

Aus
der Abteilung für Allgemeine Virologie
Heinrich-Pette-Institut für Experimentelle Virologie und Immunologie
an der Universität Hamburg
Leiter Prof. Dr. H. Will
und
der Abteilung für Hepatobiliäre Chirurgie der Klinik und Poliklinik für Chirurgie
am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Leiter Prof. Dr. h.c. X. Rogiers

Molekulare Charakterisierung von Hepatitis B Virus-Populationen in Patienten mit
fibrosierender cholestatischer Hepatitis

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von
Christoph Müller-Ruchholtz
aus Kiel

Hamburg, 2002

Angenommen von dem Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: 27.01.2003

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg.

Dekan: Prof. Dr. C. Wagener

Referent: Priv. Doz. Dr. M. Sterneck

Koreferent: Prof. Dr. X. Rogiers

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	3
1.1 Bedeutung des Hepatitis B Virus.....	3
1.2 Aufbau und Replikation des HBV	4
1.3 Einteilung und Sequenzvariabilität des HBV	7
1.4 Lebertransplantation und Reinfektion bei chronischer Hepatitis B.....	8
1.5 Fibrosierende cholestatische Hepatitis (FCH).....	8
1.6 Fragestellung dieser Arbeit.....	11
2 Material und Methoden	12
2.1 Patienten.....	12
2.2 HBV-DNA-Isolierung aus den Patientenseren (= Serumextraktion).....	13
2.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	13
2.3.1 Gesamt-Genom-PCR	13
2.3.2 Subgenomische PCR	15
2.3.3 Fragment-PCR.....	15
2.3.4 Maßnahmen zur Vermeidung von Kontaminationen	15
2.4 Gelelektrophorese	17
2.5 Aufreinigung und Direkt-Sequenzierung der PCR-Produkte	17
2.6 Auswertung der Sequenzdaten.....	19
2.7 Aufreinigung der PCR-Produkte für die Klonierung und DNA-Restriktion	20
2.8 Gel-Extraktion der PCR-Produkte	20
2.9 Präparation des Vektors und Ligation	21
2.10 Herstellung kompetenter Escherichia coli	21
2.11 Transformation.....	22
2.12 Cracking.....	22
2.13 Plasmid Mini-Präparation	22
2.14 Puffer und Lösungen.....	23
3 Ergebnisse	24
3.1 Proben-Amplifikation	24
3.2 Direkt-Sequenzierung	25
3.2.1 HBV-Sequenzunterschiede zwischen LTX und FCH-Auftreten.....	26
3.2.1.1 Mutationen auf Nukleotid-Ebene.....	26
3.2.1.2 Aminosäuren-Austausche	28
3.2.2 HBV-Sequenzvergleich mit Referenzgenomen / Neumutationen	32
3.2.2.1 Genotypisierung und Auswahl des Referenzgenomes	32
3.2.2.2 Genotyp-interne Mutationen.....	33
3.2.2.3 Neubeschriebene Mutationen	38
3.3 Deletionsvarianten in der Direkt-Sequenzierung.....	41
3.4 Sequenzergebnisse klonierter HBV-Genome	42
3.5 Mutationen in funktionell bedeutsamen Regionen	48

4 Diskussion.....	51
4.1 Methodische Anmerkungen.....	51
4.2 Genotypen.....	52
4.3 HBV-Sequenzunterschiede zwischen LTX und FCH-Auftreten.....	53
4.4 Sequenzergebnisse und mögliche funktionelle Auswirkungen.....	55
4.4.1 Mutationen im präC-Bereich.....	55
4.4.2 Mutationen im Core-Promotor.....	58
4.4.3 Mutationen im C-Gen/ Core-Protein.....	60
4.4.4 Mutationen im präS/S-Bereich.....	61
4.4.4.1 Deletionen in präS1.....	61
4.4.4.2 Mutationen in der α -Determinante.....	63
4.4.4.3 Stopkodon im S-Gen.....	64
4.4.5 Mutationen im P-Protein.....	65
4.5 Abschließender Vergleich mit bisherigen Sequenzanalysen bei FCH und Ausblick.....	65
5 Zusammenfassung.....	68
6 Literaturverzeichnis.....	70
7 Anhang.....	83
7.1 Abkürzungsverzeichnis.....	83
7.2 Referenzgenome.....	86
7.3 Danksagung.....	87
7.4 Lebenslauf.....	88
7.5 Erklärung.....	89

1 Einleitung

1.1 Bedeutung des Hepatitis B Virus

Mit weltweit ca. 350 Millionen chronisch infizierten Menschen stellt das Hepatitis B Virus (HBV) ein ernstes Gesundheitsproblem dar. Seine Verbreitung liegt vor allem im südostasiatischen und tropisch-afrikanischen Raum (Boker und Manns 1993), wo etwa 5-15% der Bevölkerung chronische Virusträger sind. Der Großteil der Infektionen ist auf die perinatale Übertragung von einer infizierten Mutter auf das Neugeborene zurückzuführen, was in ca. 90% eine chronische Infektion nach sich zieht. In Europa und Nordamerika sind unter 1% der Bevölkerung infiziert und die Übertragung des Virus erfolgt meist parenteral im Erwachsenenalter.

Nach einer Infektion mit dem Hepatitis B Virus werden verschiedene Krankheitsverläufe beobachtet (Übersicht bei Hollinger 1996, Tiollais und Buendia 1991). 65-80% der akuten Infektionen verlaufen klinisch inapparent, 20-35% ikterisch, ca. 1% fulminant. Insgesamt heilen im Erwachsenenalter ca. 90% der Erkrankungen aus, während ungefähr jede zehnte Hepatitis B einen chronischen Verlauf nimmt. Dieser kann asymptomatisch sein, sich aber auch als chronisch persistente oder chronisch aktive Hepatitis manifestieren und zu einer Leberzirrhose führen. Zusätzlich steigt das relative Risiko, an einem primären hepatozellulären Karzinom (HCC) zu erkranken, bei chronischen Virusträgern um mehr als das 100-fache an (Arbuthnot et al. 2001). Damit spielt das HBV eine wichtige Rolle in der Pathogenese des HCC (Beasley et al. 1988) und ist ein Grund dafür, daß diese Malignomart weltweit zu den häufigsten zählt.

Hauptverantwortlich für die entstehenden Leberzellschäden ist nach heutigem Kenntnisstand die Immunantwort des Wirtes auf das Virus (zusammengefaßt bei Jung und Pape 1994, Hollinger 1996). CD4-T-Helfer-Lymphozyten beeinflussen über die Sekretion verschiedener Lymphokine die Produktion von Antikörpern und zytotoxischen T-Lymphozyten und wirken unter Umständen selbst zelltötend. Die zytotoxischen CD8-T-Lymphozyten (CTL) werden durch Viruspeptid-präsentierende HLA-Klasse I-Moleküle auf den infizierten Hepatozyten angelockt und zerstören diese (Bertoletti et al. 1991). Neben der Interleukin- und Interferonausschüttung besteht die humorale Immunantwort aus Antikörperproduktion vor allem gegen die Virusproteine HBcAg, HBeAg und HBsAg (siehe Kap. 1.2). Im Gegensatz zu den Erkenntnissen bezüglich einer immunbedingten

Zellschädigung fehlt es an Hinweisen für eine direkte Zytotoxizität des HBV unter normalen Bedingungen (Hollinger 1996).

1.2 Aufbau und Replikation des HBV

Das Hepatitis B Virus wird zur Familie der Hepadnaviridae (hepatotrope DNA-Viren) gezählt. Verwandte Viren wurden u.a. aus Marmosetten (Woodchuck Hepatitis Virus, WHV), Erdhörnchen (Ground Squirrel Hepatitis Virus, GSHV), Peking-Enten (Duck Hepatitis B Virus, DHBV) und Graureihern (Heron Hepatitis B Virus) isoliert (Schödel et al. 1989).

Das infektiöse Hepatitis B Virion mit einer Größe von 42 nm, nach seinem Entdecker auch Dane-Partikel genannt (Dane et al. 1970) besteht aus einer äußeren Virushülle, die die drei unterschiedlich großen Oberflächen-Proteine (Hepatitis B Surface Antigen, HBsAg) large/L-, middle/M- und small/S-HBsAg enthält, und einem inneren Kern (Nukleokapsid, Core), der aus Core-Proteinen (Hepatitis B Core Antigen, HBcAg) zusammengesetzt ist. Dieser enthält das Virus-Genom, an das das sogenannte P-Protein kovalent gebunden ist. Neben den Dane-Partikeln werden im Serum Infizierter auch nicht-infektiöse, ca. 20 nm große Hüll-Partikel aus HBsAg, sog. subvirale Partikel, in großem Überschuß gefunden (z.B. Ganem 1996).

Das Virus-Genom besteht aus einer offenen, zirkulären und nur partiell doppelsträngigen DNA, die mit ihrer Länge von nur 3,2 Kilobasen (kB) das HBV zu einem der kleinsten bisher bekannten humanpathogenen Viren macht. Dabei ist das Genom außerordentlich kompakt organisiert. So haben beispielsweise alle Nukleotide eine kodierende Funktion, mehr als die Hälfte von ihnen werden in mehr als einem Leserahmen benutzt und alle regulatorischen Signale überlappen sich mit kodierenden Regionen (z.B. Nassal und Schaller 1993) (Abb. 1).

Der DNA-Minusstrang hat an seinem 5'-Ende ein sog. terminales Protein kovalent gebunden und ist terminal redundant. Der Plusstrang variiert in seiner Länge und enthält am 5'-Ende ein Oligoribonukleotid, das als Primer für die Plusstrang-Synthese dient.

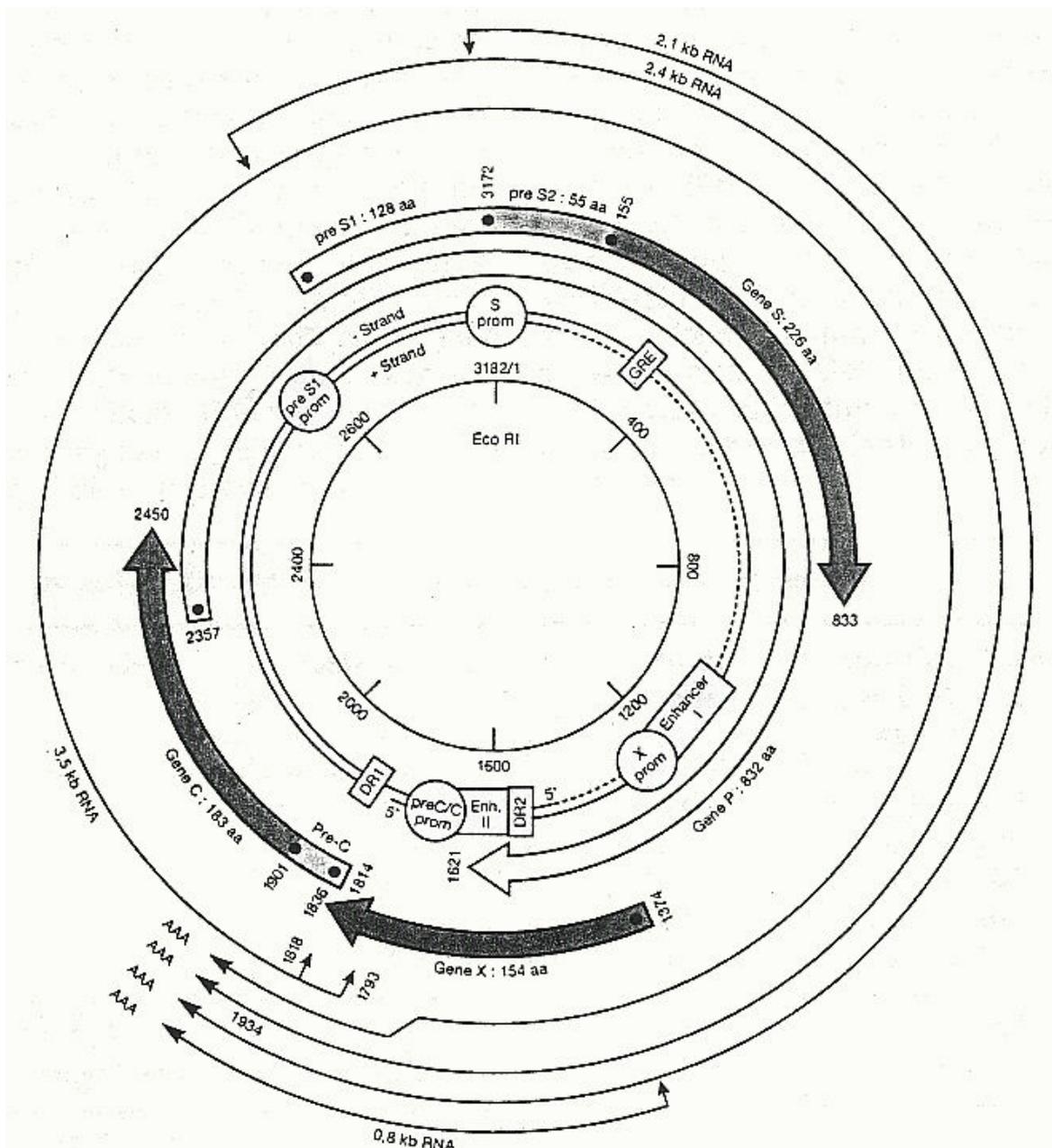


Abbildung 1: Genetische Organisation des Hepatitis B Virus (aus Gerken et al. 1994). Von innen nach außen: Numerierung des Genoms (Subtyp ayw) anhand der Schnittstelle der Restriktions-endonuklease EcoRI (nach Galibert et al. 1979); DNA-Plus- und Minusstrang mit Regulationselementen; in Balkenform die vier offenen Leserahmen; zu äußerst die vier RNA-Transkripte mit polyA-Schwanz. GRE: glucocorticoid responsive element, prom: Promotor, DR: direct repeat, aa: Aminosäure.

