I	-	-
148	C	-	F	-	-	-	F
<b>Pre-S-Protein</b>							
AA	D	1	2	3	4	5	6
54	L	-	-	-	P	-	-
56	F	-	-	-	-	-	L
77	L	-	-	V	-	-	M
84	A	-	V	-	-	-	-
87	N	-	-	-	S	K	-
90	S	-	-	T	-	-	-
103	N	-	T	-	D	D	D
108	A	-	-	-	-	I	-
109	M	-	-	-	-	∅	∅
110	Q	-	-	-	-	R	-
114	T	-	-	-	-	K	-
124	R	-	-	-	-	K	K
126	R	-	-	-	-	K	-
AA	D	1	2	3	4	5	6
127	G	-	-	-	-	V	V

128	L	-	-	-	-	∅	∅
129	Y	-	-	-	-	∅	∅
130	F	-	-	-	Y	L	∅
139	T	A	-	-	-	-	-
144	L	P	P	P	P	P	P
147	A	-	-	-	-	-	V
149	P	-	-	-	H	-	-
150	L	-	-	-	-	-	I
160	P	-	-	-	L	-	L
<b>S-Protein</b>							
3	N	S	-	-	-	-	-
8	F	-	-	-	-	L	-
10	G	-	-	-	-	A	-
20	F	-	-	-	-	-	s
30	Q	-	-	-	-	-	K
40	N	-	-	-	-	S	-
45	T	-	-	-	K	P	-
96	V	-	-	-	-	G	-
125	M	-	T	T	T	-	T
127	T	-	P	P	P	-	-
193	S	-	-	-	L	-	-
207	S	-	-	N	-	-	-
224	V	-	-	-	-	a	-
<b>P-Protein</b>							
AA	D	1	2	3	4	5	6
10	R	K	-	-	-	-	-
81	N	-	-	D	-	-	-
90	K	-	-	R	e	-	-
118	K	-	N	-	-	-	N
178	D	-	-	-	-	-	K
201	S	-	-	-	-	P	-
208	R	-	C	-	-	-	-
211	R	-	-	-	-	G	-
236	F	-	-	-	-	-	T
257	F	-	-	C	-	-	H
261	S	-	-	-	-	p	-
265	L	-	-	F	-	-	-
266	H	-	-	-	-	-	Y
268	S	-	-	-	-	A	-
270	V	-	-	D	-	-	-
278	V	-	-	L	-	-	-
283	K	-	N	-	R	R	R
288	G	-	-	-	-	D	-
289	H	-	-	-	-	∅	∅
290	A	-	-	-	-	P	-
293	F	-	L	-	L	L	L
294	H	-	-	-	-	-	Q
297	P	S	-	-	-	-	-
307	R	-	-	-	-	S	S
308	P	-	-	-	-	∅	∅
AA	D	1	2	3	4	5	6
309	V	-	-	-	-	∅	∅
310	F	-	-	L	S	∅	∅
319	N	S	-	-	-	-	-

328	L	-	-	-	-	-	I
330	L	-	-	-	-	-	H
342	A	-	-	-	-	T	-
351	I	-	-	-	-	T	-
353	R	-	-	-	-	S	-
356	S	-	-	-	-	-	A
358	V	-	-	-	I	-	-
373	A	-	-	-	-	-	E
388	N	-	-	-	K	t	-
389	Y	-	-	-	D	H	-
426	L	-	-	-	-	I	-
450	L	-	-	-	V	-	-
459	N	H	H	-	H	H	Y
465	P	S	-	-	-	-	Q
466	D	N	N	N	N	H	-
470	Y	-	S	-	S	-	H
583	N	-	-	-	-	-	H
591	C	S	-	-	-	-	-
592	Y	-	-	-	H	-	-
598	E	-	-	-	-	-	D
601	I	-	V	r	V	-	-
605	K	-	-	-	t	-	-
606	E	-	-	D	-	-	-
613	I	-	V	V	V	V	V
648	A	V	-	-	-	-	-
652	S	-	A	-	A	-	-
660	P	s	-	-	-	-	-
667	C	-	S	-	-	-	-
671	L	-	M	-	-	-	-
698	V	-	-	-	A	-	-
699	M	-	-	-	I	-	-
709	S	-	-	L	L	L	Q
731	A	-	T	-	-	-	-
732	N	-	K	-	-	-	-
734	I	-	-	-	-	-	L
746	Y	-	-	-	-	-	F
749	F	y	-	-	-	-	-
786	L	-	-	I	-	-	-
787	S	-	Y	-	-	-	-
807	D	-	-	A	-	-	-
817	D	-	V	-	-	-	-
829	W	-	-	∅	-	-	-
				/	C		
830	R	-	-	-	-	k	-

**Tabellen 3-6:** Die vier Tabellen stellen alle Aminosäureaustausche in den HBV-Populationen der 6 Patienten mit FHB/D dar. Seltene (Kleinbuchstaben) und einzigartige (Großbuchstaben) Veränderungen sind schattiert dargestellt (Nomenklatur entsprechen den Empfehlungen der International Union of Biochemistry). Deletionen

wurden mit dem Symbol  $\emptyset$  dargestellt. Abkürzungen: AA: Position des Aminosäureaustausches, D: Aminosäure des Referenzgenoms mit Genotyp D, 1-6: Aminosäureaustausche in den HBV-Populationen der Patienten 1-6.

### 3.1.2.1 Veränderungen in der Aminosäuresequenz der Precore-/Core-Region

Veränderungen der Aminosäuresequenz präsentierten sich bei den untersuchten HBV-Populationen gehäuft in der Precore-/Core-Region. Eine bereits erwähnte Precore-Stopkodon-Mutation im Kodon 28, von der Assoziationen zu fulminanten Verläufen beschrieben wurden, fand sich in zwei der sechs untersuchten Genome. Zusätzlich wurden in zwei Sequenzen Precore-Startkodon-Mutationen gefunden. Die für die Sekretion und Antigenität bedeutungsvollen Cysteinpositionen 23 (Precore) und 61 (Core) (Nassal und Riegel, 1993) waren unverändert. Ebenso konstant blieben die strukturell und damit auch für die Antigenität wichtigen Cysteinpositionen 48, 107 und 183 der Core-Region (Zheng et al., 1992).

### 3.1.2.2 Veränderungen in der Aminosäuresequenz der Pre-S-/S-Region

In allen sechs untersuchten HBV-Populationen zeigten sich Aminosäureaustausche im großen Hüllprotein, bestehend aus dem Pre-S1-, Pre-S2- und dem S-Region. Die für die Antigenität bedeutsame "a"-Determinante (Kodon 124-147), insbesondere die Cysteine in den Positionen 124, 137, 139 und 147, blieben unbeeinflusst. In vier von sechs Fällen kam es am Kodon 125 zu einem Austausch von Methionin und Threonin und in drei von sechs Fällen am Kodon 127 zu einem Austausch von Threonin und Prolin, wie sie jedoch auch bei Patienten ohne FHB gefunden wurden. In zwei Fällen fand sich eine bereits erwähnte Pre-S2-Startkondeletion in Verbindung mit einer Deletion von drei weiteren Aminosäuren im Pre-S2-Bereich (Leucin, Thyrosin, Phenylalanin; Kodon 128-130; Abb. 19). Die für die Sekretion von Viruspartikeln essentiellen Cysteine in den Positionen 48, 65 und 69 der S-Region (Mangold et al., 1993) blieben in allen Fällen erhalten.

### 3.1.2.3 Veränderungen in der Aminosäuresequenz der P-Region

In der P-Region waren Aminosäureaustausche vorwiegend in der Spacer-Region (Aminosäure 181-340), in der Polymerase-/Reverse-Transkriptase-Domäne (Aminosäure 341-680) und der RNase-H-Region (Aminosäure 681-832) zu finden (Nassal und Schaller, 1993). Eine Unterbrechung des P-Leserahmens durch eine Stopkodonmutation war nicht nachweisbar. Die im Pre-S2-Bereich nachgewiesenen Deletionen fanden sich in diesem Leserahmen in der Spacer-Region wieder. Relativ wenige Austausche zeigten sich in der für die Polymerasefunktion wichtigen Domäne des terminalen Proteines, insbesondere blieben das

"priming Tyrosin" in Position 63 (Weber et al., 1994) sowie die benachbarten Aminosäuren (18-80) unverändert. Ein Teil des aktiven Zentrums der Reversen Transkriptase, das sogenannte „YMDD Motiv“ (Aminosäure 538-541), wies in keinem Fall Veränderungen auf.

#### 3.1.2.4 Veränderungen in der Aminosäuresequenz der X-Region

In fünf der sechs untersuchten Fälle konnten Veränderungen der Aminosäuresequenz des X-Proteins gefunden werden. Zwei Domänen, im Areal um die Aminosäure 70 sowie um die Aminosäure 130, scheinen eine essentielle Bedeutung für die Transaktivierungsfunktion zu besitzen (Runkel et al., 1993). Während die Region in der Umgebung der Position 70 (49-79) in allen untersuchten Fällen konstant blieb, gab es in zwei Sequenzen Veränderungen im Areal um die Aminosäure 130. Mutationen im Bereich der der Kunitz-Domäne ähnlichen Region, welche die Transaktivierungsfunktion beeinflussen könnten (Takada et al., 1994), traten nicht auf.

## 3.2 Veränderungen der HBV-Population bei Patienten mit fulminanter HBV/HDV-Reinfektion nach Lebertransplantation

### 3.2.1 Veränderungen der HBV-Nukleotidsequenz im Verlauf

Ziel dieses Teils der Studie war es, die strukturellen Unterschiede der HBV-Population zu analysieren, die bei den gleichen Patienten zum Zeitpunkt einer chronischen HBV-Infektion und einer fulminanten Reinfektion nach Lebertransplantation existieren. Es ist möglich, daß die Veränderungen in der Viruspopulation für die schwere Exazerbation des Krankheitsverlaufs ausschlaggebend sind. Hierzu wurden die kompletten DNA-Sequenzen der HBV-Genome zweier Patienten während einer chronischen HBV-Infektion und während einer fulminanten Hepatitis nach einer orthotopen Lebertransplantation untersucht. Da die HBV-Genome dem Genotyp D am ähnlichsten waren, wählten wir dieses als Referenzgenom für die Sequenzanalyse (Galibert et al., 1979).

Zahlreiche Mutationen wurden in allen Bereichen des Genomes gefunden. Der überwiegende Teil davon konnte sowohl vor, als auch nach Lebertransplantation nachgewiesen werden. In Tabelle 7 sind alle identifizierten Sequenzunterschiede aufgeführt.

Pos.	D	5	5	6	6
		p	p	p	p
		r	o	r	o
		ä	s	ä	s
		t	t	t	t
213	T	-	-	<b>c</b>	-
242	C	-	-	<b>a</b>	<b>r</b>
300	T	<b>K</b>	-	-	-
532	T	-	-	<b>Y</b>	<b>C</b>
825	T	<b>A</b>	<b>c</b>	-	-
826	A	<b>T</b>	-	-	-
827	T	<b>A</b>	-	-	-
881	G	<b>k</b>	-	-	-
931	A	<b>C</b>	-	-	-
949	A	C	-	-	-
1077	A	-	-	-	<b>g</b>
1080	T	-	-	-	G
1083	G	-	R	-	-

Pos.	D	5	5	6	6
		p	p	p	p
		r	o	r	o
		ä	s	ä	s
		t	t	t	t
1092	C	-	-	-	T
1097	T	<b>C</b>	-	-	-
1249	T	-	C	-	-
1250	C	-	T	-	-
1495	C	<b>M</b>	-	-	-
1613	G	-	<b>a</b>	-	-
1635	A	<b>M</b>	-	-	-
1637	A	-	-	-	C
1678	C	-	-	T	-
1724	T	-	-	-	<b>c</b>
1754	T	-	<b>G</b>	-	-
1755	A	<b>R</b>	-	-	-
1816	G	-	-	-	<b>T</b>

Pos.	D	5	5	6	6
		p	p	p	p
		r	o	r	o
		ä	s	ä	s
		t	t	t	t
1899	G	-	A	-	-
1913	C	-	<b>T</b>	-	-
1984	A	-	-	<b>T</b>	-
2024	T	-	-	<b>c</b>	-
2029	G	-	-	<b>S</b>	-
2092	A	-	-	R	-
2093	C	-	-	T	-
2200	C	-	-	A	R
2289	C	-	M	-	-
2405	C	<b>K</b>	<b>a</b>	-	-
2609	T	-	-	-	C
3013	T	-	-	-	Y
3076	T	-	-	<b>W</b>	<b>A</b>

**Tabelle 7:** Darstellung aller Sequenzunterschiede der HBV-Populationen zum Zeitpunkt der chronischen (prä) und der fulminanten (post) Infektion. Regionen mit regulatorischer Bedeutung (ENH I-XP, ENH II-CP, SP I, SP II) sind in der linken Positionsspalte schattiert; Mutationen, die im Vergleich mit 35 Genomen chronischer Hepatitiden einzigartig sind, wurden als Großbuchstaben fettgedruckt, solche, die bei diesem Vergleich selten auftraten (nicht mehr als 3mal), wurden als Kleinbuchstaben fettgedruckt und jeweils schattiert dargestellt. Die Nomenklatur richtet sich nach den Empfehlungen der International Union of Biochemistry (Heterogenitäten: M= A oder C, Y= T oder C, K= G oder T, W= A oder T, R= A oder G, S= G oder C). Deletionen wurden mit dem Symbol Ø dargestellt. Abkürzungen: Pos.: Nukleotidposition mit Mutation, D: Nukleotid des Referenzgenoms vom Genotyp D (ayw), 5 bzw. 6: Nukleotidveränderungen in den HBV-Populationen der Patienten 5 bzw. 6.

Berücksichtigt man den Zeitraum, in dem sich diese Veränderungen entwickelten (sieben bzw. vier Monate), erkennt man eine eher geringe Anzahl von Veränderungen ( $1,1 \times 10^{-2}$  bzw.  $1,8 \times 10^{-2}$  Mutationen pro Seite und Jahr). Es konnte jedoch keine bestimmte Mutation identifiziert werden, die in beiden Fällen im Rahmen des fulminanten Krankheitsverlaufes neu auftrat. Die Genomveränderungen zeigten eine leichte, nicht signifikante Häufung in den cis-acting regulatory elements. Daneben zeigte sich keine Veränderung der Kortikoidrezeptorregion (Nukleotidpositionen 338-367, Tur-Kaspa et al., 1988).

### **3.2.2 Veränderungen der Aminosäuresequenz im Verlauf**

Die Unterschiede zwischen den Aminosäuresequenzen der HBV-Populationen der Patienten 5 und 6 zum Zeitpunkt der chronischen und fulminanten Infektion sind in den Tabellen 8-11 dargestellt. Ausgesprochen wenig Aminosäureveränderungen zeigten sich im Precore- und Core-Bereich. Insbesondere die für die Sekretion und Antigenität des HBeAg wichtigen Cysteine in den Positionen 23 der Precore-Region bzw. 61 der Core-Region (Nassal und Rieger, 1993) sowie die strukturell und immunologisch bedeutsamen Cysteine in den Positionen 48, 61, 107 und 183 des Core-Proteins (Zheng et al., 1992) blieben in allen Fällen unverändert. Ein interessanter Befund dieser Studie ist, daß zum Zeitpunkt der fulminanten Infektion die Viruspopulationen beider Patienten kein HBeAg exprimieren konnten. In einem Fall bildete sich dieser Defekt erst nach der Lebertransplantation heraus, indem das Precore-Initiationskodon mutierte. In dem anderen Fall lag eine Precore-Stopkodonmutation in Position 1896 vor und nach der Lebertransplantation vor.