Im Minusstrang des Genoms existieren vier offene Leserahmen: PräS/S-Gen, PräC/C-Gen, P-Gen und X-Gen.

Das PräS/S-Gen kodiert mit seinen Regionen PräS1, PräS2 und S für das große (large/L-HBsAg), mittlere (middle/M-HBsAg) und kleine (small/S-HBsAg) Oberflächen-Protein. L-

und S-HBsAg werden für das Virus-Assembly benötigt, M-HBsAg für die Bindung des Virus an den Hepatozyten (zusammengefaßt bei Ganem 1996). L- und M-HBsAg machen nur etwa 1-2% bzw. 5-15% der zirkulierenden Oberflächen-Proteine aus (Ganem 1996). Für die Diagnostik der HBV-Infektion ist das S-HBsAg von zentraler Bedeutung durch 1. seine hohe Immunogenität, vor allem der sog. a-Determinante, gegen die ein Großteil der nachgewiesenen Anti-HBs-Antikörper gerichtet ist, sowie 2. durch den Nachweis eben dieser Antikörper als Ausdruck einer Immunität nach ausgestandener Infektion bzw. aktiver Schutzimpfung. Die Vakzine enthält S-HBsAg, welches die Synthese von Anti-HBs-Antikörpern auslöst, die virusneutralisierend wirken.

Der PräC/C-Bereich enthält die Information für das Core-Protein (HBcAg) als Baustein des Nukleokapsids und für das N-terminal um 29 Aminosäuren verlängerte PräC-Protein (HBeAg), welches sezerniert wird und für die Virus-Replikation nicht essentiell ist. In löslicher Form im Serum nachweisbar, dient das HBeAg als Marker für Virusreplikation und Infektiosität.

Das P-Gen kodiert für die virale Polymerase (P-Protein), die in verschiedenen funktionellen Domänen nachgewiesene Aktivität als Reverse Transkriptase (RT), DNA-abhängige DNA-Polymerase und RNase H besitzt (Radziwill et al. 1990). Außerdem fungiert das P-Protein als Primer für die DNA-Minusstrang-Synthese ("Protein-Priming") und initiiert das Virion-Assembly (Bartenschlager und Schaller 1992).

Das X-Gen kodiert für das X-Protein (HBxAg), das transaktivierende Aktivität gegenüber viralen und zellulären Promotoren hat. Es steht im Verdacht, onkogene Eigenschaften zu haben (Will 1991). Für die Virus-Replikation in vitro ist es entbehrlich (Blum et al. 1992), scheint aber für die Infektion nötig zu sein (Zoulim et al. 1994).

Replikation:

Nach der Infektion einer Wirtszelle durch das Virion und dessen "uncoating" wird das virale Genom in den Zellkern transportiert. Dort wird es in eine kovalent geschlossene, zirkuläre Form (ccc-DNA) überführt, die als Matrize für die Transkription durch die Wirts-RNA-Polymerase dient.

Es werden, von den vier Promotoren prägenomischer/C-, PräS1-, S- und X-Promotor reguliert, vier verschieden große RNA-Transkripte synthetisiert: prägenomische/C mRNA (3,5 kB), PräS mRNA (2,4 kB), S mRNA (2,1 kB) und X mRNA (0,7 kB). Diese enden koterminale nach einem einheitlichen Polyadenylierungssignal. Zwei im HBV-Genom

enthaltene Enhancer-Elemente können die Transkriptionsraten der Promotoren erhöhen. Dabei wirkt der erste (ENH I) auf alle, der zweite (ENH II) auf prägenomischen und S-Promotor (zusammengefaßt von Ganem 1996). Der ENH II überlappt C-terminal mit dem Basic Core Promoter (BCP). Dieser Teil des Core-Promotors genügt für eine suffiziente Transkription der prägenomischen und C-mRNA (Yuh et al. 1992).

Nach dem Transport der prägenomischen RNA ins Zytoplasma und der Bindung des P-Proteins wird sie durch Anlagerung von Core-Dimeren in unreife Kapside verpackt.

Daraufhin wird der DNA-Minusstrang durch die Reverse Transkriptase-Aktivität des P-Proteins synthetisiert und gleichzeitig die RNA durch die RNase H-Aktivität degradiert. Nach inkompletter Synthese des Plusstrangs wird das Nukleokapsid umhüllt und als reifes Virion sezerniert. Alternativ wird das Genom für einen neuen Replikationszyklus wieder in den Zellkern transportiert.

1.3 Einteilung und Sequenzvariabilität des HBV

Durch Sequenzvarianzen im HBsAg, die zu verschiedenen antigenen Determinanten führen, läßt sich das Hepatitis B Virus in 4 Subtypen einteilen: adw, adr, ayw und ayr. Dabei ist allen Typen die sogenannte a-Determinante gemein, d bzw. y an zweiter Stelle werden durch die Aminosäure Lysin bzw. Arginin an Position 122, w bzw. r an dritter Stelle durch Lysin bzw. Arginin an Position 160 des HBsAg bestimmt (Okamoto et al. 1987).

Desweiteren wird das HBV aufgrund von Homologien in der Nukleotid-Sequenz in die 6 Genotypen A-F unterteilt (Okamoto et al. 1988, Norder et al. 1992). Hierbei liegen die Sequenzunterschiede unter den Genotypen zwischen 8,1 und 15,5% und innerhalb eines Genotyps bei 1,5-5,4% (Norder et al. 1994). Für die verschiedenen Genotypen gibt es typische Verbreitungsgebiete, beispielsweise für Genotyp A Nordamerika und Europa sowie für Genotyp C Ostasien und Fernost.

Aufgrund der komplizierten Replikation über eine RNA-Zwischenstufe mit Fehlen einer Fehlerkorrektur ("proof-reading-Aktivität") der Reversen Transkriptase und der starken Vermehrung des Virus ist die Entstehung zahlreicher Mutationen zu erwarten. Andererseits sind einer Sequenzvariabilität ohne funktionelle Auswirkungen angesichts des oben erwähnten sehr kompakten Genom-Aufbaus enge Grenzen gesetzt. Nach Beobachtungen

von Okamoto et al. 1987 und Orito et al. 1989 liegt die genetische Variabilität bei ca. 0,1 Nukleotid-Substitutionen pro Genom und Jahr und damit deutlich über der anderer DNA-Genome und in der Größenordnung der meisten RNA-Viren.

1.4 Lebertransplantation und Reinfektion bei chronischer Hepatitis B

Eine Leberzirrhose ebenso wie das fulminante Leberversagen bei HBV-Infektion haben eine sehr ernste Prognose bei limitierten therapeutischen Möglichkeiten. Neben neueren antiviralen Nukleosidanaloga wie Fanciclovir und Lamivudin, die die HBV-Replikation inhibieren, das Virus aber aufgrund persistierender ccc-DNA nicht aus dem Körper zu entfernen vermögen, bleibt häufig nur die Lebertransplantation (LTX) als letzte Therapieoption.

Jedoch wird der Erfolg der LTX geschmälert durch die häufige HBV-Reinfektion des Spenderorgans. Diese wird üblicherweise durch das Wiederauftreten von HBsAg im Serum definiert. In einer europaweiten Studie an 372 Patienten, die zwischen 1977 und 1990 transplantiert wurden, stellten Samuel et al. (1993) im Mittel eine 50%ige Reinfektionsrate innerhalb von drei Jahren fest. Mit 83% am höchsten war das Risiko bei Patienten mit vor der Operation im Serum nachweisbarer HBV-DNA oder HBeAg, vergleichsweise niedrig bei Hepatitis D (Delta)-Koinfektion (32%) und fulminanter Hepatitis B (17%).

Durch die prophylaktische Gabe von anti-HBs-Hyperimmunglobulinen (HBIG) nach LTX ließ sich die Zahl der Reinfektionen der Spenderorgane signifikant von 75 auf 36% senken. Daher gehört diese Immunprophylaxe inzwischen zur peri- und postoperativen Standardbehandlung bei HBV-assoziiierter Lebertransplantation.

Eine HBV-Reinfektion nach LTX kann unterschiedliche Verläufe nehmen. Sie kann chronisch mit oder ohne erneuter Entstehung einer Leberzirrhose ablaufen oder das Bild einer fibrosierenden cholestatischen Hepatitis zeigen.

1.5 Fibrosierende cholestatische Hepatitis (FCH)

Das Krankheitsbild der fibrosierenden cholestatischen Hepatitis wurde 1991 erstmals (unter diesem Namen) von Davies et al. bei Patienten nach Lebertransplantation, die aufgrund einer chronischen Hepatitis B durchgeführt wurde, beschrieben. Sie verursacht

ein rapid-progressives Leberversagen mit einer hohen Mortalität meist innerhalb von 4-6 Wochen nach klinischem Auftreten.

Lau et al. stellten 1992 in einer Studie fest, daß eine FCH in 24% der HBsAg-positiven Patienten auftrat, die nach LTX länger als zwei Monate überlebten.

FCH zeichnet sich durch einige typische histologische und klinische Merkmale aus. Histologisch imponieren eine extensive periportale Fibrose, intra- und extrazelluläre Cholestase und ein nur geringes Entzündungszellinfiltrat. Durch immunhistochemische Färbungen lassen sich z.T. massive Mengen der HBV-Antigene HBsAg und HBcAg in den Hepatozyten nachweisen, welche dadurch anschwellen und ein milchglasartiges Aussehen bekommen können. Klinisch fallen eine verlängerte Prothrombin-Zeit als Ausdruck einer verminderten Lebersynthese-Leistung, ein stark erhöhtes Bilirubin und ein nur geringer Anstieg der Serum-Transaminasen auf.

Der Großteil bisheriger Veröffentlichungen beschrieb das Auftreten der FCH bei HBV-Reinfektion nach Lebertransplantation (LTX) (Benner et al. 1992, Harrison et al. 1993, Lau et al. 1992, Walker et al. 1993, Fang et al. 1993, Mason et al. 1993, Angus et al. 1995, Hawkins et al. 1996, Trautwein et al. 1996). Nach und nach häuften sich aber auch Berichte über FCH in chronisch HBV-infizierten Lebern nach Nieren-Transplantation (Chen et al. 1994, Booth et al. 1995, Hung et al. 1995, Lam et al. 1996, Waguri et al. 1998, Kairaitis et al. 1998), Knochenmarks-Transplantation (McIvor et al. 1994) sowie bei HIV-Infektion (Fang et al. 1993, Poulet et al. 1996) und nach Chemotherapie (Lee et al. 2000). Als Gemeinsamkeit aller beschriebenen Fälle einer FCH lassen sich eine chronische HBV-Infektion und ein immunkompromittierter Status des Wirts festhalten.

Die therapeutischen Optionen beim Auftreten einer FCH sind eingeschränkt. Früher konnte das Leben eines Patienten nur durch eine Retransplantation verlängert werden, da er sonst innerhalb von Wochen bis Monaten im Leberversagen verstorben wäre. In der jüngeren Vergangenheit wurden einzelne Behandlungserfolge mit den neueren Nukleosidanaloga Ganciclovir (Jamal et al. 1996) und Lamivudin (Al Faraidy et al. 1997, Chan et al. 1998, Brind et al. 1998) beschrieben, die die Erkrankung aufhalten konnten. Studien über größere Patientenkollektive bzw. Langzeiterfolge liegen jedoch derzeit noch nicht vor.

Die Pathogenese der FCH ist noch unklar. Die am weitesten verbreitete These ist, daß die große Menge akkumulierender viraler Antigene direkt zytotoxisch wirkt (O'Grady et al. 1992, Lau et al. 1992, Mason et al. 1993, Fang et al. 1993, Benner et al. 1992). In einem Tier-Modell mit transgenen Mäusen konnten Chisari et al. 1987 zeigen, daß hohe Konzentrationen des großen Oberflächenproteins zytotoxisch wirken. Die Überproduktion dieser Antigene führt zu deren Akkumulation im endoplasmatischen Retikulum und ineffizienter Sekretion, wodurch die Hepatozyten anschwellen, ein milchglasartiges Aussehen bekommen und schließlich nekrotisieren. In HBV-transfizierten Hepatoblastom HepG2-Zellen konnten Roingard et al. 1990 einen zytopathischen Effekt durch HBcAg-Akkumulation nachweisen.

Wie schon erwähnt, sind bei FCH typischerweise große Mengen von HBsAg (mit prä-S1 und prä-S2) und/oder HBcAg (in Kern und Zytoplasma) in den Hepatozyten zu finden. Deren intrazelluläre Akkumulation erklärt man sich durch gesteigerte Transkription (Mason et al. 1993) bzw. defekte Ausschleusung (Lau et al. 1992).

Bonino und Brunetto (1994) vermuteten die lokale Zytokin-Produktion als Mediator von Leberschaden und Fibrogenese. Dies erscheint aber angesichts der geringen Entzündungszeichen, des nur moderaten Transaminasenanstiegs und der Immunsuppression wenig wahrscheinlich.

Einige prädisponierende Faktoren für die Entwicklung einer FCH wurden in den vergangenen Jahren diskutiert. Von Davies et al. (1991) und Lau et al. (1992) wurde einer hohen Antigen-Expression in der explantierten Leber eine Bedeutung beigemessen. Die immunsuppressive Behandlung nach Transplantation soll unter zwei Gesichtspunkten die FCH-Entstehung begünstigen. Kortikosteroide stimulieren eventuell direkt die Virus-Replikation über das Glucocorticoid-Antwortelement (Tur-Kaspa et al. 1988). Lau et al. (1992b) zeigten, daß Kortikosteroide, aber nicht Azathioprin und Cyclosporin, in einer primären Hepatozyten-Kultur (Hepatozyten aus chronisch HBV-Infizierten) die intrazelluläre Expression von HBsAg und HBcAg steigern. Sagnelli et al. (1980) beschrieben, daß sich generell durch Immunsuppressiva die Antigen-Expression erhöht.

Auch HBV-Mutanten werden als Auslöser von FCH diskutiert. So beschrieben eine Reihe von Autoren die Infektion mit der sogenannten Precore-Mutante (G→A-Austausch an Pos. 1896, s. a. Kap. 4.4.1) in Patienten mit FCH (Fang et al. 1993, Chen et al. 1994, Angus et al. 1995, Booth et al. 1995, McIvor et al. 1994). McMillan et al. (1996) beobachteten die

Krankheit gehäuft bei Infektion mit dem Genotyp D. Trautwein et al. (1996) und Hawkins et al. (1996) fanden in Verbindung mit FCH Mutationen im S-Promotor bzw. in der a-Determinante des Oberflächenproteins des Virus.

Eine einheitliche Mutation, die nachweisbar an der Pathogenese von FCH beteiligt ist, konnte noch nicht nachgewiesen werden. Die bisher veröffentlichten und oben erwähnten Untersuchungen hierzu beschränkten sich auf Core Promotor und Precore/Core-Gen oder pre-S/S-Gen.

1.6 Fragestellung dieser Arbeit

Die fibrosierende cholestatische Hepatitis ist erst seit einigen Jahren als eigenes Krankheitsbild beschrieben. Ihre Pathogenese ist noch weitgehend unklar. Die histologisch nachweisbare hohe Menge an intrazellulären viralen Proteinen deutet jedoch darauf hin, daß - anders als bei der herkömmlichen Hepatitis B - bei immunsupprimierten Patienten ein direkter zytotoxischer Effekt des Virus eine wichtige Rolle spielen könnte. Inwiefern dies durch bestimmte Virusmutanten bedingt wird, die unter Immunsuppression selektioniert werden, ist bisher nicht bekannt.

In der vorliegenden Arbeit wurden daher HBV-Genome aus Seren, die zu verschiedenen Krankheitszeitpunkten aus an FCH erkrankten Patienten gewonnen wurden, isoliert und in ihrer vollen Länge sequenziert. Anhand der daraus erhobenen Daten sollte untersucht und diskutiert werden,

1. ob und wie sich die Virusgenome vor und nach LTX unterscheiden
2. ob spezifische Mutationen in bestimmten Genomregionen mit einer FCH assoziiert sind
3. welche funktionellen Veränderungen im Hinblick auf Virusreplikation und Antigen-Akkumulation durch die festgestellten Mutationen ausgelöst werden könnten.

2 Material und Methoden

2.1 Patienten

Serumproben dreier Patienten (Pat. #1-3) wurden untersucht, die sich wegen dekompensierter Leberzirrhose bei chronischer Hepatitis B zwischen September 1991 und November 1993 am California Pacific Medical Center, San Francisco, USA einer Lebertransplantation (LTX) unterzogen. Trotz Hepatitis B Hyperimmunglobulin (HBIG)-Behandlung nach Transplantation erlitten sie innerhalb von einem bzw. sechs Monaten eine HBV-Reinfektion, definiert durch das Wiederauftreten von HBsAg im Serum. In der Folgezeit entwickelten sie typische klinische, serologische und histopathologische Merkmale einer fibrosierenden cholestatischen Hepatitis (FCH), an der sie schließlich verstarben.

Die untersuchten Serumproben wurden jeweils vor LTX und nach Diagnosestellung einer FCH gewonnen. Die klinischen und serologischen Daten sind in Tab. 1 aufgeführt. Alle Patienten wurden negativ auf eine Hepatitis C- und Hepatitis Delta-Koinfektion getestet.

	#1		#2		#3	
Geschlecht, Alter	W, 40 J.		M, 44 J.		M, 45 J.	
Reinfektion (Mon. n. LTX)	1		1		6	
<u>LTX</u>	<u>prä</u>	<u>post</u>	<u>prä</u>	<u>post</u>	<u>prä</u>	<u>post</u>
Bilirubin (mg/dl)	nv	21	nv	26	nv	18
HBV-DNA (pg/ml)	161	1568	59,3	26,4-100	nv	<5
HBsAg	+	+	+	+	+	+
HBeAg	+	nv	+	+	-	nv

Tabelle 1: Klinische und serologische Patientendaten der Patienten #1-3, jeweils vor und nach LTX. LTX: Lebertransplantation, W: weiblich, M: männlich, prä: vor LTX, post: nach LTX, +/-: positiver/negativer Nachweis, nv: nicht verfügbar.

Histopathologisch zeigte sich bei Pat. #1 6,5 Mon. nach Lebertransplantation (LTX) eine Hepatitis B-Reinfektion mit diffus positiven Antigen-Färbungen für HBs- und HBcAg. Bei

Pat. #2 wurde fünf Wochen nach LTX eine minimale Infiltration der Periportalfelder mit Entzündungszellen neben einem deutlichen Nachweis von HBs- und HBcAg im Zytoplasma sowie HBcAg nukleär beschrieben, nach 8,5 Monaten hatte sich eine ausgeprägte portale Fibrose ausgebildet. Die Leberbiopsie aus Pat. #3 zeigte neun Monate nach LTX ein geringes Entzündungsinfiltrat, einen milchglasartigen Aspekt der Hepatozyten sowie eine starke Cholestase. Der immunhistochemische Nachweis für HBcAg und HBsAg im Zytoplasma war deutlich positiv. Nach 21 Monaten hatte sich ausgeprägtes fibröses Gewebe gebildet.

2.2 HBV-DNA-Isolierung aus den Patientenseren (= Serumextraktion)

Es wurden jeweils 100 µl Serum mit 20 mM Tris/HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA, 0,1% SDS und 1 mg/ml Proteinase K in einem Gesamtvolumen von 200 µl bei 60°C für 4 h inkubiert. Darauf folgte eine Phenol-Extraktion mit einer Volumeneinheit Phenol und Zentrifugation mit 14.000 rpm für 8 min bei Raumtemperatur. Der Überstand wurde abgehoben und auf Eis gebracht. Die folgende Chloroform-Extraktion geschah mit einer Volumeneinheit Chloroform und Zentrifugation mit 14.000 rpm für 8 min. Hiernach wurde der Überstand in 150 mM NaCl mit 2,5 Volumeneinheiten Ethanol (75%) und 10 µg tRNA als Träger über Nacht bei -20°C präzipitiert. Am nächsten Tag folgte eine Zentrifugation mit 14.000 rpm über 40 min bei 4°C. Der Überstand wurde abgehoben und das erhaltene Präzipitat mit 1 ml Ethanol (75%) gewaschen. Nach 8 min Zentrifugation bei 14.000 rpm wurde der Alkohol vollständig abgehoben, das DNA-Präzipitat kurz an der Luft getrocknet und dann in 20 µl sterilem H₂O aufgelöst. Bis zur weiteren Verwendung wurde die so erhaltene DNA bei -20°C gelagert.

2.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

2.3.1 Gesamt-Genom-PCR

Die Gesamt-Genom-PCR wurde durchgeführt zur Amplifikation der HBV-DNA aus der Serumextraktion zur anschließenden Direkt-Sequenzierung und für spätere Zellkultur-Experimente.

Die beiden DNA-Stränge des Hepatitis B Virus sind nicht geschlossen zirkulär, sondern weisen eine Diskontinuität, die sogenannte nick-Region auf, durch die die Amplifikations-Effizienz einer PCR negativ beeinflusst wird. Zur Amplifikation des gesamten HBV-Genoms in einem Stück wurde in dieser Arbeit die 1995 von Günther et al. beschriebene Methode angewandt, bei der die Primer für Plus- und Minus-Strang in dieser nick-Region plaziert sind (P1, 1820-1841: CTTTTTCACCTCTGCCTAATCA; P2, 1823-1805: AAAAGTTGCATGGTGCTGG, siehe Abb. 2). Dadurch findet keine Extension über diese Diskontinuität hinaus statt, was die Amplifikations-Effizienz der PCR erheblich steigert. Weiterer Vorteil dieser Region ist ihr hoher Konservierungsgrad, was Mutationen an der Primer-Bindungsstelle unwahrscheinlich macht.

Die Methode wurde mit dem Expand™ High Fidelity PCR System (Boehringer Mannheim) durchgeführt, das eine hohe Amplifikationsrate bei sehr niedriger Lesefehlerrate ($8,5 \times 10^{-6}$) aufweist. Dies wird erreicht durch ein Gemisch von DNA-Polymerasen aus *Thermus aquaticus* (Taq) mit sehr guten Amplifikationseigenschaften und *Pyrococcus woesei* (Pwo) mit zusätzlicher Lesefehlerkorrektur ("proof-reading-Aktivität"). Es wurden zwei Gemische angesetzt. Das erste enthielt aus 5 µl Serum isolierte HBV-DNA, 200µM dNTP (Boehringer Mannheim, Mannheim), je 0,3 µM Primer P1 und P2, 4,5 µl des mit der Polymerase mitgelieferten Puffersystems und steriles H₂O ad 45 µl. Dieses Gemisch wurde mit (60 µl) Mineralöl überschichtet, um Verdunstungen zu verhindern, und gemäß einer "hot start" PCR auf 80°C erhitzt. Dann wurde das zweite Gemisch bestehend aus 2,6 U Taq-Pwo-DNA Polymerase Mix und 0,5 µl Puffer in einem Volumen von 5 µl dazugegeben. Die Reaktion wurde in einem programmierbaren RoboCycler (Stratagene, La Jolla, USA) nach folgendem Schema mit 40 Zyklen durchgeführt: Denaturierung bei 94°C für 40 sec, Primer-"Annealing" (-Anlagerung) bei 60°C für 1:30 min und Elongation bei 68°C für anfangs 3 min und einer 2 min-Verlängerung alle 10 Zyklen.

Kinetik der Gesamt-Genom-PCR

In der Gesamt-Genom-PCR entstanden teilweise außer der erwarteten 3,2 kB-Bande auch kleinere Fragmente, die durch die exponentielle Vervielfältigung im Rahmen der PCR überproportional vermehrt werden. Diese stören die Auswertung der Direktsequenz (Kap. 2.7) durch Überlagerungen. Mit dem Ziel, das zeitliche Auftreten der jeweiligen Fragmente während der Reaktion zu bestimmen, wurde die Kinetik der PCR untersucht.

Hierzu wurde das gleiche Protokoll wie für die Gesamt-Genom-PCR verwendet, aber ab dem 15. Zyklus wurden jeweils alle 5 Zyklen dem Reaktionsansatz je 5 µl entnommen, die dann nach abgeschlossener Reaktion nebeneinander auf Agarosegel aufgetragen und in ihrer Bandenintensität verglichen wurden.