In beiden Fällen wurde eine Deletion der Pre-S2-Initiation, die mit einer weiteren Deletion von 3 Aminosäuren im Pre-S2-Bereich kombiniert war, gefunden. Dadurch wurde die Synthese des mittleren S-Proteins verhindert. Diese Veränderung trat sowohl während des chronischen, als auch während des fulminanten Krankheitsverlaufes gleichermaßen auf. Beide Patienten wurden mit polyklonalen anti-HBsAg-Immunglobulinen behandelt. Unter dieser Therapie trat keine neue Mutation im Bereich der immunologisch bedeutsamen „a“-Determinante der Surface-Region auf. Die für die Sekretion viraler Partikel essentiellen Cysteine in den Positionen 48, 65 und 69 der S-Region (Mangold et al., 1993) blieben in allen Fällen konserviert.

Es zeigten sich nur wenige Veränderungen in den funktionell bedeutenden Bereichen des Polymerase-Proteins, einschließlich des Priming Tyrosin, der reversen Transkriptase sowie der RNase H. Die Kunitz-Domänen-ähnliche Region des X-Proteines zeigte sich in keinem Fall mutiert.

C-Protein					
AA	D	5	5	6	6
		p	p	p	p
		r	o	r	o
		ä	s	ä	s
		t	t	t	t
1	M				I
29	G	-	D	-	-
C-Protein					
5	P	-	S	-	-
130	P	-	Q	-	-
169	Q	E	K	-	-

Pre-S-Protein					
AA	D	5	5	6	6
		p	p	p	p
		r	o	r	o
		ä	s	ä	s
		t	t	t	t
56	F	-	-	-	L
77	L	-	-	-	M
S-Protein					
49	L	R	-	-	-
224	V	D	a	-	-
225	Y	N	-	-	-

P-Protein					
AA	D	5	5	6	6
		p	p	p	p
		r	o	r	o
		ä	s	ä	s
		t	t	t	t
236	F	-	-	I	T
257	F	-	-	L	H
603	K	Q	-	-	-
658	F	S	-	-	-
709	S	-	L	-	-
791	L	I	-	-	-
830	R	-	k	-	-

X-Protein					
AA	D	5	5	6	6
		p	p	p	p
		r	o	r	o
		ä	s	ä	s
		t	t	t	t
41	S	Y	-	-	-
88	I	-	-	L	F
102	A	-	-	V	-
127	I	-	M	-	-
148	C	-	-	-	F

**Tabellen 8-11:** Die vier Tabellen stellen alle Veränderungen in der Aminosäuresequenz in den offenen Leserahmen dar, die sich, ausgehend vom chronischen Infektionsstatus, zum fulminanten Krankheitsverlauf ereignet haben, seltene (Kleinbuchstaben) und einzigartige (Großbuchstaben) Veränderungen sind schattiert dargestellt. Die Nomenklatur richtet sich nach den Empfehlungen der International Union of Biochemistry. Deletionen wurden mit dem Symbol Ø dargestellt. Abkürzungen: AA: Position des Aminosäureaustausches, D: Aminosäure des Referenzgenoms mit Genotyp D, 5 und 6: Veränderungen in der Aminosäuresequenz in den HBV-Populationen der Patienten 5 und 6, prä: Zeitpunkt der chronischen Infektion, post: Zeitpunkt der fulminanten Infektion.

### 3.2.3 Hepatische Expression von HBV- und HDV-Antigenen

In den explantierten Lebern der Patienten 5 und 6 wurde HBsAg in kleineren Hepatozytengruppen exprimiert. HBcAg wurde mit nukleärer und zytoplasmatischer Lokalisation in zirrhotischen Knoten verstreut, insgesamt in weniger als 10% der Hepatozyten detektiert. HDAg war ebenfalls vereinzelt in den Explantaten beider Patienten festzustellen. Die postmortal entnommenen Leberproben zeigten eine massiv erhöhte HBV-Proteinexpression in mehr als 90% der verbleibenden Hepatozyten mit einer starken Immunfärbung für HBsAg und HBcAg. In Analogie hierzu war auch eine erhöhte HDAg Expression mit nukleärer und zytoplasmatischer Lokalisation festzustellen.

### 3.3 HBV-Varianten bei fulminanten Hepatitiden mit und ohne HDV-Koinfektion

Parallel zu der hier durchgeführten kompletten Sequenzanalyse von HBV-Genomen von Patienten mit FHB und HDV-Koinfektion, wurden die HBV-Genome von 9 Patienten mit FHB ohne HDV-Koinfektion untersucht. Die folgenden strukturellen Charakteristika fanden sich in den HBV-Varianten der Patienten ohne HDV-Koinfektion (Sterneck et al., 1996):

- Es wurde keine spezifische, allen Genomen gemeinsame Mutation gefunden. Statt dessen fanden sich zahlreiche, z.T. vorher nicht beschriebene Mutationen in den verschiedenen Genombereichen.
- Mutationen, die die HBeAg-Expression verhindern, insbesondere die Precore-Stopkodon-Mutante in Position 1896, fanden sich bei ca. der Hälfte der Fälle (4/9).
- Mutationen, für die in vitro gezeigt wurde, daß sie die HBeAg-Expression verringern können (T-1762/A-1764), waren in einem Drittel der Fälle vorhanden (3/9).
- Eine Häufung von neuen und seltenen Mutationen wurde in der Region des ENH II/Core Promotors gefunden.

Im Einklang mit diesen Ergebnissen fanden sich auch bei den HDV-koinfizierten Patienten mit FHB zahlreiche neue Mutationen in den offenen Leserahmen des HBV-Genoms, wobei keine Einzelmutation als spezifisch für den fulminanten Verlauf identifiziert wurde. Desweiteren wurden auch die Mutationen, die die HBeAg-Expression verhindern können, in ähnlich hoher Frequenz, nämlich bei zwei Dritteln der Fälle gefunden (4/6), wobei bei zwei Populationen eine Precore-Startkodonmutante (T-1816) und in weiteren zwei Populationen eine Precore-Stopkodon-Mutante (A-1896) vorlag. Die oben aufgeführte Mutation (T-1762/A-1764) war in nur einem Fall (1/6) existent. Übereinstimmend mit den o.g. Daten, fand sich auch in den Fällen mit HDV-Koinfektion eine Häufung von Mutationen in der Region des ENH II/Core Promotor.

## **4 Diskussion**

### **4.1 Ziel dieser Studie**

Die Pathogenese der fulminanten Hepatitis B und der fulminanten Hepatitis B/D ist weitgehend ungeklärt. Sowohl virale als auch wirtsspezifische Faktoren spielen vermutlich eine Rolle.

In der vorliegenden Studie wurde untersucht, ob die fulminante HBV-/HDV-Infektion mit dem Vorkommen bestimmter HBV-Varianten assoziiert ist. Hierzu wurde die gesamte HBV-DNA-Sequenz von sechs Patienten mit fulminanter Hepatitis B/D analysiert. Vier dieser Patienten hatten eine fulminante Hepatitis B mit HDV-Koinfektion. Zwei Patienten entwickelten nach einer orthotopen Lebertransplantation (LTx) eine fulminant verlaufende HBV-/HDV-Reinfektion, wobei vor der Transplantation eine chronische Hepatitis B/D bestand. Von diesen Patienten wurde sowohl HBV-DNA vor der Transplantation, d.h. im chronischen HBV-Infektionsstatus, als auch zum Zeitpunkt der fulminanten Reinfektion untersucht. Ziel hierbei war es festzustellen, ob gleiche oder unterschiedliche Viruspopulationen zum Zeitpunkt der chronischen bzw. der fulminanten Infektion vorliegen. Dieses in-vivo-Modell ist deshalb so interessant, weil jeweils bei dem gleichen Patienten zwei verschiedene Verlaufsformen der Hepatitis B/D nacheinander ablaufen, wobei aufgrund der starken immunsuppressiven Therapie nach der Lebertransplantation eine aggressive Immunabwehr des Wirtes als pathogenetischer Faktor eine nur untergeordnete Rolle spielen dürfte. Zusätzlich könnte die Behandlung der Patienten mit Anti-HBs-Hyperimmunglobulin als Selektionsfaktor bedeutsam sein. Bislang ist nicht bekannt, ob bestimmte Viruspopulationen nach einer Lebertransplantation selektioniert werden oder ob die gleiche Viruspopulation erneut auftritt und die in unseren Fällen fulminante Reinfektion bewirkt haben könnte. Durch die Explantation der chronisch infizierten Leber wird der Hauptviruspool entfernt. Die Reinfektion des neu implantierten Organs erfolgte vermutlich durch eine Subpopulation aus einem bislang extrahepatischen Viruspool.

## 4.2 Originalität der vorliegenden Arbeit

In mehreren vorangegangenen Arbeiten wurden Teilbereiche, insbesondere die Precore-Region der HBV-Genome von Patienten mit FHB analysiert. Diese Studien legen die Vermutung nahe, daß bestimmte Mutationen mit einem fulminanten Verlauf assoziiert sind. Aber bislang existierten kaum Daten über die Nukleotidsequenz des gesamten Genoms, obgleich in allen Bereichen potentiell bedeutungsvolle Mutationen für die Immunogenität und Replikationskompetenz des Virus vorhanden sein könnten.

Zu Beginn dieser Studie existierten nur zwei Arbeiten, die die gesamte HBV-DNA-Sequenz von Virusvarianten, welche bei fulminanter Hepatitis B gefunden wurden, untersucht hatten. Eine Studie, die das gesamte HBV-Genom bei gleichzeitigem Vorliegen einer HDV-Koinfektion analysierte, existierte nicht. Verglichen mit den Resultaten der Studien, die bei fulminanten Verläufen einzelne Genombereiche auswerten, zeigten sich zum Teil unterschiedliche, mitunter gegensätzliche Ergebnisse. Hier war es also notwendig, weitere Sequenzdaten aus allen Bereichen des HBV-Genoms zu gewinnen und auszuwerten.

Ein ursächlicher Mechanismus, warum HBV/HDV-Infektionen in einem höheren Prozentsatz fulminant verlaufen (Smedile et al., 1982), konnte bislang noch nicht nachgewiesen werden. Unsere Studie untersucht u.a., ob sich die HBV-Varianten bei Patienten mit FHB und HDV-Koinfektion von denen mit ausschließlicher FHB unterscheiden. Auch hierbei wurden alle Bereiche des HBV-Genoms berücksichtigt.

In dem zweiten Teil der vorliegenden Studie wurden die HBV-Varianten zum Zeitpunkt einer chronischen Infektion mit denen, die bei einer fulminanten Reinfektion nach Lebertransplantation bei dem selben Patienten isoliert wurden, verglichen. Eine derartige Untersuchung unter Berücksichtigung des gesamten Virusgenoms ist bisher einzigartig. Die bislang vorliegende Literatur gibt keine Auskunft darüber, ob die gleiche Viruspopulation beide klinischen Verläufe hervorrufen kann oder ob sich zum Zeitpunkt der unterschiedlichen klinischen Verläufe auch deutliche Veränderungen im HBV-Genom finden.

### 4.3 Methodische Aspekte

Aufgrund der zu niedrigen Konzentration der HBV-DNA im Serum der untersuchten Patienten war eine direkte Virusisolierung aus dem Serum und eine anschließende Sequenzierung nicht möglich. Statt dessen mußte die HBV-DNA zunächst durch PCR-Technik amplifiziert werden. Wegen der Kopierungenauigkeit der Polymerase können hierbei jedoch artifiziell Mutationen in das Genom eingefügt werden. Hierzu durchgeführte Untersuchungen (Günther et al., 1997) ergaben eine Fehlerrate der Taq-Polymerase von etwa  $12,1 \times 10^{-5}$ , d.h. es muß mit etwa 6 fehlerhaften Nukleotidaustauschen bei der Amplifikation des 3,2 kb umfassenden HBV-Genoms gerechnet werden. Um diese Artefakte als solche zu erkennen, wurden im Rahmen dieser Studie verschiedene, einander überlappende Teilbereiche des HBV-Genoms zweimal in voneinander unabhängigen PCR-Ansätzen amplifiziert und anschließend sowohl Plus- als auch Minusstrang sequenziert. Nicht reproduzierbare Nukleotidaustausche wurden als PCR-Artefakte interpretiert und in der Analyse nicht berücksichtigt.

Die durch die Direktsequenzierung von PCR-Produkten ermittelte Nukleotidsequenz repräsentiert die jeweils dominante HBV-Population der Patienten. Voruntersuchungen zeigten, daß virale Quasispezies als Heterogenität in der Nukleotidsequenz ab einem Anteil von 20% am Gesamtviruspool nachweisbar waren.

Unsere Studie erlaubt keine Aussage darüber, ob möglicherweise hepatisch lokalisierte Virusvarianten für den fulminanten Verlauf entscheidend gewesen sind. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, daß die HDV-Koinfektion, auf die bereits näher eingegangen wurde, zum fulminanten Krankheitsverlauf beigetragen hat. Unter Berücksichtigung der Tatsache, daß eine bestehende HDV-Infektion nach LTx die Gefahr eines HBV-induzierten, schweren Leberschadens zu reduzieren scheint, wurde der direkte Einfluß von HDV bei der fulminanten Reinfektion als gering eingestuft (Lucey et al., 1992).

## **4.4 Mutationen im HBV-Genom von 6 Patienten mit FHB/D**

### **4.4.1 Allgemeine Aspekte von HBV-Mutanten**

Die Mutationsrate des Hepatitis-B-Virus beträgt etwa  $4,6 \times 10^{-5}$  Mutationen pro Nukleotidposition und Jahr (Orito et al., 1989). Damit gilt das hepadnavirale Genom während der Replikation im natürlichen Wirt als relativ stabil. Seine Mutationsrate ist 100- bis 1000fach geringer als die der RNA-Viren, jedoch 100fach höher als die anderer DNA-Viren. Bestimmte, durch Selektion dominierende Virusvarianten könnten überlebensfähiger sein als das Wildtypvirus und möglicherweise durch Änderung der Antigenität der Variante, Änderung der Replikationseffizienz oder durch die Entwicklung eines zytotoxischen Effektes den Krankheitsverlauf beeinflussen.

### **4.5 HBeAg-defekte Virusvarianten bei FHB/D**

Eine Assoziation zwischen dem Auftreten einer Precore-Stopkodonmutation in Position 1896 und fulminanter Hepatitis B wurde bereits in vorangegangenen Untersuchungen postuliert. Allerdings wurde diese Mutation hauptsächlich bei endemisch auftretenden, fulminant verlaufenden Hepatitiden in Japan (Yotsumoto et al., 1991; Omata et al., 1991; Kojima et al., 1991), in Israel (Liang et al., 1991) und im Mittelmeergebiet (Carman et al., 1991) gefunden (durchschnittlich 74%, 103 von 139 Patienten). Im Gegensatz dazu zeigte sich in Studien aus nicht endemischen Gebieten, die sich ebenfalls mit dem Zusammenhang von HBV-Genomveränderung und fulminantem Krankheitsverlauf befaßten, nur eine geringe Häufigkeit der genannten Mutation. So waren in Mitteleuropa (Feroy et al., 1993) und in den Vereinigten Staaten (Liang et al., 1994) derartige Virusmutanten unterrepräsentiert (durchschnittlich 27%, 24 von 89 Patienten).