2.3.2 Subgenomische PCR

Durch die subgenomische PCR wurde neben der Gesamt-Genom-PCR eine zweite, von dieser unabhängige Matrize erzeugt. Durch deren Sequenzierung ließ sich ausschließen, daß in den untersuchten HBV-Genomen Mutationen im Bindungsbereich der Primer P1 und P2 der Gesamt-Genom-PCR (Abb. 2) vorliegen. Diese hätten eine selektive Amplifikation einer nicht repräsentativen Subpopulation nicht-mutierter Genome in der Gesamt-Genom-PCR zur Folge gehabt.

Die Reaktion wurde nach dem gleichen Protokoll wie die Gesamt-Genom-PCR durchgeführt, allerdings mit den Primern P3 und P4 (siehe Abb. 2), wodurch ein DNA-Fragment von knapp 2,1 kB entstand.

2.3.3 Fragment-PCR

Durch Gelelektrophorese lassen sich unterschiedlich große DNA-Fragmente auftrennen (siehe Kap. 2.4). Diese Methode hat jedoch abhängig vom Verhältnis zwischen Gesamtgröße und Größenunterschied der zu trennenden Fragmente ihre Nachweisgrenze. So entgeht eine nur wenige Dutzend Basen lange Differenz in einem HBV-Gesamtgenom von 3200 Basen üblicherweise dem elektrophoretischen Nachweis. Da bei einer Serumprobe der Verdacht auf eine verhältnismäßig kurze Deletion im pre-S-Bereich in einem Teil der Genome vorlag und mittels elektrophoretischer Auftrennung verschieden langer PCR-Fragmente erhärtet werden sollte, wurde diese PCR mit den Primern P5 und P6 (siehe Abb. 2) durchgeführt, wodurch ein Fragment von ca. 250 bp entstand.

2.3.4 Maßnahmen zur Vermeidung von Kontaminationen

Die Serumaufarbeitung, die Vorbereitung der PCR und deren Durchführung erfolgte zur Vermeidung von Kontaminationen in separaten Räumen. Es wurden sterile Lösungen,

2.4 Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von Nukleinsäuren wurden Elektrophoresen mit Gelen durchgeführt, die 1-2 % Agarose gelöst in 1x TAE-Puffer enthielten. Der Laufpuffer war ebenfalls 1x TAE. Die an die Gelkammer angelegte Spannung betrug 3-5 V/cm Elektrodenabstand. Es wurden die zu untersuchenden Proben (PCR-Produkte etc.) zusammen mit Auftragspuffer auf das Gel gebracht. Nach dem Lauf wurde das Gel für 5-15 min in einer Ethidiumbromidlösung (1,0µg/ml) gefärbt, unter UV-Licht fotografiert und ausgewertet. Der neben den Proben aufgetragene DNA-Längenstandard III (Boehringer Mannheim, Mannheim) erlaubte die Längenbeurteilung der aufgetrennten Fragmente.

Um Fragmente mit einer nur geringen Größendifferenz aus der Fragment-PCR (siehe 2.3.3) gelelektrophoretisch durch Separation nachzuweisen, wurde ein ca. 30 cm langes 2,5 %-iges Agarosegel über 4 h bei 140 V gefahren.

2.5 Aufreinigung und Direkt-Sequenzierung der PCR-Produkte

Um die PCR-Produkte von überschüssigen Primern, Nukleotiden und Polymerase zu trennen, wurden sie mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) durch Adsorption und Präzipitation an einer Silica-Matrix nach den Empfehlungen des Herstellers aufgereinigt. Die gereinigte DNA wurde in 50 µl H₂O aufgenommen und bei -20°C gelagert.

Die Sequenzierung der aufgereinigten PCR-Produkte erfolgte nach dem Prinzip der Ketten-Abbruch-Methode nach Sanger et al. 1977. In vier verschiedene Reaktionsansätze, die DNA-Matrize, markierte Primer und Polymerase enthalten, wird neben den vier normalen dNTPs jeweils ein 2',3'-Dideoxynukleosid-5'-triphosphat (ddNTP) in einer bestimmten Konzentration gegeben, welches dann bei Einbau in die entstehende Kette zu deren Abbruch führt. Die hierdurch entstehenden, unterschiedlich langen Fragmente der vier Reaktionsansätze werden dann nebeneinander elektrophoretisch aufgetrennt, was eine ineinander geschachtelte Fragmentreihe ergibt, die mit Hilfe der markierten Primer detektiert wird.

Für die Reaktion wurde das Sequi Therm Long Read™ DNA Sequencing Kit-LC (Epicentre Technologies, Madison, USA) entsprechend den Hersteller-Angaben verwendet.

Für den Master-Mix wurden 0.25 pM DNA und 2 pM Primer eingesetzt. In 96-well-Platten (Costar, Cambridge, USA) wurden auf Eis je 2 µl vier verschiedener Terminationsmische vorgelegt, die jeweils eines der ddNTPs enthielten. Dazu wurden dann je 4 µl Master-Mix gegeben und mit Mineralöl (30 µl) überschichtet. Die Reaktion wurde in einem MWG-Thermocycler (MWG-Biotech, Ebersberg) nach folgendem Schema durchgeführt: initial 94°C für 4 min, dann jeweils 95°C für 30 sec, 55°C für 1 min und 70°C für 1 min über 30 Zyklen. Nach abgeschlossener Reaktion wurden zu allen Ansätzen je 4 µl Stop-Lösung gegeben. Bis zum Gelauftrag wurden sie dann bei -20°C aufbewahrt.

Bei dem Sequenzgel handelte es sich um ein 5 %-iges Acrylamidgel, das in einer Dicke von 0,25 mm zwischen zwei Glasplatten gegossen wurde. Es wurde die vorgefertigte Lösung Sequagel XR (National Diagnostics, Atlanta, USA) in Verbindung mit 7 M Harnstoff, TEMED und 0,08 % Ammoniumpersulfat nach Hersteller-Empfehlungen verwendet. Als Laufpuffer diente 1x TBE-Puffer. Bevor je 2 µl der Reaktionsansätze nebeneinander auf das Gel aufgetragen wurden, wurden sie bei 85°C für 2:30 min denaturiert, um das Vorliegen von Einzelsträngen zu gewährleisten.

Der Gellauf wurde in einem DNA Sequencer 4000L der Firma Li-Cor (Lincoln, USA) durchgeführt, der über einen Fluoreszenz-detektierenden Laser verfügt. Die Primer, die verwendet wurden, waren mit dem Infrarot-Farbstoff IRD 41 (MWG-Biotech, Ebersberg) markiert, der vom Laser detektiert wird.

Um das gesamte HBV-Genom - jeweils die volle Länge von Plus- und Minus-Strang - zu sequenzieren, wurden insgesamt elf verschiedene Primer verwendet (siehe Abb. 2).

Zwischenzeitlich wurden drei verschiedene Sequenzier-Kits getestet und verglichen, das oben erwähnte Sequi Therm Long Read™ DNA Sequencing Kit-LC (Epicentre Technologies, Madison, USA), dessen Weiterentwicklung Sequi Therm EXCEL™ vom gleichen Hersteller und das Thermo Sequenase Fluorescent Labelled Primer Cycle Sequencing Kit (Amersham, Buckinghamshire, England). Die Reaktionen wurden nach den jeweiligen Hersteller-Empfehlungen mit den gleichen DNA-Proben und Primern durchgeführt und auf das gleiche Sequenzgel aufgetragen. Das beste Ergebnis mit den klarsten Banden, dem geringsten Hintergrundsignal und der größten Leseweite erzielte hierbei das Sequi Therm EXCEL™-Kit, welches fortan für alle weiteren Sequenzierungen verwendet wurde.

2.6 Auswertung der Sequenzdaten

Simultan zum Gellauf wurden die vom Infrarot-Laser aufgefangenen Signale von einem Personal Computer (OS/2-Betriebssystem) mit Hilfe der BaseImagIR™-Software (Li-Cor) aufgezeichnet und nach dem Lauf anhand des aufgezeichneten Bildes die Sequenz bestimmt. Der Vergleich verschiedener Sequenzen und deren Zusammensetzen zu einem kompletten Genom geschah mit dem Mac Vector™/AssemblyLIGN™-Software-Programm (International Biotechnologies, New Haven, USA) an einem Macintosh Computer (Apple Computer, Cupertino, USA).

Im Serum HBV-infizierter Personen findet man natürlicherweise eine heterogene, d.h. uneinheitliche Virus-Population durch ständig stattfindende Mutationen. Wird diese durch PCR amplifiziert und dann direkt sequenziert, ergeben sich auch bei der Bildauswertung der Direktsequenz heterogene Positionen, d.h. an einer Position findet sich ein Gemisch aus verschiedenen Nukleotiden. Die dabei am Bildschirm erkennbaren Banden wurden ab einer Signalintensität von ca. 25% des Hauptbanden-Signals gewertet. Solche Positionen werden im folgenden als "Heterogenitäten" oder auch "inkomplette Nukleotidaustausche/Mutationen" bezeichnet, letzteres unter der Vorstellung, daß eine Mutation erst in einem Teil der Gesamtpopulation stattgefunden hat.

Sequenzvergleich und Genotypisierung

Die erhaltenen Sequenzen wurden mit 40 bisher publizierten kompletten HBV-Genomen aus der GenBank des National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, USA) verglichen, die als Referenzgenome dienten. Bisher unbeschriebene Nukleotidaustausche wurden als Neu-Mutationen gewertet, maximal zweimal beschriebene als seltene Mutationen.

Durch den Sequenz-Vergleich mit den vorbeschriebenen Genomen unter Einbeziehung Genotyp-spezifischer Merkmale wurde der jeweilige Genotyp bestimmt (siehe auch Kap. 1.3, Okamoto et al. 1988, Norder et al. 1992). So ist der Genotyp A durch eine 6 Nukleotid-Insertion an der Position 2354-2359 gekennzeichnet (Li et al. 1993), Genotyp D durch eine Deletion von 33 Nukleotiden in der pre-S1-Region (Okamoto et al. 1988), weitere Genotypen durch charakteristische Punktmutationen.

2.7 Aufreinigung der PCR-Produkte für die Klonierung und DNA-Restriktion

Da im Rahmen der Klonierung die HBV-Genome über die Schnittstelle der Restriktionsendonuklease Sst I in den Vektor pUC 19 ligiert werden sollten, das HBV aber keine entsprechende Schnittstelle besitzt, wurde eine Gesamt-Genom-PCR mit abgewandelten Primern P1 und P2 (Abb. 2) durchgeführt, die eine entsprechende Schnittstelle hatten.

50 µl PCR-Produkt aus dieser Gesamt-Genom-PCR wurden mit einer Volumeneinheit TE-Puffer und zwei Volumeneinheiten Phenol/Chloroform gemischt (Vortex) und für 3 min mit 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 10 µl NaAc (pH 5,2), 2 µl tRNA und 250 µl Ethanol (100%) für 2 h bei -70°C inkubiert und danach für 25 min mit 13.000 rpm bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das entstandene Präzipitat mit Ethanol (75%) gewaschen, luftgetrocknet und in 20 µl sterilem H₂O resuspendiert.

Die gereinigten PCR-Produkte wurden nun mit der Restriktionsendonuklease Sst I (Gibco BRL, Life Technologies, Gaithersburg, USA) im Puffer des Herstellers bei 37°C für 6-7 h inkubiert. Danach wurde zur Kontrolle der Restriktion eine Elektrophorese mit 1 µl der Reaktion durchgeführt.

2.8 Gel-Extraktion der PCR-Produkte

Für die nachfolgende Klonierung von kompletten HBV-Genomen mußten diese 3,2 kB-Fragmente von kleineren, die ebenfalls bei der Gesamt-Genom-PCR entstanden (siehe Kap. 2.3), getrennt werden.

Hierzu wurden die enzymatisch geschnittenen PCR-Produkte auf ein 1%-iges Agarosegel aufgetragen, jeweils an den Rändern ergänzt durch eine Spur Wildtyp-HBV-DNA. Nach ausreichender Laufweite wurden diese Kontrollspuren mechanisch abgeschnitten, mit Ethidiumbromid gefärbt und unter UV-Licht die 3,2 kB-Bande markiert. Dann wurden die Ränder wieder an das restliche Gel gesetzt und aus jeder Spur auf Höhe der 3,2 kB-Markierung das Gel mit einem Skalpell herausgeschnitten. So konnte der schädigende Einfluß von Ethidiumbromid und UV-Licht auf die zu isolierende DNA vermieden werden. Nachträglich wurde durch Färbung kontrolliert, ob das Gel auf der richtigen Höhe herausgeschnitten worden war. Die DNA wurde dann aus dem herausgeschnittenen Gel mit

dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) nach dem Protokoll des Herstellers isoliert.

2.9 Präparation des Vektors und Ligation

Der Vektor pUC 19 (Biolabs, Beverly, USA) wurde der gleichen Restriktion wie die obigen PCR-Produkte unterzogen mit nachfolgender Kontroll-Elektrophorese. Es folgte eine Präzipitation mit drei Volumeneinheiten TE-Puffer und vier Volumeneinheiten Phenol/Chloroform und ansonsten den unter 2.7 beschriebenen Schritten. Um eine Re-Ligation des Vektors zu verhindern, wurde eine Dephosphorylierung der 5'-Phosphatgruppen mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (CIP, Boehringer Mannheim) (1 U/ μ g) durchgeführt. Nach 1 h Inkubation bei 37°C wurde das Enzym bei 65°C inaktiviert und durch eine weitere Phenol/Chloroform-Präzipitation entfernt.

Für die Ligation von PCR-Produkt und Vektor wurden gleiche molare Mengen eingesetzt. Diese wurden für 5 min bei 45°C erhitzt, bevor sie mit T4 DNA Ligase (Biolabs, Beverly, USA) (10 U/ μ g) im mitgelieferten Puffersystem bei 14°C für 20 h inkubiert wurden.

2.10 Herstellung kompetenter Escherichia coli

Hier wurde die Methode nach Hanahan (1983) mit Modifikationen durchgeführt. LB-Medium wurde mit einer frischen Übernachtskultur eines DH5 α E.coli-Stammes 1:100 beimpft und in einem Schüttler mit 200 rpm bei 37°C bis zu einer OD₅₅₀ von 0,45-0,55 bebrütet. Nach Abkühlen auf Eis wurden die Bakterien bei 4°C mit 3000 rpm abzentrifugiert, in 0,5 Ausgangsvolumen Lösung 1 resuspendiert und 1 h auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation und Resuspension in 0,05 Ausgangsvolumen Lösung 2 wurden Aliquots von 200 μ l angelegt, die entweder gleich verwendet oder mit Trockeneis und Ethanol schockgefroren und bei -70°C gelagert wurden.

2.11 Transformation

Jeweils 200 μ l kompetente Zellen wurden mit variierenden Mengen Ligationsprodukt 1 h lang auf Eis inkubiert. Nach einem Wärmeschock von 42°C für 90 sec und 2 min Abkühlung auf Eis wurde 1 ml LB-Medium zugegeben und 1 h bei 37°C inkubiert. Nach kurzer Zentrifugation mit 3000 rpm wurden 800 μ l Überstand verworfen, der Transformationsansatz im Rest resuspendiert und auf Agar-Platten ausplattiert.

Diese wurden über Nacht bei 37°C bebrütet. Die Selektion von erfolgreich transformierten Bakterienkolonien wurde durch die Zugabe von Ampicillin gewährleistet, Kolonien mit rekombinierten Plasmiden wurden durch α -Komplementation (Ullmann et al. 1967) sichtbar gemacht.

2.12 Cracking

Diese Methode diente dem schnellen Nachweis eines Plasmids in einer Bakterienkolonie und dessen Größenbestimmung (mit oder ohne HBV-"Insert"). Hierfür wurde eine von der Agarplatte gewonnene Kolonie in 2 ml LB-Medium mit Ampicillin bei 37°C über Nacht inkubiert. Von dieser Kultur wurden 250 μ l entnommen und für 30 sec bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Bakterien in 100 μ l Cracking-Puffer resuspendiert und für ca. 5 min stark geschüttelt (Vortex). Darauf wurde für 20 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und 20 μ l des Überstandes mittels Gelelektrophorese untersucht. Von Kolonien mit einem Insert wurde 1 ml der Übernachtskultur mit 0,5 ml Glycerin bei -70°C aufbewahrt. Auf diese Stammpräparation wurde dann jeweils für die Gesamt-Genom-PCR (siehe 2.3.) zum DNA-Nachweis und Plasmid Mini-Präparation zurückgegriffen.

2.13 Plasmid Mini-Präparation

Zur Isolierung von Vektor-DNA mit Insert aus E.coli wurden 15 ml LB-Medium mit 50 μ l der Glycerin-Stammpräparation beimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Für die Präparation wurde mit dem Qiagen Plasmid Mini Kit (Qiagen, Hilden) eine Anionenaustausch-Chromatographie nach den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt.

2.14 Puffer und Lösungen

1x TAE-Puffer

pH	8,0
Tris	0,8 M
Na-Acetat	0,4 M
EDTA III	0,04 M

1x TBE-Puffer

pH	8,0
Tris	89 mM
Borsäure	89 mM
EDTA	2,5 mM

TE-Puffer

Tris/Cl pH 8,0	10 mM
EDTA	1 mM

Cracking-Puffer

Tris/HCl pH 6,8	50 mM
SDS	1 %
EDTA	2 mM
Sucrose	400 mM
Bromphenolblau	0,01 %
Xylencyanol FF	0,01 %
Orange G	0,01 %
RNAse A	100 µg/ml

Auftragspuffer für Gelelektrophorese

Orange G	2 mg/ml
Xylencyanol FF	2 mg/ml
Bromphenolblau	1 mg/ml
Glycerin	80 %

Lösung 1 (für kompetente E.coli)

CaCl ₂	100 mM
MnCl ₂	70 mM
Na-Acetat pH 5,5	40 mM

Lösung 2

CaCl ₂	100 mM
MnCl ₂	70 mM
Na-Acetat	40 mM
Glycerin	15 %

LB-Medium

Hefe-Extrakt	5 g/l
Bactotripton	10 g/l
NaCl	8 g/l
pH	7,0-7,5

Agarplatten

LB-Medium	
Agar	15 g/l
Ampicillin	100 µg/ml
X-Gal	50 µg/ml
IPTG	50 µg/ml

3 Ergebnisse

3.1 Proben-Amplifikation

Zur effizienten Amplifikation des gesamten HBV-Genoms in einem Stück wurde die Gesamt-Genom-PCR nach Günther et al. (1995) angewendet (s. Kap. 2.3.1). Desweiteren wurde die subgenomische PCR durchgeführt, um eine zweite, unabhängige Matrize für die Direkt-Sequenzierung zu erzeugen und Mutationen im Bindungsbereich der Gesamt-Genom-Primer auszuschließen (s. Kap. 2.3.2).

Es konnte in allen sechs untersuchten Patientenseren durch PCR HBV-DNA in den Serumextrakten nachgewiesen und gleichzeitig in ausreichenden Mengen für die direkte Sequenzierung amplifiziert werden.

In der Gesamt-Genom-PCR entstanden teilweise außer der erwarteten 3,2 kB-Bande auch kleinere Fragmente von ca. 2,0 und 2,8 kB, am stärksten bei Patient #1, mit mittlerer Ausprägung bei Patient #2 und am wenigsten bei Patient #3. In der Abbildung 3 werden die gelelektrophoretisch aufgetrennten PCR-Fragmente gezeigt.

Durch die exponentielle Vervielfältigung im Rahmen der PCR kommt es bei steigender Zykluszahl der Reaktion zu einer letztendlich disproportionalen Vermehrung dieser eigentlich in der Minderzahl vorkommenden Fragmente. Da diese die Auswertung der Direktsequenz durch Überlagerungen stören, wurde im folgenden versucht, deren Auftreten bei Patient #1 und #2 zu reduzieren.

Hierzu wurde die in Kap. 2.3.1 beschriebene PCR-Kinetik durchgeführt, um das zeitliche Auftreten der jeweiligen Fragmente während der Reaktion zu bestimmen. Hier wurde festgestellt, daß in allen Fällen nach 25-30 Reaktionszyklen als erstes die 3,2 kB-Bande im Agarosegel sichtbar wurde, nach 30 bzw. 35 Zyklen dann kleinere Fragmente (Abb. 4).

Für jede Probe wurde die Zykluszahl bestimmt, die zu einer ausreichend intensiven 3,2 kB-Bande bei möglichst geringem Auftreten kleinerer Fragmente führt: 35 Zyklen bei Pat. #1 vor LTX u. während FCH sowie bei Pat. #2 vor LTX, 30 Zyklen bei #2 unter FCH. Die Gesamt-Genom-PCR zur Erzeugung von Sequenzier-Matrizen wurde dann mit den so bestimmten Zykluszahlen durchgeführt. Diese erzielte letztendlich ausreichend "saubere" Matrizen für die Direktsequenzierung.

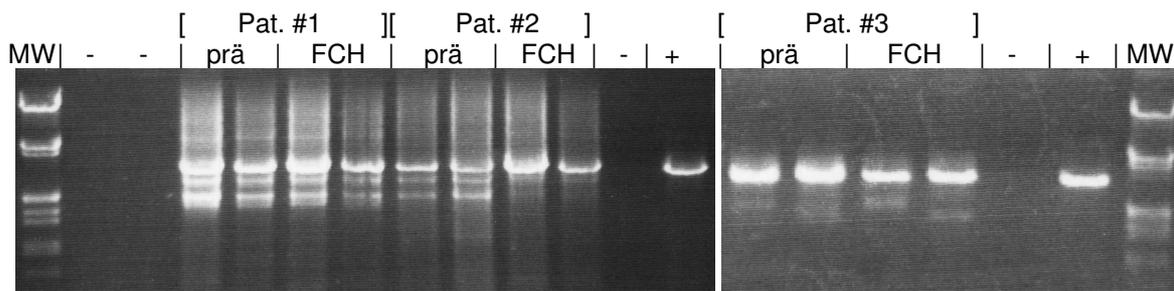


Abbildung 3: Gesamt-Genom-PCR, elektrophoretische Fragment-Auftrennung auf zwei Agarosegelen aus Serumproben der drei Patienten vor LTX (prä) und während FCH (je zwei Banden). Unterhalb der 3,2 kB-Bande, die auf gleicher Höhe mit der Positiv-Kontrolle liegt, werden z.T. kleinere Fragmente von ca. 2,0 und 2,8 kB deutlich. MW: DNA-Längenstandard (molecular weight marker), -/+ : Negativ-/Positiv-Kontrolle.

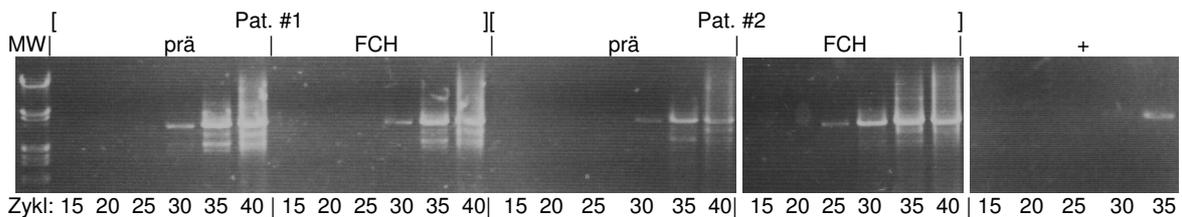


Abbildung 4: Kinetik der Gesamt-Genom-PCR. Elektrophoretische Fragment-Auftrennung auf drei Agarosegelen, Probenentnahmen nach aufsteigender Reaktionszykluszahl (Zykl.).

Bei der subgenomischen PCR traten nur die erwarteten Banden auf.

Zusammenfassend ließ sich aus allen Serumextrakten mittels PCR HBV-DNA nachweisen und amplifizieren. Dabei traten teilweise neben der erwarteten 3,2 kB- auch kleinere Fragmente auf.

3.2 Direkt-Sequenzierung

Die Sequenzierung der aufgereinigten PCR-Produkte erfolgte nach der Ketten-Abbruch-Methode, die Signaldetektion der elektrophoretisch aufgetrennten Fragmente mittels Infrarot-markierter Primer. Bei der Bildauswertung festgestellte Mischpopulationen an einer Nukleotidposition (s.a. Kap. 2.6) werden als "Heterogenitäten" oder auch "inkomplette Nukleotidaustausche/Mutationen" bezeichnet.

3.2.1 HBV-Sequenzunterschiede zwischen LTX und FCH-Auftreten

Ein Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, ob und welche Sequenzunterschiede zwischen der HBV-Population zum Zeitpunkt der chronischen Infektion vor Lebertransplantation und der fibrosierenden cholestatischen Hepatitis bestehen.

3.2.1.1 Mutationen auf Nukleotid-Ebene

Patient #1

Bei Patient #1 fanden 23 Mutationen (2 komplett, 21 inkomplett) innerhalb von 8,5 Monaten statt (Tab. 2). Dies bedeutet eine Sequenz-Homologie des Virus zu beiden Zeitpunkten von 99,3% und entspräche einer Mutationsrate von 2,8 Nukleotidsubstitutionen pro Jahr, gerechnet an den kompletten Austausch und vorausgesetzt, daß diese sich kontinuierlich im beobachteten Zeitraum von 8,5 Mon. entwickelten. Diese ist 28mal höher als die in der Literatur (Okamoto 1987 und Orito 1989) beschriebenen Hochrechnungen für das Hepatitis B Virus von ca. 0,1 Nukleotidsubstitutionen pro Genom und Jahr.