Im Vergleich mit den vorbeschriebenen epidemiologischen Befunden bezüglich des Auftretens von Precore-Stopkodonmutationen in Nukleotidposition 1896 bei fulminanten HBV-Infektionen in endemischen Gebieten (Liang et al., 1991 und 1994; Laskus et al., 1993; Hasegawa et al., 1991; Ehata et al., 1993) trat diese Veränderung in den Sequenzdaten der HBV-Populationen unserer Patienten, welche ebenfalls alle aus Regionen mit hoher Hepatitis-B-Prävalenz stammten (Italien und Indien), seltener auf (in 2 von 6 Fällen, 33%). Zusätzlich fanden sich aber bei zwei weiteren Patienten (2/6) Mutationen des Precore-Startkodons, die

ebenfalls die Expression des HBeAg verhindern. Damit war die dominierende Viruspopulation in vier von sechs Fällen nicht zur HBeAg-Expression befähigt. In Übereinstimmung hierzu zeigt sich in den entsprechenden serologischen Untersuchungen ein HBeAg-negativer Status. Darüber hinaus wies die Viruspopulation von Patient 4 eine Kombination zweier Mutationen im Core Promotor auf (T-1762/A-1764, Sato et al., 1995), für die in vitro eine reduzierte HBeAg-Synthese nachgewiesen wurde (Moriyama et al., 1996; Buckwold et al., 1996). Damit weisen fünf der sechs untersuchten Viruspopulationen einen HBeAg-defekten Phänotyp auf, wenngleich die HBeAg-Expression bei T-1762/A-1764-Mutanten nicht vollständig inhibiert ist. Zusätzlich war auch der serologische Status des Patienten 3 HBeAg-negativ, obwohl keine der genannten Mutationen (Precore-Start- und Precore-Stopkodonmutation sowie T-1762/A-1764-Mutation im Core Promotor) vorlag, so daß spekuliert werden kann, daß andere Mutationen im Core Promotor ebenfalls zu einem HBeAg-defekten Phänotyp geführt haben könnten. Trotzdem muß berücksichtigt werden, daß auch bei akuten, selbstlimitierenden (Laskus et al., 1995), chronisch persistierenden (Okamoto et al., 1990; Omi et al., 1990) sowie bei chronisch aggressiven HBV-Infektionen eine solche Mutation gefunden werden kann (Tur-Kaspa et al., 1992).

	Precore-Stopkodonmutation: A-1896	Core-Promotormutation: T-1762/A-1764
Endemiegebiete <sup>1</sup>	74% (103/139)	60% (32/53),
Nicht-Endemiegebiete <sup>2</sup>	27% (24/89)	19% (8/49)
Eigene Daten	33% (2/6)	17% (1/6)

**Tabelle 12:** Unterschiedliche Häufigkeit des Auftretens von Viruspopulationen mit den genannten Mutationen (T-1896, T-1762/A-1764), 1-Quellen für die Endemiegebiete: Japan (Asahina et al., 1996; Kosaka et al., 1993; Kojima et al., 1991; Hasegawa et al., 1991 und 1994; Omata et al., 1991; Ehata et al., 1993; Aye et al., 1994; Ogata et al., 1993; Sato et al., 1995; Kaneko et al., 1995), Israel (Liang et al., 1991), Taiwan (Hsu et al., 1995; Chu et al., 1996), Mittelmeerraum (Carman et al., 1991). 2-Quellen für die Nicht-Endemiegebiete: USA und Mitteleuropa (Carman et al., 1991; Liang et al., 1994; Laskus et al., 1993; Feray et al., 1993)

Vergleicht man die Häufigkeit von HBeAg-Synthese-Defekten in unserem HDV-positiven Untersuchungsgut mit HDV-negativen fulminanten HBV-Infektionen (Sterneck et al., 1996), so kann festgestellt werden, daß beide Gruppen eine ähnliche Frequenz HBeAg-defekter Varianten aufweisen: In der HDV-positiven Gruppe waren vier von sechs, in der HDV-negativen Gruppe vier von neun Viruspopulationen unfähig, das HBeAg zu synthetisieren.

Die Tatsache, daß sowohl bei der Viruspopulation von Patient 5 als auch bei einer Vergleichsviruspopulation (Sterneck et al., 1996) der HBeAg-Synthesedefekt sowohl während der chronischen Infektion als auch im Rahmen der fulminanten Reinfektion vorhanden war, läßt zunächst diese Veränderung als alleinige Ursache für einen fulminanten Krankheitsverlauf unwahrscheinlich erscheinen. Trotzdem schließen die Beobachtungen dieser Studie eine Mitbeteiligung HBeAg-defekter Virusvarianten bei der Pathogenese der fulminanten Reinfektion keineswegs aus, sondern könnten diese These sogar stützen. Es existieren einige Publikationen, die über die Transmission HBeAg-defekter Virusvarianten von einem chronischen Träger auf einen neuen Wirt berichten, bei dem diese Mutanten eine fulminante Infektion auslösten. So wurde die fulminante Infektion durch chronische Träger HBeAg-defekter Virusvarianten zwischen Geschlechtspartnern (Fagan et al., 1986), zwischen Mitgliedern des gleichen Haushaltes (Kosaka et al., 1993) und im Rahmen nosokomialer Infektionen (Liang et al., 1991 und Oren et al. 1989) übertragen. Bemerkenswert ist auch die Beobachtung, daß Neugeborene anti-HBe-positiver Mütter, die mit einer solchen Virusvariante infiziert sind, gehäuft fulminante Hepatitiden entwickeln, wohingegen Kinder HBeAg-positiver Mütter in der Regel einen chronischen Trägerstatus, aber fast nie einen fulminanten Krankheitsverlauf entwickeln (Terazawa et al., 1991; Milich et al., 1990; Beath et al., 1992). Im Einklang mit diesen Berichten könnte die Infektion des neuen Wirtes bzw. in unserem Fall die der Spenderleber mit einer HBeAg-defekten Variante zu einem fulminanten Krankheitsverlauf beitragen.

#### **4.5.1 Hypothesen zur Bedeutung von HBeAg für den fulminanten Verlauf**

In der Vergangenheit wurde vermutet, daß HBeAg eine starke Immunantwort des Wirtes bedingt. Liegt nun eine verminderte oder fehlende HBeAg Expression vor, könnte dies ein initiales „Immune Escape“ bewirken, das zu einem ungehinderten Befall zahlreicher Hepatozyten führt (Baumert et al., 1996). In einem später folgenden Schritt der Infektion kommt es nun zu einer heftigen Immunreaktion gegen andere virale Proteine und damit zur ausgedehnten Nekrose aller infizierten Hepatozyten. Übereinstimmend mit dieser Hypothese wurde von fulminant exazerbierenden, HBeAg-negativen chronischen Hepatitiden berichtet, die nach Abbruch einer immunsuppressiven Medikation auftraten (Carman et al., 1995; Soh et al., 1992; Yoshida et al., 1992). In Übereinstimmung hiermit hatte einer der untersuchten Patienten (Patient 5) aufgrund eines hepatozellulären Karzinoms zusätzlich zur

immunsuppressiven Standardtherapie eine Chemotherapie mit Adriamycin erhalten. Dies ist als ein möglicher Auslösefaktor der fulminanten Reinfektion zumindest in Erwägung zu ziehen.

Neuere Studien legen jedoch die Vermutung nahe, daß das HBeAg das Immunsystem des Wirts nicht aktiviert, sondern im Gegenteil eher eine Toleranz induziert und damit eine „Chronizität-induzierende“ Wirkung hat. Vermutlich bewirkt HBeAg durch eine Modifizierung des Verhältnisses von TH1- zu TH2-Zellen eine Reduktion der CTL-Antwort (Milich et al., 1997). Ein Fehlen von HBeAg könnte damit im Umkehrschluß zu einer verstärkten CTL-Aktivierung führen. Bei chronisch infizierten Patienten, die eine im Verlauf der Infektion selektionierte HBeAg-defekte Variante aufweisen, führt diese bei generell reduzierter Immunantwort gegenüber HBV möglicherweise nur zu einer geringen oder gar keiner Immunstimulation. Diese Hypothese harmoniert mit der klinischen Beobachtung, daß nur ein Teil chronisch infizierter Patienten mit dem Auftreten HBeAg-negativer Varianten eine Exazerbation ihrer Hepatitis entwickelt (Brunetto et al., 1989). Im Rahmen einer Neuinfektion mit einer derartigen Variante würde es jedoch zu einer starken CTL-Aktivierung kommen und damit zu einer schnellen Zerstörung der infizierten Hepatozyten mit dem klinischen Korrelat eines akuten Leberversagens.

#### **4.5.2 Nukleotidveränderungen in der Core-Promotor-Region**

Neben dieser Precore-Stopkodonmutation wurde beschrieben, daß zwei weitere Mutationen mit einem fulminanten Verlauf in Endemiegebieten assoziiert sind. Hierbei handelt es sich um eine A-zu-T-Substitution in der Nukleotidposition 1762 sowie um eine G-zu-A-Substitution in der Nukleotidposition 1764 (Sato et al., 1995). Diese Veränderungen befinden sich im Core-Promotor-Bereich. Durch Transfektionsstudien in Zellkultur konnte eine dadurch beeinflusste, reduzierte HBeAg-Bildung demonstriert werden (Sato et al., 1995; Okamoto et al., 1994). Damit scheinen diese Veränderungen phänotypisch den Precore-Stopkodonmutanten bezüglich des HBeAg-Defektes zu ähneln. Dies wirft die Frage auf, ob alle Patienten mit fulminanter Hepatitis B, die nicht mit einer Precore-Stopkodonvariante infiziert sind, derartige Virusmutanten mit Veränderungen der Positionen 1762/1764 aufweisen, welche über den prinzipiell gleichen Mechanismus einer reduzierten HBeAg-Expression den Krankheitsverlauf beeinflussen (Sato et al., 1995). Eine Untersuchung an 43 Japanern zeigte in der Tat, daß bei allen fünf Patienten, die keine Precore-Stopkodonvariante

aufwiesen, die oben erwähnte Mutante gefunden wurde. Allerdings beschrieben Kaneko et al., 1995, Laskus et al., 1995, sowie Sterneck et al., 1997, einen z.T. dominierenden Anteil von Virusvarianten bei fulminanten Hepatitiden, bei denen weder die Position 1896 noch die Positionen 1762/1764 verändert waren.

Darüber hinaus wurden diese Mutationen auch bei akut selbstlimitierenden Verläufen und bei chronischen Verläufen dieser Mutationen gefunden (in ca. 27% der Fälle). Bei Patienten mit fortgeschrittener Zirrhose war der Prozentsatz noch höher.

In Übereinstimmung mit der Studie von T. Laskus et al. (1995) zeigte sich in unserer Studie nur in einem Fall (Patient 4) eine derartige Veränderung. Sterneck et al. (1996) konnten in 33% (3/9) der untersuchten Genome diese Veränderung nachweisen. Sowohl im FH- als auch im HT-Strang, der beiden zuvor komplett sequenzierten HBV-Genome von Patienten mit FHB (Ogata et al., 1993; Hasegawa et al., 1994), fanden sich diese Mutationen. Eine in den o.g. Studien erwähnte Kombination mit einer Precore-Stopkodonmutation fand sich in unseren Fällen nicht.

Die häufigsten Veränderungen in der Core-Promoter-Region betreffen die genannten Positionen 1762/1764. Es bleibt jedoch bislang unklar, ob diese Varianten eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der fulminanten Hepatitis B, z.B. über eine Reduktion der HBeAg-Expression, über eine veränderte virale Replikationsfähigkeit oder über einen derzeit noch unbekanntem Faktor, spielen. Abgesehen von den Mutationen in Position 1762/1764 wurden noch weitere zahlreiche Mutationen in der Core-Promoter-Region nachgewiesen, über deren funktionelle Auswirkungen insbesondere in Bezug auf die HBeAg-Expression jedoch bislang keine Daten existieren.

#### **4.5.3 Weitere Mutationen in Bereichen mit transkriptionsregulierenden Eigenschaften**

Mutationen in Bereichen sogenannter transkriptionsregulierender Elemente sind wegen ihrer möglichen funktionellen Konsequenz von besonderem Interesse. Während wir in der SP I-Region ausgesprochen wenig und in der SP II-Region zumindest keine Häufung von Mutationen fanden, zeigte sich eine deutliche Mutationshäufung in beiden Enhancerbereichen (vergleiche Abbildungen 15-17). Ein Mutationscluster fand sich im Bereich der Nukleotidpositionen 1750-1773 des ENH II-CP. Dieser Befund zeigt eine Übereinstimmung

mit den Sequenzdaten von Patienten mit FHB ohne HDV-Koinfektion von Ogata et al., 1993, Hasegawa et al., 1994, sowie Sterneck et al., 1996. In diesem Bereich des Core-Promotors sind Bindungsstellen mehrerer wichtiger Transkriptionsfaktoren (HNF4, RXR, PPAR) lokalisiert, die bedeutsam für die virale Genexpression und die prägenomische RNA-Synthese und damit für die Effizienz der Virusreplikation sind. Ebenso kamen Mutationen in Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren des ENH I-XP zur Darstellung, deren funktionelle Konsequenz jedoch noch weitgehend unklar ist.

#### **4.5.4 Die Untersuchung kompletter HBV-Genome bei FHB/D**

Die Relevanz weiterer Mutationen in anderen Bereichen des gesamten HBV-Genoms wurde bisher kaum untersucht. Das erste, als „HT-Strang“ bezeichnete, komplett sequenzierte HBV-Genom wurde aus dem Serum eines japanischen Kindes isoliert. Dieses Kind, selbst asymptomatischer Virusträger, stellte die Infektionsquelle für die fulminant verlaufende Hepatitis zweier Kinderärzte dar (Ogata et al., 1993). Experimentell mit diesem Serum infizierte Schimpansen entwickelten eine für diese Spezies außergewöhnlich schwere Hepatitis. Das zweite komplett sequenzierte HBV-Genom („FH-Strang“) stammt aus dem Serum eines Patienten mit fulminanter HBV-Infektion, die während eines epidemischen Ausbruchs fulminant verlaufender Hepatitiden in Israel auftrat (Liang et al., 1991; Hasegawa et al., 1991). In-vitro-Studien mit einem klonierten HBV-Genom dieses Patienten zeigten im Vergleich zum viralen Wildtypen eine erhöhte Replikationsfähigkeit (Hasegawa et al., 1994). Diese Studien wurden als Hinweis dafür gewertet, daß die Stränge FH und HT in die Pathogenese fulminanter HBV-Infektionen involviert sind. Beide Stränge weisen die bereits diskutierten Nukleotidsubstitutionen in den Positionen 1762 und 1764 sowie eine Precore-Stopkodonmutation auf. Darüber hinaus fanden sich bislang nicht beschriebene Mutationen im gesamten Genom. Über Konsequenzen der einzelnen Veränderungen kann derzeit nur spekuliert werden.