Die Austausche waren über das ganze Genom verteilt, eine Häufung fand sich im C-terminalen Abschnitt des C-Gens. Es wurde je eine Mutation im Enhancer I (ENH I) (Pos.1167) und α -box/ Enhancer II (ENH II) (Pos. 1653) sowie zwei im S-Promotor II (SP II) (Pos. 3026, 3162) gefunden. Durch eine inkomplette Mutation im C-terminalen Teil des S-Gens (Pos. 700 G→A/G) entstand in einer Virus-Teilpopulation ein Stopkodon (TGA).

11 der 23 Mutationen stellten sich im Vergleich mit den aus der GenBank des National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, USA) verwendeten 40 Referenzgenomen als neue (6) oder nur selten beschriebene (5) Mutationen heraus (Pos. 387, 585, 700, 1167, 2101, 2201, 2213, 2304, 2351, 2353, 2898). Unter diesen sind auch die beiden Komplettaustausche (Pos. 2201 C→T u. 2304 C→A) (s. a. Kap. 3.2.2.3).

Patient #2

Die aus Patient #2 isolierten HBV-Genome zeigten innerhalb von 12 Monaten 13 Mutationen (2 komplett, 11 inkomplett) (Tab. 2), was einer Homologie von 99,6%, andererseits 2 Nukleotidsubstitutionen/Jahr entspricht. Auch diese verteilten sich über das

ganze Genom, mit einem Schwerpunkt im S-Gen. Je eine Mutation fand im ENH II (Pos. 1727) und im SP II (Pos.3189) statt. Die beiden Komplettaustausche waren an Pos. 519 (A→G) und 636 (T→A). Fünf der 13 Mutationen waren zuvor noch nicht beschrieben worden (Pos. 15, 126, 273, 531, 2973).

#1

Pos.	prä-LTX	FCH	Referenz	Struktur
213	C/T	T	T	
387	G	A/G	G	
531	C/T	T	T	
585	A	A/T	A	
616	A/G	A	A	
700	G	A/G	G	
816	A/G	G	G	
895	A	A/T	T	
1167	A/C	A	A	ENH I
1653	C/T	C	C	ENH II, α -box
1979	A	A/G	A	
2088	G	G/T	G	
2101	C/T	T	T	
2201	C	T	C	
2213	A/G	A	A	
2304	C	A	C	
2335	G	A/G	A	
2351	T	C/T	C	
2353	C	A/C	A	
2357	G	G/T	G	
2898	T	G/T	T	
3026	T	C/T	C	SP
3162	C	C/T	T	II

#2

Pos.	prä-LTX	FCH	Referenz	Struktur
15	A/G	A	A	
115	C	A/C	C	
126	A/C	C	C	
273	A/G	G	A	
519	A	G	A	
531	C	C/G	C	
636	T	A	A	
784	T	G/T	T	
1390	A	A/G	A	
1727	A	A/G	G	ENH II
2088	G	G/T	G	
2973	T	C/T	T	
3189	A	A/G	A	SP II

#3

Pos.	prä-LTX	FCH	Referenz	Struktur
287	T	G/T	T	
554	C/T	C	T	
720	C/T	T	C	
765	G	A	G	
1484	A/C	A	C	
2916	T	G/T	T	

Tabelle 2: Nukleotid-Austausche der HBV-Populationen der chronischen Hepatitis B (prä-LTX) im Vergleich zum Zeitpunkt der FCH nach LTX bei Pat. #1-3. Pos.: Nukleotidposition, prä-LTX: Nukleotid vor LTX, FCH: Nukleotid in Phase der FCH, Referenz: Nukleotid im Referenzgenom, Struktur: funktionell wichtige Struktur (schraffierte Flächen). Fettdruck: komplette Mutation.

Patient #3

Die Virus-Genome aus Patient #3 zeigten bei sechs Mutationen (1 komplett, 5 inkomplett) (Tab. 2) in 21 Monaten mit 99,8% die größte Homologie. Rechnerisch ergibt sich eine Mutationsrate von 0,6 Nukleotidsubstitutionen/Jahr. Die Veränderungen entstanden auch hier hauptsächlich im S-Gen. Die komplette Mutation entwickelte sich an Pos. 765 (G→A). 3 der 6 Austausche waren Neu-Mutationen (Pos. 554, 720, 2916).

Zusammenfassend fanden sich bei den drei Patienten insgesamt 42 Nukleotidaustausche, von denen 5 komplett und 37 nur inkomplett waren. Diese Veränderungen fanden gleichermaßen als Neumutation und als Rückmutation zum Wildtyp statt (Referenzgenome siehe unten). Sie waren über das gesamte Genom verstreut, mit Mutationsschwerpunkten im jeweiligen C-terminalen Bereich von S- und C-Gen. Bezogen auf Promotor-/ Enhancer-Bereiche wurden je zwei Mutationen in ENH II und SP II sowie eine im ENH I gefunden. Es konnte kein gemeinsamer Austausch bei allen drei Patienten gefunden werden. Nur an Pos. 2088 im C-Gen entwickelte sich bei den Patienten #1 und #2 gleichermaßen ein inkompletter Nukleotidaustausch G→G/T (Referenz: G). Auch an Pos. 531 veränderte sich bei beiden Patienten das HBV-Genom, jedoch bei Pat. #1 C/T→T und bei Pat. #2 C→C/G.

3.2.1.2 Aminosäuren-Austausche

Mit Hilfe der Mac Vector-Software wurde anhand der Nukleotidsequenz auch die Aminosäuren (AS)-Sequenz der HBV-Proteine ausgewertet.

Patient #1

Bei Patient #1 führten die 23 oben beschriebenen Nukleotidaustausche zu 21 vorhersagbaren AS-Austauschen, von denen 2 komplett und 19 inkomplett waren. Sie verteilten sich folgendermaßen auf die Genprodukte: 6 im C-Protein, 7 im präS/S-Protein, 7 im P-Protein und 1 im X-Protein (Tab. 3 u. Abb. 5).

Das in Kap. 3.2.1.1 schon erwähnte Stopkodon an Nukleotid-Pos. 700 führt vorhersagbar in einer HBV-Teilpopulation zum Zeitpunkt der FCH zu einem Translationsabbruch bei AS 182 des S-Gens, wodurch ein um 42 AS verkürztes S-Protein entsteht.

Zwei AS-Austausche (AS 126 u. 144) fielen in die a-Determinante (a-Det.), eine hochkonservierte Region im HBsAg, die das Ziel für Virus-neutralisierende Antikörper darstellt. Von den 6 AS-Austauschen im C-Protein waren zwei in Epitopen für cytotoxische T-Lymphozyten (CTL) (AS 27 u. 151), einer in einem Helfer T-Zell-Epitop (AS 63) und einer in einem B-Zell-Epitop (AS 135) lokalisiert, zwei (AS 151 u. 153) im "nuclear localization signal".

Patient #2

Bei Patient #2 führten die 13 Mutationen zu 15 AS-Austauschen, 3 davon komplett und 12 inkomplett. 7 AS-Wechsel fielen in das präS/S-Protein, 6 in das P-Protein und je einer in C- und X-Protein (Tab. 3 u. Abb. 5).

Zwei Austausche im S-Protein waren in der a-Det. lokalisiert (AS 122 u. 126), der Austausch der AS 128 im präS-Bereich in der Hepatozyten-Bindungsstelle ("hepatocyte attachment site"). Der AS-Wechsel im C-Protein (AS 63) lag in einem Helfer T-Zell-Epitop.

Patient #3

Bei Patient #3 kam es durch oben beschriebene 6 Nukleotid-Mutationen zu 8 AS-Austauschen, davon je 4 in P- und S-Protein, von denen einer komplett war (Tab. 3 u. Abb. 5). Ein AS-Wechsel im S-Protein fiel in die a-Det. (AS 134).

#1

Protein	AS-Pos.	prä-LTX	FCH	Referenz	Struktur
C	27	I	I/V	I	CTL-Epitop
	63	G	G/V	G	Helfer T-Epitop
	105	L/F	I	I	
	135	P	Q	P	B-Epitop
	151	C	R/C	R	CTL-Epitop/ nucl.
	153	G	G/C	G	loc. signal
preS	60	V	V/A	A	
S	20	F/S	F	F	
	78	R	Q/R	R	
	126	I/T	I	I	a-
	144	D	V/D	D	Det.
	182	W	Stop/W	W	
	221	C/Y	C	C	
P	10	R	K/R	K	
	16	A	D/A	D	
	17	E	D/E	E	
	281	V	G/V	V	
	509	I/V	I	I	
	537	V	I/V	V	
	602	S	C/S	S	
X	94	H/Y	H	H	

#2

Protein	AS-Pos.	prä-LTX	FCH	Referenz	Struktur
C	63	G	A/E	G	Helfer T-Epitop
preS	128	H/R	H	H	Hep. Attachm. Site
	165	Y/S	S	S	
S	40	N/S	S	N	
	122	K	R	K	a-
	126	T	T/S	T	Det.
	161	F	Y	Y	
	210	S	S/R	S	
P	223	S	S/P	S	
	295	K	K/E	K	
	344	L	L/I	L	
	482	D	D/E	D	
	567	S	S/A	S	
	769	T	T/A	T	
X	6	Y	Y/C	Y	

#3

Protein	AS-Pos.	prä-LTX	FCH	Referenz	Struktur
S	45	S	A/S	S	
	134	F/L	L	F	a-Det.
	189	I/T	I	T	
	204	S	N	S	
P	204	S	A/S	S	
	401	I	S/I	I	
	490	A/V	A	V	
	800	S/Y	Y	S	

Tabelle 3: Aminosäuren-Austausche der HBV-Populationen der chronischen Hepatitis B (prä-LTX) im Vergleich zum Zeitpunkt der FCH nach LTX bei Pat. #1-3. Protein: betroffenes HBV-Protein, AS-Pos.: Position der Aminosäure im jeweiligen Protein, prä-LTX: Aminosäure vor LTX, FCH: Aminosäure in Phase der FCH, Referenz: Aminosäure des Referenzproteins, Struktur: funktionell wichtige Struktur (schraffiert). Buchstabenkürzel der Aminosäuren nach Empfehlungen der IUPAC (1984) (International Union of pure and applied chemistry).

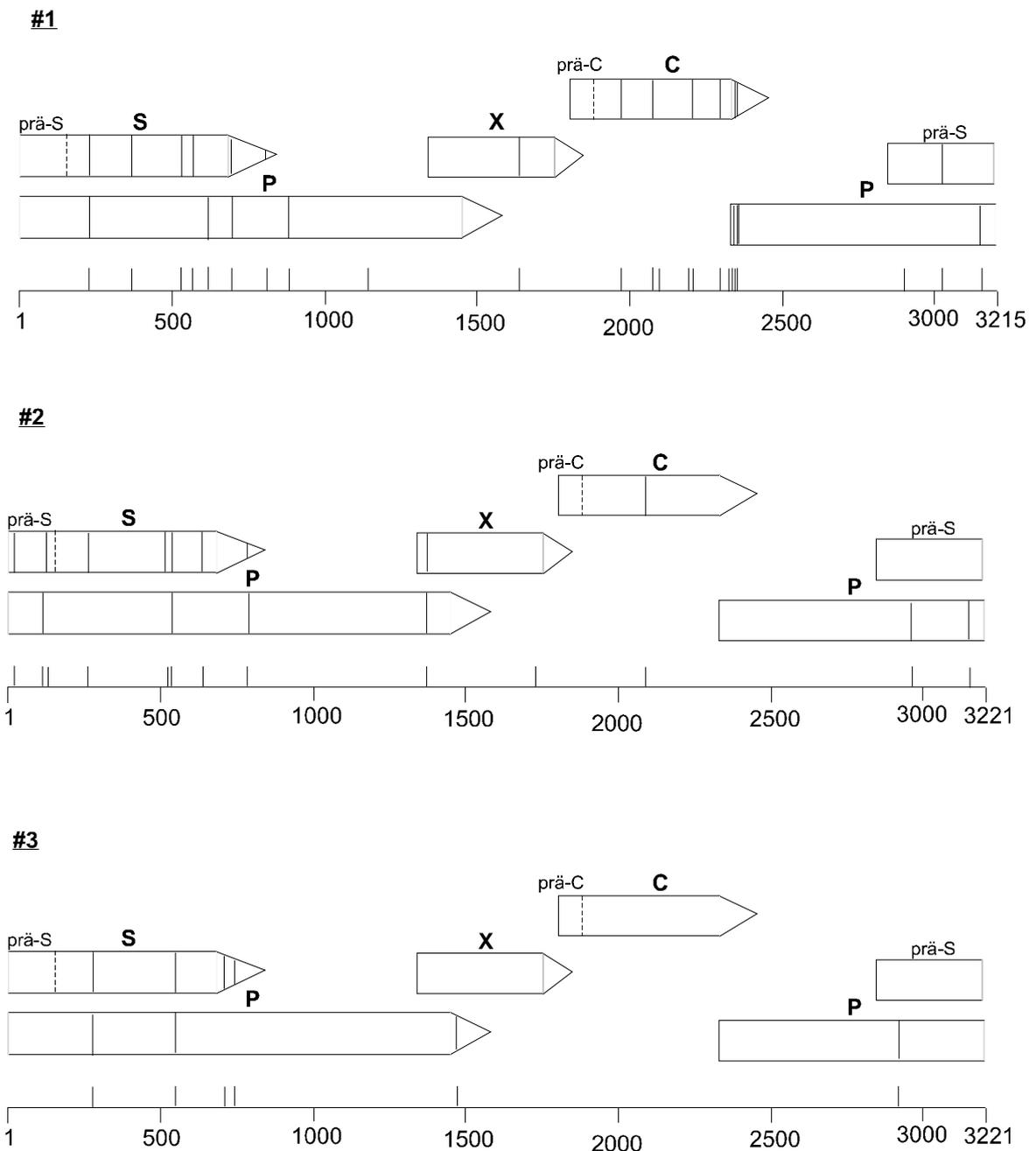


Abbildung 5: Nukleotid- und Aminosäuren-Austausche der HBV-Genome zum Zeitpunkt der chronischen Hepatitis B vor LTX im Vergleich zum Zeitpunkt der FCH nach LTX bei Pat. #1-3.

Das Genom wird als horizontaler Strich gezeigt, die Zahlen entsprechen den Nukleotidpositionen im Genom (nach Galibert et al. 1979), die senkrechten Striche repräsentieren Mutationen. Darüber in Balkenform die vier offenen Leserahmen, als gestrichelte Linie das Ende von prä-C und prä-S, durchgezogene senkrechte Striche stehen für Aminosäuren-Austausche.

Insgesamt resultierten aus den 42 Mutationen auf Nukleotidebene 44 vorhersagbare Aminosäuren-Austausche, von denen 6 komplett und 38 inkomplett waren. Es fielen 18 AS-Austausche in das S-Protein, 17 in das P-Protein, 7 in das C-Protein und 2 in das X-Protein.

Auch auf AS-Ebene konnte keine gemeinsame Veränderung in den drei untersuchten HBV-Populationen gefunden werden. Lediglich an zwei Positionen fanden inkomplette AS-Austausche in Patient #1 und #2 statt, die aber auch nicht identisch waren: in der a-Det. des S-Proteins (AS 126) Isoleucin/Threonin→Isoleucin bzw. Threonin→Threonin/Serin und in einem Helfer T-Epitop im C-Protein (AS 63) Glycin→Glycin/Valin bzw. Glycin→Alanin/Glutamat.

Zusammengefaßt zeigten die HBV-Genome vom Zeitpunkt der Lebertransplantation bis zum Auftreten einer fibrosierenden cholestatischen Hepatitis eine statistische Mutationsrate von 0,6 bzw. 2 bzw. 2,8 Nukleotidsubstitutionen/Jahr. Es konnte keine gemeinsame Mutation auf Nukleotid- oder Aminosäuren-Ebene festgestellt werden.

3.2.2 HBV-Sequenzvergleich mit Referenzgenomen / Neumutationen

Neben der Möglichkeit von de novo-Mutationen im Vergleich der HBV-Populationen zwischen LTX und FCH-Auftreten ist auch vorstellbar, daß schon vorher Mutanten bestanden, die erst unter Immunsuppression bzw. bestimmten Wirtsfaktoren ihre pathogenetische Relevanz entfalten. Um dieser Frage nachzugehen, wurden die kompletten HBV-Genome mit schon bekannten Sequenzen verglichen, und zwar Genotyp-spezifisch und -übergreifend.

3.2.2.1 Genotypisierung und Auswahl des Referenzgenomes

Zum Zeitpunkt der experimentellen Durchführung dieser Arbeit standen 40 komplette HBV-Genome aus der Datenbank des NCBI (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, USA) zum Vergleich mit den in dieser Arbeit ermittelten Sequenzen zur Verfügung (Identifikationsnummern siehe Anhang).

Als erstes wurde durch Sequenzvergleich der jeweilige Genotyp festgelegt. Anhand der charakteristischen 6 Nukleotid-Insertion an Pos. 2354-2359 (Li et al. 1993) konnte für die

HBV-Populationen aus Patient #2 und #3 der Genotyp A festgestellt werden. Der theoretisch anhand von AS-Positionen im S-Gen bestimmte Subtyp (nach Okamoto et al. 1987) war in beiden Fällen adw. Die Genome wiesen eine Gesamtlänge von 3221 Nukleotiden auf.

Für den Genotyp A standen 6 Referenzgenome zur Verfügung (NCBI-Identifikations-Nr. 59455, 59418, 59416, 60429, 329633, 260397). Die größte Homologie der Genome aus Patient #2 und #3 bestand dabei mit dem Genom 59455 (Preisler-Adams et al. 1993), nämlich 99,1 % bzw. 98,8 %.

Für die aus Patient #1 isolierte HBV-Population wurde die stärkste Homologie mit Genotyp C sowie der Subtyp adr festgestellt. Die Hauptpopulation hatte eine Gesamtlänge von 3215 Nukleotiden. Es konnte mit 13 Referenzgenomen vom Genotyp C verglichen werden (NCBI-ID 59585, HHVBC, HHVCCMA, 221500, 457780, 329616, 59404, 221494, 59402, 291409, 59408, 329649, 329621). Die größte Homologie fand sich zu Genom 59404 (Fujiyama et al. 1983) mit 98,0 %.

3.2.2.2 Genotyp-interne Mutationen

Hier wurden die Genome innerhalb ihres Genotyps mit den zur Verfügung stehenden Referenzgenomen verglichen, d.h. aus Patient #1 mit Genotyp C und aus Patient #2 und #3 mit Genotyp A.

Patient #1

Im Virus-Genom aus Patient #1 fanden sich 28 Mutationen innerhalb des Genotyps (Tab. 4). Davon lagen drei im ENH I (Pos. 1014, 1167, 1347), zwei im ENH II (Pos. 1674, 1728) und zwei im SP II (Pos. 3099, 3162).

Auf Aminosäuren-Ebene resultierten hieraus insgesamt 28 Austausche, von denen 13 zu beiden untersuchten Zeitpunkten gefunden wurden, also nicht durch Neu-Mutationen entstanden (Tab. 5 u. Abb. 6). Es fanden sich fünf im C-, acht im präS/S-, davon zwei in der a-Determinante (AS 126 u. 144), drei im X- und 12 im P-Protein.

Pos.	prä-LTX	FCH	Referenz	Struktur
20	A	A	G	
213	C/T	T	T	
387	G	A/G	G	
505	T	T	C	
531	C/T	T	T	
585	A	A/T	A	
616	A/G	A	A	
700	G	A/G	G	
816	A/G	G	G	
918	C	C	A	
1014	G	G	C	E
1167	A/C	A	A	N I
1347	A	A	C	H
1470	A	A	C	
1674	G	G	T	ENH
1728	A	A	G	II
1960	G	G	T	
1969	T	T	C	
2213	A/G	A	A	
2304	C	A	C	
2335	G	G/A	A	
2351	T	T/C	C	
2353	C	C/A	A	
2357	G	G/T	G	
2439	G	G	A	
2573	C	C	T	
3099	G	G	A	SP
3162	C	C/T	T	II

Tabelle 4: Nukleotid-Mutationen der HBV-Population von Pat. #1 im Vergleich zu 13 Referenzgenomen des gleichen Genotyps C. Pos.: Nukleotidposition, prä-LTX: Nukleotid vor LTX, FCH: Nukleotid in Phase der FCH, Referenz: Nukleotid im Referenzgenom, Struktur: funktionell wichtige Struktur (schraffiert).

Protein	AS-Pos.	prä-LTX	FCH	Referenz	Struktur
C	105	L/F	I	I	
	135	P	Q	P	B-Epitop
	151	C	R/C	R	CTL-Epitop/ nucl.
	153	G	G/C	G	loc. signal
	180	G	G	E	
präS	84	M	M	I	
	130	T	T	A	Hep.Attachm.Site
S	20	F/S	F	F	
	78	R	Q/R	R	
	126	I/T	I	I	a-
	144	D	V/D	D	Det.
	182	W	Stop/W	W	
	221	Y/C	C	C	
P	10	R	K/R	K	
	16	A	D/A	D	
	17	E	E/D	E	
	45	D	D	N	
	180	H/Q	H/Q	Q	
	265	V	V	I	
	286	H	H	Y	
	310	N	N	S	
	472	Y	Y	H	
	509	I/V	I	I	
	537	I/V	I	V	
609	D	D	E		
X	33	T	T	P	
	101	A	A	S	
	119	N	N	D	

Tabelle 5: Aminosäuren-Austausche der HBV-Population von Pat. #1 im Vergleich zu 13 Referenzgenomen des gleichen Genotyps C. Protein: betroffenes HBV-Protein, AS-Pos.: Position der Aminosäure im jeweiligen Protein, prä-LTX: Aminosäure vor LTX, FCH: Aminosäure in Phase der FCH, Referenz: Aminosäure des Referenzproteins, Struktur: funktionell wichtige Struktur (schraffiert). Fettdruck: Neu-Mutationen zwischen LTX und FCH-Auftreten.

Patient #2

Bei Patient #2 wurden in der HBV-Population 13 neue Mutationen für Genotyp A festgestellt (Tab. 6). Eine lag im BCP (Basic Core Promoter) (Pos. 1766) und eine im SP II (Pos. 2973).

Hieraus resultierten elf AS-Austausche, von denen die meisten aus Neu-Mutationen entstanden und schon unter 3.2.1 beschrieben wurden. Diese lagen in C- (einer), präS/S- (sechs) mit zwei Austauschen in der a-Det. (AS 122 u. 126) und P-Protein (vier) (Tab. 7 u. Abb. 6).

Pos.	prä-LTX	FCH	Referenz	Struktur
15	A/G	A	A	
115	A/C	C	C	
126	A/C	C	C	
273	A/G	G	A	
519	A	G	A	
531	C	C/G	C	
636	T	A	A	
1766	T	T	C	BCP
2065	A	A	C	
2176	C/T	C/T	C	
2508	T	T	A	
2582	C	C	T	
2973	T	C/T	T	SP II

Tabelle 6: Nukleotid-Mutationen der HBV-Populationen aus Pat. #2 im Vergleich zu 6 Referenz-genomen des gleichen Genotyps A. Pos.: Nukleotidposition, prä-LTX: Nukleotid vor LTX, FCH: Nukleotid in Phase der FCH, Referenz: Nukleotid im Referenzgenom, Struktur: funktionell wichtige Struktur (schraffierte Fläche).

Protein	AS-Pos.	prä-LTX	FCH	Referenz	Struktur
C	63	G	A/E	G	
präS	128	H/R	H	H	
	165	Y/S	S	S	
S	40	S/N	S	N	
	122	K	R	K	a-
	126	T	T/S	T	Det.
	161	F	Y	Y	
P	68	S	S	T	
	223	S	S/P	S	
	344	L	L/I	L	
	482	D	D/E	D	

Tabelle 7: Aminosäuren-Austausche der HBV-Populationen aus Pat. #2 im Vergleich zu 6 Referenz-genomen des gleichen Genotyps A. Protein: betroffenes HBV-Protein, AS-Pos.: Position der Aminosäure im jeweiligen Protein, prä-LTX: Aminosäure vor LTX, FCH: Aminosäure in Phase der FCH, Referenz: Aminosäure des Referenzproteins, Struktur: funktionell wichtige Struktur (schraffiert). Fettdruck: Neu-Mutationen zwischen LTX und FCH-Auftreten.

Patient #3

Für Patient #3 fanden sich insgesamt 18 Mutationen innerhalb des Genotyps (Tab. 8), davon eine im ENH I (Pos.906), vier im ENH II (Pos. 1589, 1739, 1753, 1766), davon die beiden letzteren im BCP.

Auf AS-Ebene resultierten hieraus 15 Austausch, die meisten fanden sich zu beiden untersuchten Zeitpunkten. Es entfielen einer auf C-, sechs auf präS/S- mit einem in der a-Det. (AS 134), sieben auf P- und einer auf das X-Protein (Tab. 9 u. Abb. 6).

Pos.	prä-LTX	FCH	Referenz	Struktur
47	T	T	C	
216	C	C	T	
273	G	G	A	
554	C/T	C	T	
562	C	C	A	
720	C/T	T	C	
765	G	A	G	
906	G	G	T	
1120	T	T	C	ENH I
1589	A	A	C	ENH II
1739	A/G	A/G	G	BCP
1753	C	C	T	BCP
1766	T	T	C	BCP
2119	C	C	T	
2289	T	T	C	
2554	G	G	A	
2887	T	T	A	
2916	T	G/T	T	

Tabelle 8: Nukleotid-Mutationen der HBV-Populationen aus Pat. #3 im Vergleich zu 6 Referenz-genomen des gleichen Genotyps A. Pos.: Nukleotidposition, prä-LTX: Nukleotid vor LTX, FCH: Nukleotid in Phase der FCH, Referenz: Nukleotid im Referenzgenom, Struktur: funktionell wichtige Struktur (schraffierte Fläche).