Betrachtet man die Ergebnisse der Studien, die sich mit dem gesamten Genom auseinandersetzen (Ogata et al., 1993; Hasegawa et al., 1994; Karayiannis et al., 1995; Asahina et al., 1996; Alexopoulou et al., 1996; Sterneck et al., 1996 und 1997), fällt auf, daß keine Einzelmutation, die spezifisch für den fulminanten Verlauf wäre, in allen untersuchten Genomen gleichermaßen zu identifizieren ist. In einigen der genannten Studien (Ogata et al., 1993; Hasegawa et al., 1994; Sterneck et al., 1996 und 1997) zeigte sich, wie vorne

beschrieben, eine Häufung einzelner Mutationen im Core-Promotor-Bereich. Allen untersuchten HBV-Varianten ist, passend zu unseren eigenen Befunden, eine weitgehend konservierte S-Region gemeinsam.

In Übereinstimmung mit den genannten Sequenzdaten konnten auch wir verschiedene, zum Teil bisher nicht beschriebene Mutationen in den HBV-Genomen der sechs Patienten unserer Studie identifizieren. Viele dieser Veränderungen sind im Vergleich mit den kompletten viralen Nukleotidsequenzen von 35 Patienten mit nicht fulminanten HBV-Infektionen als einzigartig oder selten zu bezeichnen. Die Mehrzahl dieser Mutationen existiert allerdings auch in den fulminanten Genomen (unter Einbeziehung der Stränge HT und FH) ohne Häufungstendenz. Daher kann aus unseren Daten keine einzelne, spezifische Mutation identifiziert werden, die für einen fulminanten Krankheitsverlauf verantwortlich gemacht werden kann.

#### **4.5.5 Der Einfluß einer HDV-Koinfektion auf die HBV-Population**

Ziel eines Teiles der Studie war es zu untersuchen, ob bestimmte Veränderungen im HBV-Genom für eine fulminante Hepatitis B bei bestehender HDV-Koinfektion charakteristisch sind. Es war also von Interesse, inwiefern die Anwesenheit des Hepatitis-D-Virus einen Selektionsdruck auf die HBV Population ausübt, der unter Umständen die Entwicklung bestimmter Virusvarianten zu begünstigen vermag.

Untersucht man vergleichend die Verteilung von Mutationen bei fulminanten HBV-Infektionen mit und ohne HDV-Koinfektion, so kann festgestellt werden, daß keine sicher signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen nachzuweisen sind. Nukleotidpositionen mit einer hohen Mutationsfrequenz sowie Regionen mit Mutationscluster sind in beiden Gruppen identisch.

Mutationscluster fanden sich sowohl in der Gruppe mit HDV-Koinfektion als auch in der entsprechenden Vergleichsgruppe vorwiegend in Bereichen mit transkriptionsregulierender Bedeutung, insbesondere im Core-Promotor. Das Verteilungsmuster war in beiden Gruppen kaum different. Die Unfähigkeit zur HBeAg-Synthese zeigte in der HDV-positiven Gruppe einen vergleichbaren Anteil (4/9 bei Patienten ohne und 4/6 bei Patienten mit HDV-

Infektion). Sowohl in der S- als auch in der Core-Region fanden sich in beiden Gruppen keine wesentlichen Veränderungen.

Ein signifikanter Selektionsdruck durch die Anwesenheit des HDV auf die HBV-Population kann aus den Daten unserer Sequenzanalysen bei sich nicht wesentlich unterscheidenden Genomen beider Gruppen also nicht geschlußfolgert werden.

#### **4.6 Virusvarianten mit erhöhter Replikationsrate**

Wie eingangs bereits erwähnt, ist ein Modell der Pathogenese der FHB in einer erhöhten viralen Replikationsrate von HBV zu sehen. Für die von Hasegawa et al. 1994 funktionell charakterisierte Virusvariante, welche zu einer FHB bei fünf Patienten führte, konnte nach Transfektion in humane Hepatomazellen eine gegenüber dem Wildtypvirus deutlich erhöhte Replikationsfähigkeit nachgewiesen werden (Liang et al., 1991). Das Genom dieser Variante wies unter anderem die Precore-Stopkodon-Mutation und die beiden zuvor mit der FHB assoziierten Mutationen im Bereich des Core-Promotors auf. In einer kürzlich veröffentlichten Studie konnte durch Oligonukleotid-gerichtete Mutagenese jedoch gezeigt werden, daß weder die Precore-Stopkodon- noch die T-1762/A-1764-Mutation, sondern zwei andere Substitutionen im Core Promotor (C-zu-T-Austausch in Position 1766 und T-zu-A-Austausch in Position 1768) für eine erhöhte Replikationskompetenz der untersuchten Variante entscheidend sind (Baumert et al., 1996). Aus diesen Mutationen resultiert eine effizientere Verpackung der C/prägenomischen mRNA in die Core-Partikel mit der Folge einer erhöhten Replikation der Virusvarianten (Hasegawa et al., 1994). Eine T-1766/A-1768-Variante wurde jedoch bislang bei keinem anderen Patienten mit FHB nachgewiesen.

Weiterhin wurde bei einem Patienten, der nach einer Herztransplantation eine fulminante Exazerbation der vorbestehenden Hepatitis B erlitt, eine HBV-Variante mit deutlich erhöhter Replikationseffizienz isoliert und in vitro untersucht (Pult et al., 1996). Der hochreplizierende Phänotyp konnte auf eine Insertion von 11 Basenpaaren im Bereich des Core Promotors zurückgeführt werden, wodurch eine neue Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor HNF 1 entsteht. Die Insertion trat zeitlich parallel mit der Exazerbation der Hepatitis B auf. Auch diese genetische Veränderung wurde bisher bei keinem anderen Genom beschrieben.

Die Beeinflussung der Replikationseffizienz durch eine Precore-Stopkodonmutation wird in der vorliegenden Literatur unterschiedlich beurteilt (Hasegawa et al., 1994; Baumert et al., 1996). In einigen Studien, bei denen eine Precore-Stopkodonmutation in ein Wildtypgenom experimentell eingefügt wurde, konnte eine erhöhte Replikationsfähigkeit der Variante *in vitro* festgestellt werden (Scaglioni et al., 1994; Lamberts et al., 1993). Im Gegensatz hierzu konnten andere *in-vitro*-Studien keine erhöhte Replikationseffizienz derartiger Varianten finden. Darüber hinaus zeigte sich *in vivo* im Murmeltiermodell ebenfalls kein hochreplizierender Phänotyp dieser Variante (Tong et al., 1992, Yuan et al., 1995). Resultierend kann vermutet werden, daß die Precore-Stopkodonvariante, wenn überhaupt, vermutlich nur zu einer geringen Erhöhung der Replikationsfähigkeit führt.

Die T-1762/A-1764-Mutante, die wir in einem Fall gefunden haben, zeigt in Transfektionsstudien eine im Vergleich zum Wildtypvirus erhöhte Replikationskompetenz (Moryami et al., 1996; Buckwold et al., 1996). Die hierfür ursächlichen Mechanismen wurden von den Autoren jedoch unterschiedlich erklärt. Während Moryama et al. eine erhöhte Menge von C/prägenomischer-mRNA intrazellulär fanden, sahen Buckwold et al. die erhöhte Replikation nicht als Folge einer gesteigerten Transkription, sondern als Resultat einer effizienteren Verpackung der C/prägenomischen-mRNA im Core-Partikel. Im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeiten wiesen andere Studien im Rahmen von Transfektionsexperimenten keine erhöhte Produktion von HBV-DNA-Intermediaten in den Zellen nach (Günther et al., 1996). Allerdings wiesen die untersuchten Varianten neben T-1762/A-1764-Substitutionen noch weitere Mutationen, verteilt über das gesamte Genom, auf, so daß ein neutralisierender Effekt dieser bezüglich der Replikationsfähigkeit bestehen kann. Diese Ergebnisse belegen, daß Mutationen nicht isoliert, sondern stets im gesamten Sequenzkontext betrachtet und interpretiert werden müssen.

Aus den von uns erhobenen Daten kann letztlich nicht eindeutig beurteilt werden, ob die gefundenen Virusvarianten eine erhöhte Replikationsfähigkeit aufweisen. Berücksichtigt man die zahlreichen Mutationen, insbesondere in der Core-Promotor-Region, erscheint dies jedoch durchaus möglich. Auch hier sind zur weiteren Klärung zusätzliche funktionelle Studien notwendig, die die biologischen Eigenschaften der Varianten *in vitro* analysieren.

#### **4.7 Zusammenfassender Überblick über die von uns nachgewiesenen Mutationen**

Aus unseren Ergebnissen geht hervor, daß keine spezifische, allen Genomen gemeinsame Mutation für den fulminanten Krankheitsverlauf verantwortlich gemacht werden kann. Möglicherweise ist jedoch ein, durch verschiedene Mutationen bedingter, identischer viraler Phänotyp entscheidend. Unsere Daten legen die Vermutung nahe, daß die Unfähigkeit zur HBeAg-Synthese eine herausragende Rolle spielen könnte. Nach unseren Sequenzanalysen konnten vier der sechs von uns untersuchten Genome kein HBeAg synthetisieren. Ein weiteres Genom hatte Mutationen, für die gezeigt wurde, daß sie die HBeAg-Expression verringern. Auch bei dem übrigen Patienten waren mehrere Mutationen im Core-Promoter vorhanden. Ob eine einzelne dieser Mutationen oder deren Kombination zu einer reduzierten HBeAg-Expression führt, ist bisher unklar, aber nicht unwahrscheinlich (Günther et al., 1996). Damit wird durch verschiedene genetische Varianten ein ähnlicher phänotypischer Effekt erzielt, wie er zumindest für Endemiegebiete in Assoziation mit einer FHB vorbeschrieben wurde. Dagegen läßt sich jedoch feststellen, daß keine der Mutationen, die als fulminant-assoziiert vorbeschrieben sind, in allen von uns untersuchten Genomen gleichermaßen auftrat. Darüber hinaus wurde keine einzelne Mutation identifiziert, die spezifisch für den fulminanten Verlauf wäre. Demgegenüber lassen die Häufungen der Mutationen im Core-Promotor-Bereich, eventuell in Kombination mit anderen von uns gefundenen Veränderungen, eine pathogenetische Bedeutung für den fulminanten Verlauf möglich erscheinen. Für verschiedene Mutationen in diesem Bereich ist ein ähnlicher, eventuell sogar identischer, Wirkungsmechanismus durchaus denkbar. Zur Klärung dieser Aspekte sind weitere in-vitro Studien notwendig.

#### **4.8 Vergleich von kompletten HBV-Genomen bei chronischer und bei fulminanter Hepatitis B/D**

Ziel dieses Teiles der Studie war es zu untersuchen, ob die gleiche Viruspopulation in dem gleichen Wirt sowohl eine chronische als auch eine fulminante Infektion hervorrufen kann. Die orthotope Lebertransplantation erfolgte aufgrund einer fortgeschrittenen Zirrhose bei chronischer Hepatitis B. Durch die Entfernung der chronisch infizierten Leber im Rahmen der Lebertransplantation kommt es zur Elimination des Hauptviruspools. Die Neuinfektion der implantierten Leber erfolgt nun vermutlich durch eine Subpopulation von Virusvarianten, die möglicherweise aus infizierten extrahepatischen Geweben stammt.

Während der chronischen Phase der Infektion wurden die kompletten Genome (Patient 5 und Patient 6) sequenziert, wobei zahlreiche nicht vorbeschriebene Nukleotidaustausche detektiert wurden. Vergleicht man die Nukleotidsequenz der dominanten HBV-Population zum Zeitpunkt der chronischen Infektion mit der zum Zeitpunkt der fulminanten Exazerbation, so lassen sich nur ausgesprochen wenig Unterschiede nachweisen. Eine in beiden Fällen während der fulminanten Reinfektion neu aufgetretene identische Mutation wurde nicht identifiziert. Eine Übereinstimmung dieser Varianten besteht in ihrer Unfähigkeit, zum Zeitpunkt der fulminanten Hepatitis B/D das HBeAg zu exprimieren.

Um zu untersuchen, welche Veränderungen für den fulminanten Krankheitsverlauf ausschlaggebend sind, analysierten einige Autoren die vollständige Genom-Sequenz der Viruspopulation des chronisch infizierten Überträgers im Vergleich mit der Viruspopulation des neuinfizierten Patienten mit fulminant verlaufender Hepatitis (v.Weizsäcker et al., 1995; Karayiannis et al., 1995; Sterneck et al., 1996). Während in einem Fall (im Rahmen einer Infektion eines Neugeborenen durch seine chronisch infizierte Mutter) deutliche Sequenzveränderungen zwischen beiden Populationen gefunden wurden, zeigte sich in zwei anderen Fällen eine Sequenzhomologie von über 99% (Sterneck et al., unpublizierte Daten; Karayiannis et al., 1995). Übereinstimmend mit unseren Daten zeigten Sequenzvergleiche der Viruspopulationen lebertransplantierten Patienten mit vorbestehender Hepatitis B für isolierte Bereiche des Genoms nur sehr geringe Unterschiede (Laskus et al., 1994; Liang et al., 1994). Im Gegensatz hierzu zeigte sich in der Pre-S-Region der dominanten Viruspopulation lebertransplantierten Patienten mit vorbestehender chronischer Hepatitis B eine deutliche Reduktion der vor Lebertransplantation nachzuweisenden Deletionen und Insertionen in 7 von

20 Fällen (Trautwein et al., 1996). Einschränkend muß bei den zuletzt genannten Studien jedoch angemerkt werden, daß es sich in den von Laskus bzw. Trautwein untersuchten Fällen nicht um fulminante Reinfektionen handelt.

Das Vorhandensein der nahezu identischen Viruspopulation bei einem chronisch infizierten und bei einem neuinfizierten Patienten mit fulminanter Hepatitis legt die Vermutung nahe, daß möglicherweise die Neuinfektion mit bestimmten Virusvarianten für einen fulminanten Krankheitsverlauf ausschlaggebend ist. Hierbei könnte der HBeAg- sowie der Pre-S2-Defekt möglicherweise von entscheidender Bedeutung sein.

#### **4.8.1 Virusvarianten mit einem Pre-S2-Defekt**

In der Sequenzanalyse fiel auf, daß beide untersuchten HBV-Populationen eine Mutation im Bereich des Pre-S2-Startkodons aufwiesen. Damit konnte die Variante kein mittleres Oberflächenprotein synthetisieren.

Wie bereits eingangs erwähnt, wurde eine Assoziation zwischen Virusvarianten mit einem mutierten Pre-S2-Startkodon und fulminanter Hepatitis beschrieben (Pollicino et al., 1997; Sterneck et al., 1997). Pollicino et al. untersuchten die Nukleotidsequenzen der dominanten Viruspopulationen von 9 italienischen Patienten mit FHB. Fünf dieser Patienten wiesen Populationen mit Mutationen im Bereich des Pre-S2-Startkodons auf, wohingegen eine derartige Veränderung in der Kontrollgruppe mit akuter Hepatitis B nicht auftrat. Es wurde dementsprechend vermutet, daß diese Mutation charakteristisch für eine FHB ist und für deren Pathogenese bedeutsam sein könnte. In unserer Studie wiesen die dominanten Viruspopulationen beider Patienten (2 von 6), bei denen eine Lebertransplantation wegen fortgeschrittener Zirrhose bei chronischer Hepatitis B/D durchgeführt wurde und die im weiteren Verlauf eine fulminante Exazerbation der Hepatitis erlitten, eine Pre-S2-Startkodonmutation auf. Da 5 der 6 Patienten ebenfalls aus Italien stammen, scheinen geographische Unterschiede in der Prävalenz der Mutation als Ursache für diese Diskrepanz unwahrscheinlich, zumal nur in einer der beiden mutierten Populationen eine italienische Herkunft vorlag. Andere Autoren fanden nur selten Veränderungen in Viruspopulationen bei FHB, die die Expression des mittleren Oberflächenproteins inhibieren (v. Weizsäcker et al., 1995; Ogata et al., 1993; Asahina et al., 1996; Hasegawa et al., 1994; Alexopoulou et al., 1996).

Obwohl diese Mutation eine Produktion des mittleren Oberflächenproteins verhindert, konnte durch in-vitro-Studien gezeigt werden, daß solche Varianten replikationskompetent sind, sezerniert werden können und infektiös sind (Fernholz et al., 1993). In unserem HDV-positiven Patientengut trat eine Deletion des Pre-S2-Startkodons in beiden Fällen, in denen es nach einer Lebertransplantation chronisch infizierter Patienten zu einer fulminanten Reinfektion kam, jeweils in Kombination mit einer weiteren Deletion von drei Aminosäuren auf. Diese Veränderungen waren ebenfalls zum Zeitpunkt der chronischen Infektion vorhanden. Derartige Deletionsmutanten werden, wie bereits diskutiert, auch bei asymptomatischen Trägern, bei Patienten mit chronisch-aggressiver Hepatitis und bei fulminanten HDV-negativen Verläufen gefunden (Fernholz et al., 1993; Lai et al., 1991; Pollicino et al., 1997).

Die Bedeutung der Mutation für die Antigenität des Virus ist unklar. Wenn diese Veränderungen für den fulminanten Verlauf von Bedeutung sind, so könnte postuliert werden, daß dies nur im Rahmen einer Neuinfektion erfolgt. Es wird vermutet, daß das Pre-S2-Protein ein wichtiges Ziel der T- und B-Zell-Immunabwehr darstellt. In Analogie zum HBeAg-Defekt scheint also auch hier die Möglichkeit denkbar, daß die Abwesenheit des mittleren Oberflächenproteins eine ineffektive Virusneutralisation bewirken könnte. Damit könnte ein ausgedehnter Befall vieler Hepatozyten und im weiteren Krankheitsverlauf ein massiver Zelluntergang die Folge sein.

#### **4.8.2 Virusvarianten mit einem HBeAg-Defekt**

Die dominanten Viruspopulationen beider in diesem Teil der Studie untersuchten Patienten wiesen zum Zeitpunkt der fulminanten Reinfektion einen HBeAg-Defekt auf. Zum einen wurde eine bereits vor der Lebertransplantation bestehende Precore-Stopcodonmutation nachgewiesen, zum anderen bildete sich im zweiten Fall nach Transplantation eine Mutation des Precore-Startcodons heraus. Wie bereits ausführlich diskutiert, erscheint die Neuinfektion der implantierten Leber mit Virusvarianten, die die phänotypische Gemeinsamkeit des HBeAg-Defektes aufweisen, von herausragender Relevanz zu sein.

### **4.8.3 Escape-Varianten unter Anti-HBs-Hyperimmunglobulintherapie**

Das Auftreten von Aminosäureveränderungen im Bereich der Hauptantigenregion des Surface-Proteins, der sogenannten „a“-Determinante, ist als Folge der immunbedingten Selektion unter der Behandlung mit monoklonalen (McMahon et al., 1992) und polyklonalen (Fuji et al., 1992 und Carman et al., 1990) Anti-HBs-Hyperimmunglobulinen beschrieben (Hawkins et al., 1996 und Cariani et al., 1995). Mutationen in dieser Region traten jedoch in der hier durchgeführten Untersuchung trotz Anti-HBs-Hyperimmunglobulinbehandlung bei keinem der zwei Patienten (Patient 5 und Patient 6) auf. Eine mögliche Erklärung hierfür ist die kurze Dauer der Anti-HBs-Hyperimmunglobulinbehandlung, die jeweils nur einen bzw. zwei Monate betrug. Kürzlich konnte eine signifikante Korrelation zwischen dem Zeitraum einer Hepatitis-B-Immunglobulin-Behandlung und der Entwicklung von Mutationen in der „a“-Determinante nachgewiesen werden (Ghany et al., 1998). Die Bedeutung von Virusvarianten mit mutierter „a“-Determinante für das Rezidiv einer HBV-Infektion nach Lebertransplantation ist ungeklärt, eine ausschlaggebende Rolle wird jedoch vermutet. Solche Escape-Varianten beeinflussen den klinischen Verlauf nach einer Lebertransplantation negativ (Protzer-Knolle et al., 1998). Eine relevante Bedeutung dieser Mutanten für einen fulminanten Verlauf konnte bislang nicht nachgewiesen werden.

### **4.8.4 Die Immunabwehr als bedeutender Faktor bei der Entwicklung einer fulminanten Hepatitis nach Lebertransplantation**

Es wird vermutet, daß die Immunantwort gegen virale Proteine ein bedeutender pathophysiologischer Faktor bei der Entwicklung einer fulminanten Hepatitis darstellt. Daher scheint die Tatsache, daß permanent immunsupprimierte Patienten, in unserem Fall die Transplantatempfänger, eine fulminante Hepatitis entwickeln können, eher unwahrscheinlich. In Übereinstimmung mit unseren Daten wurde zuvor eine Assoziation zwischen dem Vorhandensein der Precore-Stopkodon-Mutante und einer früh eintretenden, schwer verlaufenden Reinfektion mit HBV bei Lebertransplantatempfängern beschrieben (Angus et al., 1995). Analog zu den hier dargelegten Befunden wurde darüber berichtet, daß Lebertransplantatempfänger mit rekurrenter HBV-Infektion typischerweise eine hohe Virämie und eine hochgradige Infektion der Hepatozyten aufweisen. Neben der medikamentösen Immunsuppression des Wirtsorganismus könnte hierbei auch ein direkt stimulatorischer

Effekt der verabreichten Kortikosteroide auf die Virusreplikation (Lau et al., 1992) eine Rolle spielen.

Eine immunologisch vermittelte Zerstörung infizierter Hepatozyten ist jedoch auch unter Immunsuppression im Rahmen der Transplantationsmedizin denkbar. Das Gleichgewicht zwischen Toleranz und Abwehr des Transplantatempfängers gegenüber dem Transplantat ist äußerst labil und kann über eine Vielzahl endogener und exogener Faktoren zu einer Immunaktivierung mit Zytokinfreisetzung und einer gesteigerten MHC-Expression auf den Hepatozyten führen. Möglicherweise verläuft dieser unspezifische Immunmechanismus an den mit HBV infizierten Hepatozyten mit einer gesteigerten Effektivität ab. Darüber hinaus kann die Immunantwort gegebenenfalls durch Differenzen in HLA-Merkmalen zwischen Spenderleber und Empfänger in ihrer Wirkung verstärkt werden.

#### **4.8.5 Direkt zytopathische Effekte viraler Proteine bei der Entwicklung einer fulminanten Hepatitis**

Neben den bislang diskutierten pathophysiologischen Mechanismen könnten direkt zytopathische Effekte des HBV eine Rolle spielen. Die Entwicklung einer fibrosierenden cholestatischen Hepatitis bei immunsupprimierten Patienten ist vermutlich Folge eines direkt zytotoxischen Effektes bei intrazellulärer Akkumulation viraler Proteine (Mason et al., 1993; Lau et al., 1992). Ein solcher Effekt intrazellulär akkumulierter Oberflächenproteine konnte im transgenen Mausmodell (Chisari et al., 1987) sowie bei intrazellulärer Akkumulation von Core-Proteinen in Hepatomazellen (Roingeard et al., 1990) demonstriert werden. Damit könnten nicht nur Virusvarianten mit einem hochreplizierenden Phänotyp, sondern auch Viren mit Mutationen, die eine Überexpression oder einen Sekretionsblock eines Proteins zur Folge haben, zu einer intrazellulären Anreicherung viraler Proteine und damit zum fulminanten Krankheitsverlauf führen.

Da auch im Leberexplantat der hier untersuchten Patienten eine starke intrazelluläre Expression von HBsAg und HBcAg in über 90% aller Hepatozyten nachgewiesen werden konnte, könnten möglicherweise direkt zytopathische Effekte des HBV in der Entwicklung einer fulminanten Hepatitis in diesen Fällen zumindest mitbestimmend gewesen sein.

#### **4.8.6 Zusammenfassender Überblick über die Virusvarianten bei fulminanter Reinfektion nach Lebertransplantation**

Bei den von uns untersuchten Viruspopulationen der beiden Patienten entwickelten sich nur wenig neue Mutationen im Verlauf der fulminanten Reinfektion nach Lebertransplantation. Daher erscheinen Änderungen der HBV-Population für den fulminanten Verlauf nach Lebertransplantation eher nicht verantwortlich zu sein. Stattdessen sind die vorbestehenden biologischen Eigenschaften der Viruspopulation unter den Bedingungen einer „de-novo“-Infektion als Ursache für den klinischen Verlauf wahrscheinlicher.

Über zwei unterschiedliche Mechanismen sind die Viruspopulationen beider Patienten im fulminanten Krankheitsstadium unfähig, HBeAg zu synthetisieren. Zum einen geschah dies durch eine Precore-Stopcodonmutation, die bereits vor der orthotopen Lebertransplantation bestand, zum anderen war es das Resultat einer Mutation des Precore-Initiationskodons. Letztere entwickelte sich jedoch erst im Laufe der fulminanten Reinfektion.

Der in beiden Fällen gefundene Pre-S2-Defekt und damit die Unfähigkeit, das mittlere Oberflächenprotein zu synthetisieren, existierte bereits zum Zeitpunkt der chronischen Infektion und ist möglicherweise im Rahmen der Neuinfektion der implantierten Leber durch ein initiales „immune escape“ für den fulminanten Verlauf pathogenetisch bedeutsam.

#### **4.9 Bedeutung der erhobenen Befunde und Schlußfolgerungen neuer Aspekte**

Die Ergebnisse unserer Studie zeigen, daß keine einzelne spezifische Mutation für den fulminanten Verlauf allein verantwortlich ist. Insbesondere Mutationen, die in vorangegangenen Studien mit dem Auftreten einer FHB assoziiert wurden, wie z.B. die Precore-Stopkodonmutante in Nukleotidposition 1896 sowie die Veränderungen in den Nukleotidpositionen 1762 und 1764, können den fulminanten Infektionsverlauf allein nicht bedingen.

Die HBV-Varianten bei Patienten mit und ohne HDV-Koinfektion, die eine FHB erlitten, zeigen keinen signifikanten Unterschied in ihrer DNA-Sequenz. Ein relevanter Selektionsdruck der HDV-Population auf die HBV-Population erscheint damit unwahrscheinlich. Unsere Studie nimmt keine Stellung zu der Bedeutung des HDV selbst bei der Entwicklung einer fulminanten Hepatitis. Auch hier sind weitere molekularbiologische Studien unter besonderer Berücksichtigung der HDV-Population anzustreben.

Berücksichtigt man die Ergebnisse dieser Studie, in der sich vor und nach Lebertransplantation kaum Unterschiede in den dominanten Viruspopulationen der Patienten fanden, so kommt man zu dem Schluß, daß die vorbestehenden biologischen Eigenschaften der Viruspopulation im Rahmen einer „de-novo“-Infektion der implantierten Leber einen pathophysiologisch bedeutsamen Faktor in der Entwicklung einer fulminanten HBV-Infektion darstellen könnten. In unserem Untersuchungsgut waren die herausragenden phänotypischen Charakteristika zum einen der HBeAg-Defekt und zum anderen die Unfähigkeit zur Synthese des mittleren Oberflächenproteins

Eine fehlende oder eingeschränkte HBeAg-Produktion, die durch verschiedene Mutationen bedingt sein kann, ist in Viruspopulationen bei fulminanten Verläufen gehäuft nachzuweisen. Unsere Befunde über die Viruspopulationen lebertransplantierte Patienten zeigen, daß die Neuinfektion mit HBeAg-defekten Varianten von besonderer Bedeutung zu sein scheint. Dem HBeAg wird eine Chronizität- und Toleranz-induzierende Wirkung zugeschrieben. Eine verminderte oder fehlende HBeAg-Expression könnte bei einem neuinfizierten Wirt eine starke Immunantwort mit der Folge einer FHB hervorrufen. Vermutlich stellt das mittlere Oberflächenprotein ein wichtiges Ziel der Immunabwehr dar, so daß durch eine ineffektive

Virusneutralisation ein ausgedehnter Befall vieler Hepatozyten und schließlich ein ausgedehnter Zelluntergang resultieren könnte.

Zur beweiskräftigen Klärung der Frage, welcher der Pathomechanismen, die aufgrund unserer Ergebnisse möglich sind, entscheidend ist oder ob es sich tatsächlich um die Kombination mehrerer Effekte handelt, sind weitere, insbesondere funktionelle, molekularbiologische Untersuchungen erforderlich.

## **5 Zusammenfassung**

Mutationen viraler Genome sind normale biologische Ereignisse und bewirken eine Koexistenz der so entstehenden viralen Varianten im infizierten Individuum. Die Tatsache, daß bestimmte Mutationen die biologischen Eigenschaften der Viren deutlich verändern und damit den klinischen Verlauf einer HBV-Infektion grundlegend beeinflussen können, ist Ausgangspunkt intensiver Forschung. Umgekehrt läßt das gehäufte Auftreten bestimmter Virusgenomveränderungen im Rahmen ähnlicher klinischer Verläufe Rückschlüsse auf deren phänotypische Bedeutung und damit auf die Pathogenese insgesamt zu. Diese ist im Fall der fulminanten HBV-Infektion weitgehend ungeklärt. Ziel dieser Studie war es zu untersuchen, (i) ob bestimmte strukturelle Veränderungen im HBV-Genom mit einer fulminanten HBV-HDV-Infektion assoziiert sind, (ii) ob strukturellen Unterschiede im HBV-Genom bei Patienten mit FHB mit bzw. ohne HDV-Koinfektion existieren und (iii) ob im Verlauf einer fulminanten Exazerbation einer chronischen HBV-Infektion nach Lebertransplantation strukturelle Veränderungen der HBV-Population mit dem veränderten klinischen Verlauf einhergehen.

Hierzu wurde die kompletten Nukleotidsequenzen der HBV-Populationen von sechs Patienten mit FHB/D bestimmt und zum einen mit den Genome der HBV-Populationen von 35 Patienten mit chronischer Hepatitis B sowie zum anderen mit den Genomen der HBV-Populationen von neun Patienten mit FHB verglichen. Zwei der sechs untersuchten Patienten erlitten eine fulminante Reinfektion nach Lebertransplantation bei vorbestehender chronischer HBV-HDV-Infektion. Bei diesen beiden Patienten wurden die Nukleotidsequenzen der HBV-Genome vor der Lebertransplantation (im Status der chronischen HBV-Infektion) sowie danach (im Status der fulminanten Reinfektion) im Verlauf betrachtet. Nach Isolierung und Amplifizierung der viralen DNA durch Polymerase-Kettenreaktion erfolgte eine Direktsequenzierung sowohl des Plus- als auch des Minusstranges der Amplifikate.

In den HBV-Genomen aller untersuchten Patienten mit FHB zeigten sich zahlreiche, z.T. nicht vorbeschriebene Mutationen in allen Regionen des Genoms. Eine bei allen Varianten gemeinsam auftretende Mutation, die spezifisch für den fulminanten Verlauf wäre, wurde nicht identifiziert. Die Sequenzveränderungen ähnelten denen der Vergleichsgruppe von

Patienten mit FHB. Hervorzuheben war eine Akkumulation von Mutationen insbesondere im Enhancer II-Core-Promotorbereich. Diese Mutationen könnten durch Veränderungen der Replikationsfähigkeit des Virus in allen Fällen zu einem fulminanten Verlauf beigetragen haben. Weiterhin war auffällig, daß entsprechend der Strukturanalyse die HBV-Populationen in fünf von sechs Fällen kein bzw. nur vermindert HBeAg produzieren konnten. Dies war in zwei Fällen durch eine Precore-Stopkodon-Mutation, in zwei weiteren Fällen durch eine Precore-Startkodon-Mutation und in einem Fall durch eine T-1762/A-1764-Substitution bedingt. Es ist durchaus denkbar, daß auch bei dem sechsten Patienten Mutationen im Core-Promoter die HBeAg-Expression reduzierten oder inhibierten, insbesondere da serologisch kein HBeAg vorlag. Dem HBeAg wird eine Chronizität- und Toleranz-induzierende Wirkung zugeschrieben. Eine verminderte oder fehlende HBeAg-Expression könnte bei einem neuinfizierten Wirt eine starke Immunantwort mit der Folge einer FHB hervorrufen.

Der Vergleich der dominanten Viruspopulationen von zwei Patienten zum Zeitpunkt der chronischen und der fulminanten Infektion ließ nur so geringe Sequenzunterschiede erkennen, daß diese vermutlich nicht für die klinische Exazerbation der HBV-HDV-Infektion verantwortlich sind. Ferner trat während der fulminanten Reinfektion keine gemeinsame Mutation in den untersuchten Genomen neu auf. In beiden Fällen lagen Varianten zum Zeitpunkt der fulminanten Infektion vor, die durch eine defekte Produktion von HBeAg und dem mittleren Oberflächenprotein charakterisiert waren. Obgleich die Mehrzahl dieser phänotypischen Charakteristika vor und nach der Lebertransplantation präsent waren, könnten sie dennoch im Rahmen einer Neuinfektion der implantierten Leber zum fulminanten Verlauf beigetragen haben.

Weiterhin ist denkbar, daß auch unterschiedliche hier identifizierte Mutationen zu identischen phänotypischen Eigenschaften der Viren führen, wie z.B. eine gesteigerte Replikationsfähigkeit, die in der Pathogenese der FHB von Bedeutung sind. Daher sind weitere funktionelle Studien zur weiteren Aufklärung der Pathogenese der FHB notwendig.

## **6 Literaturverzeichnis**

Alexopoulou, A., Karayiannis, P., Hadziyannis, S., Hou, J., Pickering, J., Luo, K., Thomas, H., (1996). Whole genome analysis of hepatitis B virus from four cases of fulminant hepatitis: genetic variability and its potential role in disease pathogenicity. *J. of Viral Hepatitis* 3: 173-81

Angus, P.W., Locarnini, S.A., McCaughan, G.W., Jones, R.M., McMillian, J.S., Bowden, D.S., (1995). Hepatitis B virus precore mutant infection is associated with severe recurrent disease after liver transplantation. *Hepatology* 21: 14-18

Antoni, B.A., Rodriguez-Crespo, I., Gomez-Gutierrez, J., Nieto, M., Peterson, D., Gavilanes, F., (1994). Site directed mutagenesis of cysteine residues of hepatitis B surface antigen: analysis of two single mutants and the double mutant. *Eur. J. Biochem.* 222: 121-7

Asahina, Y., Enomoto, N., Ogura, Y., Sakuma, I., Kurosaki, M., Izumi, M., Marumo, F., Sato, C., (1996). Complete nucleotide sequences of hepatitis B virus genomes associated with epidemic fulminant hepatitis. *J. Med. Virol.* 48: 171-8

Ashton-Rickart, P.G., Murray, K., (1989). Mutants of hepatitis B virus surface antigen that define some antigenically essential residues in the immunodominant a region. *J. Med. Virol.* 29: 196-203

Aye, T., Uchida, T., Becker, S., Hirahima, M., (1994). Variations of Hepatitis B virus precore/core gene sequence in acute and fulminant hepatitis B. *Dig. Dis. and Sciences* 6:1281-7

Bancroft, W.H., Mundon, F.K., Russell, P.K., (1972). Detection of additional antigenic determinants of hepatitis B antigen. *J. Immunol.* 109: 842-8

Bartenschläger, R., Schaller, H., (1992). Hepadnaviral assembly is initiated by polymerase binding to the encapsidation signal in the viral RNA genome. *EMBO J.* 11: 3413-20

Baumert, T., Liang, T., (1996). Precore mutants revised. *Hepatology* 23: 184-6

Beath, S., Boxall E., Watson, R., Tarlow, M., Kelly, D., (1992). Fulminant hepatitis B in infants born to anti-HBe hepatitis B carrier mothers. *Br. Med. J.* 302: 1169-70

Bertoletti, A., Chisari, F.V., Penna, A., Galati, L., Giuberti, T., Cavalli, A., Fowler, P., Missale, G., Fiaccadori, F., Ferrari, C., (1992). Fine dissection of hepatitis B virus (HBV) nucleoprotein recognition by HLA-A2 restricted cytotoxic T cell clones: Potential implications for specific immune therapy in HBV infection. *J. Hepatol.* 16 (Suppl. 1) 1: S11 (abstract)

Bertoletti, A., Chisari, F., Penna, A., Guilhot, S., Galati, L., Missale, G., Fowler, P., (1993). Definition of a minimal optimal cytotoxic T-cell epitope within the hepatitis B virus nucleocapsid protein. *J. Virol.* 67: 2376-80

Bertoletti, A., Sette, A., Chisari, F.A., et al. (1994). Natural variants of cytotoxic epitopes are T-cell receptor antagonists for antiviral cytotoxic T-cells. *Nature* 369: 407-10

Blum, H.E., Galun, E., Liang, T.J., v. Weizsäcker, F., Wands, J.R., (1991). Naturally occurring missense mutation in the polymerase gene terminating hepatitis B virus replication. *J. Virol.* 65: 1836-42

Blum, H.E., Zhang, Z.-S., Galun, E., von Weizsäcker, F., Liang, T.J., Garner, B., Wands, J.R., (1992). Hepatitis B virus X-protein is not central to the viral life cycle in vitro. *J. Virol.* 66: 223-7

Blum, H.E., (1993). Hepatitis B Virus: Significance of Naturally Occurring Mutants. *Intervirol.* 35: 40-50

Blumberg, B. S., Alter, H. J., Visnich, S., (1965) A „new“ antigen in leukemia sera. *J. Am. Med. Ass.* 191: 541-6

Bonino, F., Heermann, K. H., Rizzetto, M., Gerlich, W. H., (1986). Hepatitis delta virus: protein composition of delta antigen and its hepatitis B virus-derived envelope. *J. Virol.* 58: 945-50

Bonino, F., Hoyer B., Shih J. W., et al., (1984). Delta hepatitis agent: structural and antigenic properties of the delta-associated particle. *Infect. Immun.* 43: 1000-5

Brunetto, M.R., Stemler, M., Schodel, F., Will, H., Ottobrelli, A., Rizzetto, M., Verme, G., Bonino, F., (1989). Identification of HBV variants which cannot produce precore-derived HBeAg and may be responsible for severe hepatitis. *Ital. J. Gastroenterol.* 21: 151-4

Bruss, V., Ganem, D., (1991). The role of envelope proteins in hepatitis B virus assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 1059-63

Bruss, V., Thomssen, R., (1994). Mapping a region of the large envelope protein required for hepatitis B virus maturation. *J. Virol.* 68: 1643-50

Buckwold, V., Xu, Z., Chen, M., Yen, T., Ou, J., (1996). Effects of naturally occurring mutation in the hepatitis B virus basal core promoter on precore gene expression and viral replication. *J. Virol.* 70(9): 5845-51

Cariani, E., Ravaggi, A., Tanzi, E., Romani, L., Fiordalisi, G., Bellati, G., Caccamo, L., Galmarini, D., Albertini, A., Zanetti, A., (1995). Emergence of Hepatitis B virus S gene mutant in a liver transplant recipient. *J. Med. Virol.* 47: 410-5

Carman, W.F., Jacyna, M.R., Hadziyannis, S., Karayiannis, P., McGarvey, M.J., Makris, A., Thomas, H.C., (1989). Mutation preventing formation of hepatitis B antigen in patients with chronic hepatitis B infection. *Lancet* II: 588-91

Carman, W.F., Zanetti, A.R., Karayianis, P., Waters, J., Manzillo, G., Tanzi, E., Zuckerman, A.J., Thomas, A.J., (1990). Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus. *Lancet* 336: 325-9

Carman, W.F., Fagan, E.A., Hadziyannis, S., Karayiannis, P., Tassopoulos, N.C., Williams, R., Thomas, H.C., (1991). Association of a precore genomic variant of hepatitis B virus with fulminant hepatitis. *Hepatology* 14: 219-22

Carman, W.F., Korula, J., Wallace, L., MacPhee, R., Mimms, L., Decker, R., (1995). Fulminant reactivation of hepatitis B due to envelope protein that escaped detection by monoclonal HBsAg ELISA. *Lancet* 345: 1406-7

Chang, F.-L., Chen, P.-J., Tu, S.-J., Wang, C.-J., Chen, D.-S., (1991). The large form of hepatitis delta antigen is crucial for assembly of hepatitis delta virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:8490-4

Chang, H. K., Wang, B. Y., Yuh, C. H., Wie, C. L., Ting, L. P., (1989). A liver-specific nuclear factor interacts with the promoter region of the large surface protein of human hepatitis B virus. *Mol. Cell Biol.* 9: 5189-97

Chang, M.-F., Baker, S. C., Soe, L. H., Kamahora, T., Keck, J. G., Makino, S., Govindarajan, S., Lai, M. M. C., (1988). Human hepatitis antigen is a nuclear phosphoprotein with RNA-binding activity. *J. Virol.* 62: 2403-10

Chen, H.-S., Kew, M.C., Hornbuckle, W.E., Tennant, B.C., Cote, P.J., Gerin, J.L., Purcell, R.H., Miller, R.H., (1992). The precore gene of the woodchuck hepatitis virus genome is not essential for viral replication in the natural host. *J. Virol.* 66: 5682-4

Chen, H.-S., Kaneko, S., Girones, R., Anderson, R.W., Hornbuckle, W.E., Tennant, B.C., Cote, P.J., Gerin, L.J., Purcell, R.H., Miller, R.H., (1993). The woodchuck hepatitis X gene is important for establishment of virus infection in woodchucks. *J. Virol.* 67: 1218-26

Chen, Y., Robinson, W.S., Marion, P.L., (1992). Naturally occurring point mutation in the C terminus of the polymerase gene prevents duck hepatitis B virus RNA packaging. *J. Virol.* 66: 1282-7

Chirara, M.M., Chetsanga, C.J., (1994). Variant of hepatitis B virus isolated in Zimbabwe. *J. Med. Virol.* 42: 73-8

Chisari, F.V., Filippi, P., Buras, J. et al., (1987). Structural and pathological effect of synthesis of hepatitis B virus large envelope polypeptide in transgenic mice. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 84: 6909-13

Chisari, F.V., Klopchin, K., Moriyama, T. et al., (1989). Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus transgenic mice. *Cell* 59: 1145-56

Chisari, F., (1992). Hepatitis B virus immunopathogenesis. *Annual Review of Immunology* 13: 29-60

Chu, C., M., Yeh, C., T., Chiu, C.T., Sheen, I., S., Liaw, Y., F., (1996). Precore mutant of hepatitis B virus prevails in acute and chronic infections in an area in which hepatitis B is endemic. *J. Clin. Mic.* 34(7): 1815-8

Classen, M., Diehl, V., Kochsiek, K, (1991). *Innere Medizin.* 1. Auflage, Urban & Schwarzenberg, München Wien Baltimore

Dane, D. S., Cameron, C. H., Briggs, N. M., (1970). Virus-like particles in serum of patients with Australia antigen associated hepatitis. *Lancet* 1: 695-8

Ehata, T., Omata, M., Yokosuka, O., Hosoda, K., Ohto, M., (1992). Variations in codons 84-101 in the core nucleotide sequence correlate with hepatocellular injury in chronic hepatitis B virus infection. *J. Clin. Invest.* 89: 332-8

Ehata, T., Omata, M., Chuang, W., Yokosuka, O., Ito, Y., Hosoda, K., Ohto, M., (1993). Mutations in the core nucleotide sequence of HBV virus correlate with fulminant and severe hepatitis. *J. Clin. Invest.* 91: 1206-13

Fagan, E., Smith, E., Davison, P., Williams, R., (1986). Fulminant hepatitis B in successive female partners of two anti-HBe-positive males. *Lancet* 2: 538-40

Feray, C., Gigou, M., Samuel, D., Bernuau, J., Bismuth, H., Berchot, C., (1993). Low prevalence of precore mutations in hepatitis B virus DNA in fulminant hepatitis B in France. *J. Hepatol.* 18:119-22

Fernholz, D., Brunetto, M., Stemler, M., Bonino, F., Will, H., (1991). Identification and characterization of an HBV pre-S2/pre-C double mutant in a chronic carrier. *J. Hepatol.* 13 (Suppl. 2): 101

Fernholz, D., Stemler, M., Brunetto, M., Bonino, F., Will, H., (1991). Replicating and virion secreting hepatitis B mutant virus unable to produce preS2 protein. *J. Hepatol.* 13 (Suppl. 4): S102-4

Fernholz, D., Galle, P., Stemler, M., Brunetto, M., Bonino, F., Will, H., (1993). Infectious hepatitis B virus variant defective in pre-S2 protein expression in a chronic carrier. *Virology* 194: 137-48

Ferns, R.B., Tedder, R.S., (1984). Monoclonal antibodies to hepatitis B e antigen (HBeAg) derived from hepatitis B core antigen (HBcAg): Their use in characterization and detection of HBeAg. *J. Gen. Virol.* 65: 899-908

Ferrari, C., Bertoletti, A., Penna, A., Cavalli, A., Valli, A., Missale, G., Pilli, M., Fowler, P., Giuberti, T., Chisari, F.V., Fiaccadori, F., (1991). Identification of immunodominant T cell epitopes of the hepatitis B virus nucleocapsid antigen. *J. Clin. Invest.* 88: 214-22

Fuji, H., Moriyama, K., Sakamoto, N., et al. (1992). Gly 145 to arg substitution in Hbs antigen of immune escape mutant of hepatitis B virus. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 184: 1152-7

Galibert, F., Mandart, E., Fitoussi, F., Tiollais, P., Charney, P., (1979). Nucleotide sequence of the hepatitis B virus genome (subtype ayw) cloned in *E. coli*. *Nature* 281: 646-50

Gerken, G., Kremsdof, D., Capel, F., Petit, M.A., Dauguet, C., Manns, M.P., Meyer zum Büschfelde, K.-H., Brechot, C., (1991). Hepatitis B defective virus with rearrangements in the preS gene during chronic HBV infection. *Virology* 183: 555-65

Ghany, M., Ayola, B., Villamil, F., Gish, R., Rojter, S., Vierling, J., Lok, A., (1998). Hepatitis B virus S mutants in liver transplant recipients who were reinfected despite hepatitis B immune globulin prophylaxis. *Hepatology* 27: 213-22

Girones, R., Miller, R.H., (1989). Mutation rate of the hepadnavirus genome. *Virology* 170: 595-7

Günther, S., Piwon, N., Iwanska, A., Schilling, R., Meisel, H., Will, H., (1996). Type, prevalence and significance of core promoter/enhancer II mutations in hepatitis B virus from immunosuppressed patients with severe liver disease. *J. Virol.* 70: 8318-31

Günther, S., Sommer, G., Breunig, F., Iwanska, A., Kalinina, T., Sterneck, M., Will, H., (1997). Amplification of full-length hepatitis B virus genomes from low viremic samples: frequency and functional consequences of PCR-induced mutations. *J. Clin. Microbiol.*, in press

Hadler, F.C., Fields, H.A., (1991). Hepatitis delta virus. In: Belshe, R.B.(Hrsg.) *Textbook of human virology*, 2.Auflage, The C.V. Mosby Co., St. Louis

Harrison, T.J., Hopes, E.A., Oon, C.J., Zanetti, A.R., Zuckerman, A.J., (1991). Independent emergence of a vaccine induced escape mutant of hepatitis B virus. *J. Hepatology* 13(suppl.): 105-7

Hasegawa, K., Huang, J., Wands, J.R., Obata, H., Liang, J., (1991). Association of hepatitis B viral precore mutations with fulminant hepatitis B in Japan. *Virology* 185: 460-3

Hasegawa, K., Huang, J., Rogers, S.A., Blum, H.E., Liang, T.J., (1994). Enhanced replication of a hepatitis B virus mutant associated with an epidemic of fulminant hepatitis. *J. Virol.* 68: 1651-9

Hawkins, A., Gilson, R., Gilbert, N., Wreghiu, T., Gray, J., Boa, IA-d, Tedder, R., Alexander, G., (1996). Hepatitis B virus surface mutations associated with infection after liver transplantation. *J. Hepatol.*: 8-14

Heermann, K. H., Goldmann, U., Schwartz, W., Seyffarth, T., Baumgarten, H., Gerlich, W. H., (1984). Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-s sequence. *J. Virol.* 52: 396-402

Horikita, M., Itoh, S., Yamamoto, K., Shibayama, T., Tsuda, F., Okamoto, H., (1994). Differences in the entire nucleotide sequence between hepatitis B virus genomes from carriers positive for antibody to hepatitis B e antigen with and without active disease. *J. Med. Virol.* 44: 96-103

Hsu, H., Y., Chang, M., H., Lee, C., Y., Hsieh, K., H., Ni, Y., H., Chen, P., J., Chen, D., S., (1995). Precore mutant of hepatitis B virus in childhood fulminant hepatitis B: an infrequent association. *J. Inf. Dis.* 171(4):776-81

Imai, M., Nomura, M., Gotanda, T., Sano, T., Tachibana, K., Miyamoto, H., Takahashi, K., Toyama, S., Miyakawa, Y., Mayumi, M., (1982). Demonstration of two distinct antigenic determinants on hepatitis B e antigen by monoclonal antibodies. *J. Immunol.* 128: 69-72

Kaneko, M., Uchida, T., Moriyama, M., Arakawa, Y., Shikata, T., Gotoh, K., Mima, S., (1995). Probable implication of mutations of the X open reading frame in the onset of fulminant hepatitis B. *J. Med. Virol.* 47: 204-8

Karayiannis, P., Alexopoulou, A., Hadziyannis, S., Thursz, M., Watts, R., Seito, S., Thomas, H., (1995). Fulminant hepatitis associated with hepatitis B virus antigen-negative infection: importance of host factors. *Hepatology* 22: 1628-34

Karthigesu, V.D., Allison, L.M., Fortuin, M., Mendy, M., Whittle, H.C., Howard, C.R., (1994). A novel hepatitis B virus variant in the sera of immunized children. *J. Gen. Virol.* 75: 443-8

Kekule, A.S., Lauer, U., Weiss, L., Lubber, B., Hofschneider, P.H., (1993). Hepatitis B virus transactivator Hbx uses a tumour promoter signalling pathway. *Nature* 361: 742-5

Kim, S.H., Hong, S.P., Kim, S.K., Lee, W.S., Rho, H.M., (1992). Replication of a mutant hepatitis B virus with a fused X-C reading frame in hepatoma cells. *J-Gen. Virol.* 73: 2421-4

Kojima, M., Shimizu, M., Tsuchimochi, T., Koyasu, M., Tanaka, S., Iizuka, H., Tanaka, T., Okamoto, H., Tsuda, F., Miyakawa, Y., Mayumi, M., (1991). Posttransfusion fulminant hepatitis B associated with precore-defective HBV mutants. *Vox Sang* 60: 34-9

Kosaka, Y., Takase, K., Kojima, M., Shimizu, M., Inoue, K., Yoshida, M., Tanaka, S., al. Mme (1993). Fulminant HBV: Induction by hepatitis B virus mutants defective in the precore region and incapable of encoding e-antigen. *Gastroenterology* 100: 1087-93

Kroogsgaard, K., Mathiesen, L.R., Aldershvile, J., Kryger, P., Andersson, P., Hansson, B.G., Nielsen, J.O., et al., (1988). Delta infection and hepatitis B virus replication in Danish patients with fulminant hepatitis B. *Scand. J. Infect. Dis.* 20: 127-33

Krone, B., Lenz, A., Heermann, K.H., Seifer, M., Xuangyong, L., Gerlich, W.H., (1990). Interactions between hepatitis B surface proteins and monomeric human serum albumin. *Hepatology* 11: 1050-6

Lai, M.E., Melis, A., Mazzoleni, A.P., Farci, P., Balestrieri, A., (1991). Sequence analysis of hepatitis B virus Genome of a new mutant of ayw subtype isolated in Sardinia. *Nucleic Acids Res.* 19: 5078

Lamberts, C., Nassal, M., Velhagen, I., Zentgraf, H., Schröder, C., (1993). Precore-mediated inhibition of hepatitis B virus progeny DNA synthesis. *J. Virol.* 67(7): 3756-62

Laskus, T., Persing, D.H., Nowicki, M.J., Mosley, M.J., Rakela, J., (1993). Nucleotide sequence analysis of the precore region in patients with fulminant hepatitis B in the United States. *Gastroenterology* 105: 1173-8

Laskus, T., Rakela, J., Steers, J., Wiesner, R., Persing, D., (1994). Precore and contiguous regions of hepatitis B virus in liver transplantation for end-stage hepatitis B. *Gastroenterology* 107: 1774-80

Laskus, T., Rakela, J., Nowicki, M.J., Persing, D.H., (1995). Hepatitis B virus core promoter sequence analysis in fulminant and chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 109: 1618-1623

Lau, J.Y., Bain, V.G., Smith, H.M., Alexander, G.J.M., Williams, R., (1992). Modulation of hepatitis B viral antigen expression by immunosuppressive drugs in primary hepatocyte culture. *Transplantation* 53: 894-8

Lau, J.Y.N., Vincent, G.B., Davies, S.E., O'Grady, J.G., Alberti, A., Alexander, G.J.M., Williams, R., (1992). High level expression of hepatitis B viral antigens in fibrosing cholestatic hepatitis. *Gastroenterology* 102: 956-962.

Liang, T.J., Hasegawa, K., Rimon, N., Wands, J., Ben-Porath, E., (1991). A hepatitis B virus mutant associated with an epidemic of fulminant hepatitis. *N. Engl. J. Med.* 324: 1705-9

Liang, T.J., Hasegawa, K., Munoz, S.J., Shapiro, C.N., Yoffe, B., McMahon, B.J., Feng, C., Bei, H., Alter, M.J., Dienstag, J.L., (1994). Hepatitis B precore mutation and fulminant hepatitis in the United States. *J. Clin. Invest.* 93: 550-5

Loncarevic, I.F., Zentgraf, H., Schröder, C.H., (1990). Sequence of a replication competent hepatitis B virus genome with a pre-X open reading frame. *Nucleic Acids Res.* 18: 4940

Lopez-Cabrera, M., Letowski, J., Hu, K.Q., Siddiqui, A., (1990). Multiple liver specific factors bind to hepatitis B virus core/precore genomic promoter: Transactivation and repression by CCAAT/encapsidation binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 5069-73

Lucey, M., R., Graham, D., M., Martin, P., Di Bisceglie, A., Rosenthal, S., Waggoner, J., G., Merion, R., M., Campbell, D., A., Nostrant, T., T., Appelman, H., D., (1992). Recurrence of hepatitis B and delta hepatitis after orthotopic liver transplantation. *Gut* 33: 1390-6

Mangold, C.M.T., Streek, R.E., (1993). Mutational analysis of the cystine residues in the hepatitis B virus small envelope protein. *J. Virol.* 67: 4588-97

Mason, W. S., Seal, G., Summers, J., (1980). Virus of Pekin ducks with structural and biological relatedness to hepatitis B virus of humans. *J. Virol.* 36: 829

McMahon, G., Ehrlich, P.H., Moustafa, Z., McCarthy, L., Dottavio, D., Tolpin, M., Nadler, P., Östberg, I., (1992). Genetic alterations in the gene encoding the major HBsAg: DNA and immunological analysis of recurrent HBsAg derived from monoclonal antibody-treated liver transplant recipients. *Hepatology* 15: 757-66

Milich, D., Jones, J., Hughes, J., Price, J., Raney, A., McLachlan, (1990). Is a funktion of the secreted hepatitis B e antigen to induce immunological tolerance in utero? *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87: 6599-603

Milich, D., (1997) Influence of T-helper cell subsets and cross regulation in hepatitis B virus infection. *Journal of Viral Hepatitis* 4 (Suppl. 2): 48-59

Miyanochara, A., Imamura, T., Araki, M., Sugawara, K., Ohtomo, N., Matsubara, K., (1986). Expression of hepatitis B virus core antigen gene in *Saccharomyces cerevisiae*: synthesis of two polypeptides translated from different initiation codons. *J. Virol.* 59: 176-80

Monjardino, J. P., Saldanha, J. A., (1990). Delta hepatitis-the disease and the virus. *Br. Med. Bull.* 46: 399-407

Moriyama, K., Okamoto, K., Tsuda, F., Mayumi, M., (1996). Reduced precore transcription and enhanced core-pregenome transcription of hepatitis B virus DNA after replacement of the precore-core promoter with sequences associated with e antigen-seronegative persistent infections. *Virology* 226: 269-80

Nakijama, E., Minami, M., Ochiya, T., Kagawa, K., Okanoue, T., (1994). PreS1 deleted variants of hepatitis B virus in patients with chronic hepatitis. *J. Hepatol.* 20: 329-35

Nassal, M., Rieger, A., (1993). An intramolecular disulfide bridge between Cys-7 and Cys-61 determines the structure of the secretory core gene product (e Antigen) of Hepatitis B virus. *J. Virol.* 67: 4307-15

Nassal, M., Schaller, H., (1993). Hepatitis B virus replication. *Trends Microbiol.* 1: 221-8

Neurath, A.R., Kent, S.B., Strick, N., Parker, K., (1986). Identification and chemical synthesis of a host cell receptor binding site on the hepatitis B virus. *Cell* 46: 429-36

Ogata, N., Miller, R., Ishak, K., Purcell, R., (1993). The complete nucleotide sequence of a precore mutant of hepatitis B virus implicated fulminant hepatitis and its biological characterization in chimpanzees. *Virology* 194: 263-76

Okamoto, H., Imai, M., Tsuda, F., Tanaka, T., Miyakawa, Y., Mayumi, M., (1987). Point mutation in the S gene hepatitis B virus for a d/y or w/r subtypic change in two blood donors carrying a surface antigen of compound subtype adyr or adwr. *J. Virol.* 61: 3030-4

Okamoto, H., Yotsumoto, S., Tsuda, F., Machida, A., Mayumi, M., (1989). Quantitative and qualitative in serum HBV DNA between HBeAg positive carriers and those positive for anti Hbe. *Japan. J. Exp. Med.* 59: 259-62

Okamoto, H., Omi, S., Wang, Y., Itoh, Y., Tsuda, F., Tanaka, T., Akahane, Y., Miyakawa, Y., Mayumi, M., (1989). The loss of subtypic determinants in alleles, d/y or w/r, on hepatitis B surface antigen. *Mol. Immunol.* 26: 197-205

Okamoto, H., Yotsumoto, S., Akahane, Y., Yamanaka, T., Miyazaki, Y., Sugai, Y., Tsuda, F., Tanaka, T., Miyakawa, Y., Mayumi, M., (1990). Hepatitis B viruses with precore region defects prevail in persistently infected hosts along with seroconversion to the antibody against e antigen. *J. Virol.* 64: 1298-303

Okamoto, H., Yano, K., Nozaki, Y. et al., (1992). Mutation within the S gene of hepatitis B virus transmitted from mother to babies immunized with hepatitis immune globulin and vaccine. *pediatr. Res.* 32: 264-8

Okamoto, H., Tsuda, F., Akahane, Y., Sugai, Y., Yoshida, M., Moriyama, K., Tanaka, T., Miyakawa, Y., Mayumi, M., (1994). Hepatitis B virus mutations in the core promoter for an e antigen-negative phenotype in carriers with antibody to e antigen. *J. Virology* 68: 8102-10

Omata, M., Ehata, T., Yokosuka, O., Hosoda, K., Ohto, M., (1991). Mutations in the precore region of hepatitis B virus DNA in patients with fulminant and severe hepatitis. *N. Engl. J. Med.* 324: 1699-704

Omi, S., Okamoto, H., Tsuda, F., Mayumi, M., (1990). Defects in the precore region of hepatitis B virus DNA in a plasma pool from carriers seropositive for antibody against e antigen and with infectivity in chimpanzees. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 5: 646-52

Oren, I., Hershov, R., Ben-Porath, E., Krivoy, N., Goldstein, N., Rishpon, S., et al. (1989). A common source outbreak of fulminant hepatitis B in a hospital. *Ann. Intern. Med.* 110: 691-8

Orito, E., Mizokami, M., Ina, Y., Moriyama, E., Kameshima, N., Yamamoto, M., Gojobori, T., (1989). Host-independent evolution and a genetic classification of the hepadnavirus family based on nucleotide sequences. *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)* 86: 7059-62

Penna, A., Chisari, F.V., Bertoletti, A., Missale, G., Fowler, P., Giuberti, T., Fiaccadori, F., Ferrari, C., (1991). Cytotoxic T lymphocytes recognize an HLA-A2-restricted epitope within the hepatitis B virus nucleocapsid antigen. *J. Exp. Med.* 1565-70

Polish, L. B., Gallagher, M., Fields, H. A., Hadler, S. C., (1993). Delta hepatitis: Molecular biology and clinical and epidemiological features. *Clin. Microbiol. Rev.* 6: 211-29

Pollicino, T., Zanetti, A., Cacciola, I., Petit, M., Smedile, A., Campo, S., Sagliocca, I., Pasquali, M., Tanzi, E., Longo, G., Raimondo, G., (1997). Pre-S2 defective hepatitis B virus infection in patients with fulminant hepatitis.

Pontisso, P., Petit, M.A., Bankowski, M.J., Peeples, M.E., (1989). Human liver plasma membranes contain receptors for the hepatitis B virus preS1 region and, via polymerized human serum albumin, for the preS2 region. *J. Virol.* 63: 1981-8

Protzer-Knolle, U., Naumann, U., Bartenschlager, R., Berg, T., Hopf, U., Meyer zum Büschenfelde, K.-H., Neuhaus, P., Gerken, G., (1998). Hepatitis B virus with antigenically altered hepatitis B surface antigen is selected by high-dose hepatitis B immune globulin after liver transplantation. *Hepatology*. 27: 254-63

Raimondo, G., Campo, S., Smedile, V. et al., (1991). Hepatitis B virus variant with a deletion in the preS2 and two translational stop codons in the precore regions, in a patient with hepatocellular carcinoma. *J. Hepatology*. 13 (Suppl 4): S74-7

Raney, A. K., Milich, D. R., Lachlan, A. M., (1989). Characterization of hepatitis B virus major surface antigen transcriptional regulatory element in differentiated hepatoma cell lines. *J. Virol.* 63: 3919-25

Raney, A., Johnson, J., Palmer, C., McLachlan, A., (1997). Members of the nuclear receptor superfamily regulate transcription from the hepatitis B virus nucleocapsid promoter. *J. Virol.* 71(2): 1058-71

Repp, R., Keller, C., Borkhardt, A., Csecke, A., Schäfer, S., Gerlich, W.H., Lampert, F., (1992). Detection of a hepatitis B virus variant with a truncated X gene and enhancer II. *Arch. Virol.* 125: 299-304

Riede, U.-S., Schaefer, H.-E., (1993). *Allgemeine und spezielle Pathologie*, 3.Aufl., Thieme, Stuttgart New York.

Rizzetto, M., Canese, M.G., Arico, S., Crivelli, O., Trepo, C., Bonino, F., Verme, G., (1977). Immunofluorescence detection of new antigen-antibody system (delta/anti-delta) associated to hepatitis B virus in liver and serum of HBsAg carriers. *Gut* 18: 997-1003.

Rizzetto, M., Canese, M. G., Gerin, J. L., London, W. T., Sly, D. L., Purcell, R. H., (1980). Transmission of hepatitis B virus-associated delta antigen to chimpanzees. *J. Infect. Dis.* 141: 590-602

Rizzetto, M., Gocke, D. J., Verme, G., Shih, J. W. K., Purcell, R. H., Gerin, J. L., (1979). Incidence and significance of antibodies to delta antigen in hepatitis B virus infection. *Lancet* 11: 986-90

Rizzetto, M., Shih, J. W. K., Gerin, J. L., (1980). The hepatitis B virus-associated delta antigen: isolation from liver, development of solid-phase radioimmunoassays for a delta antigen and anti-delta and partial characterization of a delta antigen

Robinson, S. W., Clayton, C. A., Greenman, R. L., (1974). DNA of a human hepatitis B virus candidate. *J. Virol.* 63: 798-808

Roingard, P., Rommet-Lemonne, J., Leturq, D., Goudeau, A., Essex, M., (1990). Hepatitis B virus core antigen (HBcAg) accumulation in an HBV nonproducer clone of HepG2-transfected cells is associated with a cytopathic effect. *Virology* 179: 113-20

Runkel, L., Fischer, M., Schaller, H., (1993). 2-Codon insertion mutations of the Hbx define two separate regions necessary for its trans-activation function. *Virology* 197: 529-36

Salfeld, J., Pfaff, E., Noah, M., Schaller, H., (1989). Antigenic determinants and functional domains in core antigen and e antigen from hepatitis B virus. *J. Virol.* 63: 798-808

Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd Ed., Cold Spring Laboratory Press, New York.

Santantonio, T., Jung, M.C., Miska, S., Postore, G., Pape, G.R., Will, H., (1991). Prevalence and type of pre-C HBV mutants in antiHBe positive carriers with chronic liver disease in a highly endemic area. *Virology* 183: 840-4

Saracco, G., Macagno, S., Rosina, F., Caredda, F., Antinori, S., Rizzetto, M., (1988). Serologic markers with fulminant hepatitis in persons positive for hepatitis B surface antigen: a worldwide epidemiological and clinical survey. *Ann. Intern. Med.* 108: 380-3

Sato, S., Suzuki, K., Akahane, Y., Akamatsu, K., Akiyama, K., Yonumura, K., Tsuda, F., Tanaka, T., Okamoto, H., Miyakawa, Y., Mayumi, M., (1995). Hepatitis B virus strains with mutations in the core promoter in patients with fulminant hepatitis. *Ann. Intern. Med.* 122: 241-8

Scaglioni, P., Melegari, M., Wands, J., (1994). Characterization of hepatitis B virus core mutants that inhibit viral replication. *Virol.* 205: 112-20

Schödel, F., Moriarty, A.M., Peterson, D.L., Zheng, J.A., Hughes, J.L., Will, H., Leturcq, D.J., McGee, J.S., Milich, D.R., (1992). The position of heterologous epitopes inverted in hepatitis B virus core particles determines their immunogenicity. *J. Virol.* 66: 106-14

Smedile, A., Farci, P., Verme, G., Caredda, F., Cargnel, A., Caporaso, N., Dentico, P., (1982). Influence of delta infection on severity of hepatitis B. *Lancet* 2: 945-7

Soh, L., Ang, P., Sng, I., Chua, E., Ong, Y., (1992). Fulminant hepatic failure in Non-Hodgkin lymphoma patients treated with chemotherapy. *Eur. J. Cancer* 28A: 1338-9

Sterneck, M., Günther, S., Santantonio, T., Fischer, L., Broelsch, C.E., Greten, H., Will, H., (1996). Hepatitis B virus genomes of patients with fulminant hepatitis do not share a specific mutation. *J. Hepatol.* 24: 300-306

Sterneck, M., Günther, S., Gerlach, J., Naoumov, N., Santantonio, T., Broelsch, C.E., Williams, R., Will, H., (1997). Hepatitis B virus sequence changes in liver transplant recipients with fulminant hepatitis. *J. Hepatol.* 26: 754-64

Summers, J., Mason, W. S., (1982). Replikation of a hepatitis B like virus by reverse transcription of an RNA intermediate. *Cell* 29:403-15

Takada, S., Koike, K., (1990). Trans-activation function of a 3' truncated X gene-cell fusion product from integrated hepatitis B virus DNA in chronic hepatitis tissues. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 87: 5628-32

Takada, S., Kido, H., Fukotomi, A., Mori, T., Koike, K., (1994). Interaction of hepatitis B virus x protein with a serine protease, tryptase TI as an inhibitor. *Oncogene* 9: 341-8

Terazawa, S., Kojima, M., Yamanaka, T., Yotsumoto, S., Okamoto, H., Tsuda, F., Miyakawa, Y., Mayumi, M., (1991). Hepatitis B virus mutants with precore-region defects in two babies with fulminant hepatitis and their mothers positive for antibody to hepatitis B e antigen. *Pediatric Research* 29(1): 5-9

Thomas, H., Carman, W., (1991). The host immune response may be responsible for selection of envelope and precore/core variants of HBV. *J. Hepatol.* 13(4): 108-13

Tong, S., Li, J., Vitvitski, L., Trepo, C., (1992). Replication capacities of natural and artificial precore stop codon mutants of hepatitis B virus: relevance of pregenome encapsidation signal. *Virology* 191: 237-45

Trautwein, C., Schrem, H., Tillmann, H., Kubicka, S., Walker, D., Böker, K., Maschek, H.-J., Pichlmayr, R., Manns, M., (1996). Hepatitis B virus mutations in the pre-S genome before and after liver transplantation. *Hepatology* 24: 482-8

Trey, C., Davidson, C., (1979). The management of fulminant hepatic failure. *Progress Liver Disease* 3: 282-90

Treinin, M., Laub, O., (1987). Identification of a promoter element located upstream from the hepatitis B virus x gene. *Molecular Cell Biology* 7: 545-8

Tur-Kaspa, R., Shaul, Y., Moore, D., Burk, R., Okret, S., Poellinger, L., Shafritz, D., (1988). The glucocorticoid receptor recognizes a specific nucleotid sequence in hepatitis B virus DNA causing increased activity of the HBV enhancer. *Virology* 167: 630-633

Tur-Kaspa, R., Klein, A., Aharonson, S., (1992). Hepatitis B virus precore mutants are identical in carriers from varios ethnic origins with a range of liver disease severity. *Hepatology* 16: 1338-42

Uchida, T., (1993). Genetic variations of the hepatitis B virus and their clinical relevance. *Microbiol. Immunol.* 37: 425-39

Wang, K. S., Choo, Q. L., Weiner, K. J., et al., (1986). Structure, sequence and expression of the hepatitis delta ( $\delta$ ) viral genome. *Nature.* 323: 508-13

Waters, J.A., Kennedy, M., Voet, P., Hauser, P., Petre, J., Carman, W., Thomas, H.C., (1992). Loss of the common 'a' determinant of hepatitis B surface antigen by a vaccine-induced escape mutant. *J. Clin. Invest.* 90: 2543-7

Weber, M., Bronsema, V., Bartos, H., Bosserhoff, A., Bartenschläger, R., Schaller, H. J., (1994). Hepadnavirus P protein utilizes a Tyrosine residue in the TP domaine to prime reverse transcription. *Virology* 68: 2994-9

Weizsäcker, F.v., Geiss, I., Wirth, S., Blum, H., (1995). Selective transmission of variant genomes from mother to infant in neonatal fulminant hepatitis B. *Hepatology* 21: 8-13

Wollersheim, M., Debelka, U., Hofschneider, P.H., (1987). A transactivating function encoded in the hepatitis B virus X gene is conserved in the integrated state. *Oncogene* 3: 545-54

Yamamoto, K., Horikita, M., Tsuda, F., (1994). Naturally occuring escape mutants of hepatitis B virus with various mutations in the S gene in carriers seropositive for antibody to hepatitis B surface antigen. *J. Virol.* 68: 2671-6

Yamanaka, T., Akahane, Y., Suzuki, H., Okamoto, H., Tsuda, F., Miyakawa, Y., Mayumi, M., (1990). Hepatitis B surface antigen particles with all four subtypic determinants: Point mutations of hepatitis B virus DNA inducing phenotypic changes or double infection with viruses of different subtypes. *Mol. Immunol.* 27: 443-9

Yee, J. K., (1989). A liver-specific enhancer in the core promotor region of human hepatitis B virus. *Science* 246: 658-61

Yen, T., (1993). Regulation of hepatitis B virus gene expression. *Seminars in Virology* 4: 33-42

Yoshihara, M., Sekiyama, K., Sugata, F., Okamoto, H., Yamamoto, K., Yotsumoto, S., (1992). Reactivation of precore mutant hepatitis B virus leading to fulminant hepatic failure following cytotoxic treatment. *Dig. Dis. Science* 37 ,No.8: 1253-9

Yotsumoto, S., Kojima, M., Shoji, I., Yamamoto, K., Okamoto, H., Mishiro, S., (1991). Fulminant hepatitis related to transmission of hepatitis B variants with precore mutations between spouses. *Hepatology* 16: 31-5

Yuan, T., Faruqi, A., Shih, J., Shih, C., (1995). The mechanism of natural occurrence of two closely linked HBV precore predominant mutations. *Virology* 211: 144-56

Zheng, J., Schödel, F., Petersen, D., (1992). The structure of hepadnaviral core antigens. *J. of Biol. Chem.* 267: 9422-9

## **7 Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. Sterneck, die mit ihrer Sachkenntnis, Geduld, Energie und ihrer konstruktiven Diskussionsbereitschaft wesentlich am Gelingen dieser Arbeit beteiligt war.

Die molekularbiologischen Arbeiten wurden hauptsächlich in der Abteilung für experimentelle Virologie und Immunologie am Heinrich-Pette-Institut unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Will erstellt. Ihm sei für seine kontinuierliche wissenschaftliche Betreuung und seine kritischen Anmerkungen ganz besonders gedankt.

Herrn Dr. Günther bin ich für seine konstruktive Zusammenarbeit im Labor und die zahlreichen Diskussionen sehr verbunden.

Ferner danke ich Frau Domagalski für ihre technische Unterstützung im Labor.

Schließlich möchte ich mich bei meinem Sohn Johann Gerlach, bei meiner Frau Constanze Gerlach sowie bei meinen Eltern Frau Dr. med. Ursula Gerlach und Herrn Dr. med. habil. Hermannfriedrich Gerlach herzlichst bedanken, ohne deren Geduld, Rücksichtnahme und Verständnis diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

**8 Lebenslauf**

- Vor- und Familienname : Jochen Gerlach
- Geburtsdatum : 18.02.1971
- Geburtsort : Halle/Saale
- Eltern : Dr. med. habil. Hermannfriedrich Gerlach und  
Dr. med. Ursula Gerlach, geb. Kehlen
- Familienstand : verheiratet mit Constanze Gerlach, ein Sohn, Johann Gerlach
- Schulbesuch : Sept. 1977 bis Aug. 1987 Besuch der Polytechnischen Oberschule  
(Abschluß mit einem Notendurchschnitt von 1,0)  
Sept. 1987 bis Aug. 1989 Besuch der Erweiterten Oberschule und  
Erlangung des Abiturs (Abschluß mit einem Notendurchschnitt  
von 1,3)
- Grundwehrdienst : Sept. 1989 bis Feb. 1990
- Berufstätigkeit : April 1990 bis Okt. 1990 als Pflegehelfer auf der nephrologischen  
Station des Universitätskrankenhauses Eppendorf
- Studium : Okt. 1990 Aufnahme eines Humanmedizinstudiums an der  
Hamburger Universität  
Sept.1993 Famulatur in der Orthopädie/Orthopädischen Chirurgie  
Febr./März 1994 Famulatur in der Neurologischen Klinik des  
UKE  
Aug./Sept. 1994 Famulatur in der Neurochirurgischen Klinik des  
UKE  
Febr. 1995 Famulatur in der Urologischen Klinik des AK Eilbek  
April 1996-März 1997 PJ im AK St. Georg
- Ärztliche Prüfungen : Aug./Sept. 1992 Ablegen der Ärztlichen Vorprüfung (Note 2,0)  
Aug. 1993 Ablegen des 1. Staatsexamens (Note 2,0)  
März 1996 Ablegen des 2. Staatsexamens (Note 1,66)  
April 1997 Ablegen des 3. Staatsexamens (Note 1,00)  
Gesamtnote der Ärztlichen Prüfung: „sehr gut“ (Note 1,49)
- Ärztliche Tätigkeit : Mai 1997-Oktober 1998 AIP in der Medizinischen Abt. des  
Kreiskrankenhauses Kaltenkirchen,  
seit November 1998 Assistenzarzt in der Medizinischen Abteilung  
des Kreiskrankenhauses Kaltenkirchen