Protein	AS-Pos.	prä-LTX	FCH	Referenz	Struktur
C	130	L	L	P	
präS	12	L	L	M	
S	21	S	S	L	
	40	S	S	N	
	134	F/L	L	F	a-Det.
	189	I/T	I	T	
	204	S	N	S	
P	83	R	R	K	
	194	L	L	H	
	204	S	A/S	S	
	321	F	F	S	
	490	V/A	A	V	
	493	L	L	M	
	835	D	D	A	
X	127	T	T	I	

Tabelle 9: Aminosäuren-Austausche der HBV-Populationen aus Pat. #3 im Vergleich zu 6 Referenz-genomen des gleichen Genotyps A. Protein: betroffenes HBV-Protein, AS-Pos.: Position der Aminosäure im jeweiligen Protein, prä-LTX: Aminosäure vor LTX, FCH: Aminosäure in Phase der FCH, Referenz: Aminosäure des Referenzproteins, Struktur: funktionell wichtige Struktur. Fettdruck: Neu-Mutationen zwischen LTX und FCH-Auftreten.

Es wurden zwei Mutationen gefunden, die zuvor im Genotyp A noch nicht beschrieben worden waren und jetzt in Patient #2 und #3 auftraten: Pos. 273 G (Referenz A) und Pos. 1766 T (Referenz C). Letztere liegt im BCP.

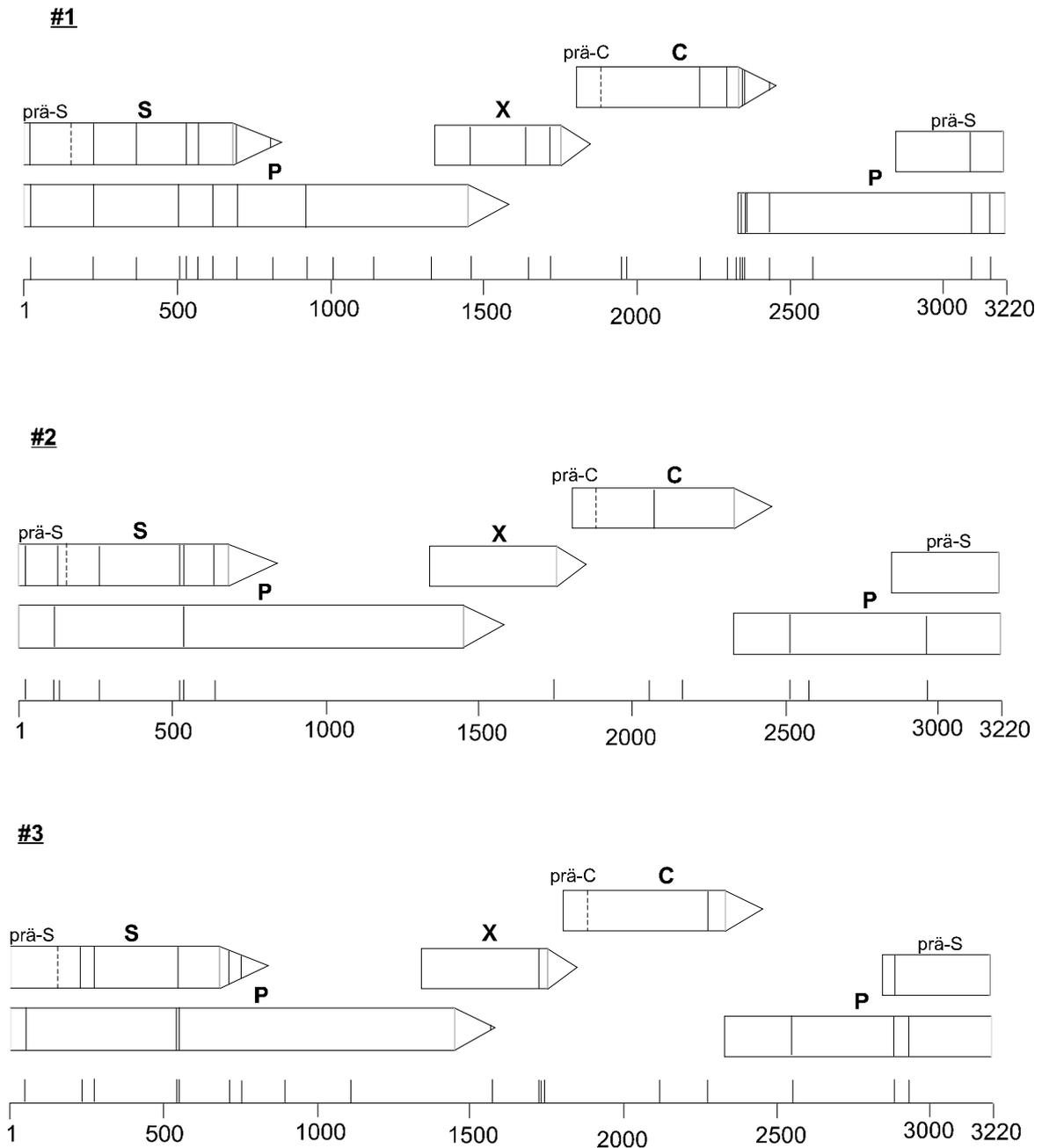


Abbildung 6: Nukleotid-Mutationen und Aminosäuren-Austausche der HBV-Populationen von Pat. #1-3 im Vergleich zu Referenzgenomen des jeweiligen Genotyps. Das Genom wird als horizontaler Strich gezeigt, die Zahlen entsprechen den Nukleotidpositionen im Genom (nach Galibert et al. 1979), die senkrechten Striche repräsentieren Mutationen. Darüber in Balkenform die vier offenen Leserahmen, als gestrichelte Linie das Ende von prä-C und prä-S, durchgezogene senkrechte Striche stehen für Aminosäuren-Austausche.

3.2.2.3 Neubeschriebene Mutationen

Hier wurden die sechs ermittelten Genome mit allen 40 zur Verfügung stehenden Komplet-Genomen verglichen. Nukleotiddifferenzen, die nur in den untersuchten Genomen, aber in keinem der Referenzgenome bestanden, wurden als Neu-Mutationen gewertet. Nukleotidaustausche, die außer in den untersuchten in maximal zwei Referenzgenomen zu finden waren, wurden als seltene Mutationen gerechnet.

Patient #1

Bei Patient #1 konnten 13 neue und 9 seltene Mutationen gefunden werden (Tab. 10).

Zwei Mutationen lagen im ENH I (Pos. 1167, 1347), drei im ENH II (Pos. 1613, 1674, 1728) und eine im SP II (Pos. 3162).

Pos.	prä-LTX	FCH	Referenz	Struktur
neue:				
387	G/A	G/A	G	
585	A	A/T	A	
700	G	G/A	G	
918	C	C	A	
1167	A/C	A	A	ENH I
1470	A	A	C	
1674	G	G	T	ENH II
1728	A	A	G	
1960	G	G	T	
2304	C	A	C	
2353	C	A/C	A	
2357	G	G/T	G	
3162	C	C/T	T	SP II
seltene:				
1347	A	A	C	ENH I
1613	A	A	G	NRE, ENH II
1969	T	T	C	
2101	C/T	T	T	
2201	C	C	T	
2213	A/G	A	A	
2351	T	T/C	C	
2439	G	G	A	
2898	T	T/G	T	

Tabelle 10: Neubeschriebene Mutationen in der HBV-Population aus Pat. #1. Pos.: Nukleotid-position, prä-LTX: Nukleotid vor LTX, FCH: Nukleotid in Phase der FCH, Referenz: Nukleotid im Referenzgenom, Struktur: funktionell wichtige Struktur (schraffierte Fläche).

Patient #2

Die Genome aus Patient #2 wiesen 7 neue und 2 seltene Mutationen auf (Tab. 11).

Eine seltene Mutation fiel in den BCP bzw. ENH II (Pos.1766).

Pos.	prä-LTX	FCH	Referenz	Struktur
neue:				
15	A/G	A	A	
126	A/C	C	C	
273	A/G	G	A	
531	C	C/G	C	
2065	A	A	C	
2508	T	T	A	
2973	T	C/T	T	
seltene:				
1766	T	T	C	BCP
2582	C	C	T	

Tabelle 11: Neubeschriebene Mutationen in der HBV-Population von Pat. #2. Pos.: Nukleotidposition, prä-LTX: Nukleotid vor LTX, FCH: Nukleotid in Phase der FCH, Referenz: Nukleotid im Referenzgenom, Struktur: funktionell wichtige Struktur (schraffiert).

Patient #3

Bei Patient #3 wurden 9 neue und 10 seltene Mutationen festgestellt (Tab. 12).

Hiervon kam eine im ENH I (Pos. 1120) und vier im ENH II (Pos. 1589, 1739, 1753, 1766) vor, davon die beiden letzteren im BCP.

Pos.	prä-LTX	FCH	Referenz	Struktur
neue:				
47	T	T	C	
273	G	G	A	
554	C/T	C	T	
720	C/T	T	C	
1120	T	T	C	ENH I
1589	A	A	C	ENH II
1739	G/A	G/A	G	
2554	G	G	A	
2916	T/G	T/G	T	
seltene:				
216	C	C	T	
784	G	G	T	
1753	C	C	T	BCP
1766	T	T	C	BCP
2088	T	T	G	
2119	C	C	T	
2151	A	A	T	
2239	C	C	G/A	
2289	T	T	C	
2887	T	T	A	

Tabelle 12: Neubeschriebene Mutationen in der HBV-Population aus Pat. #3. Pos.: Nukleotidposition, prä-LTX: Nukleotid vor LTX, FCH: Nukleotid in Phase der FCH, Referenz: Nukleotid im Referenzgenom, Struktur: funktionell wichtige Struktur (schraffierte Fläche).

Zusammenfassend wurden in den sechs untersuchten HBV-Populationen der drei Patienten 29 Mutationen gefunden, die zuvor in keinem Komplet-Genom beschrieben worden waren, und 21 nur maximal zweimal zuvor beschriebene. Diese traten entweder nur vor oder nach LTX oder -in den meisten Fällen- zu beiden Zeitpunkten auf. Auch hier ließ sich keine gemeinsame Mutation bei den drei Patienten ermitteln.

Allerdings fanden sich zwei gemeinsame Mutationen bei Patient #2 und #3, nämlich an Pos. 273 A→G sowie an Pos.1766 C→T. Letztere liegt im Basic Core Promoter und war nur in einem Genom vom Genotyp D vorbeschrieben, das aus einem Patienten mit fulminanter Hepatitis stammte (NCBI-ID 451966, Hasegawa et al. 1994).

In folgenden Promotor-Regionen wurden neue Mutationen gefunden: drei im ENH I, acht im ENH II, davon drei im BCP und eine im SP II (zusammengefaßt in Abb. 7).

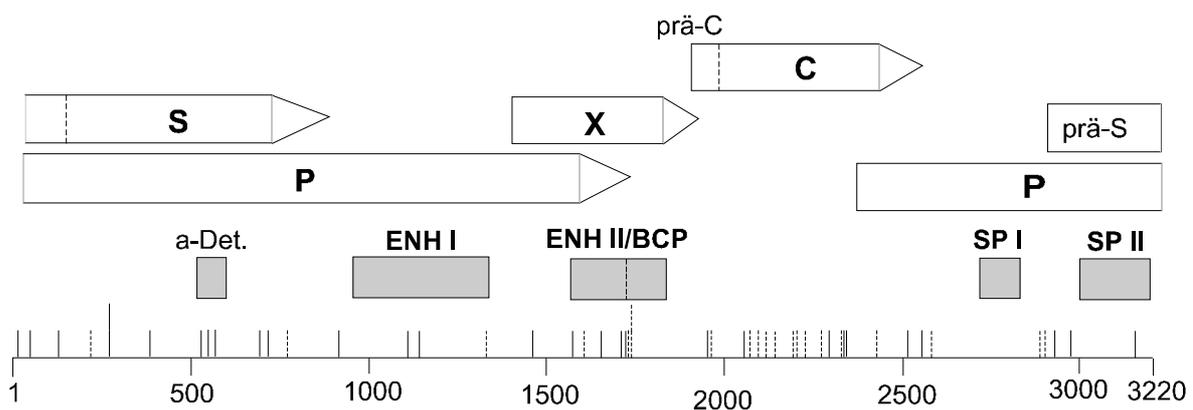


Abbildung 7: Neubeschriebene Mutationen in den HBV-Populationen aus Pat. #1-3, dargestellt als senkrechte Striche auf dem als waagerechter Strich dargestellten Genom, mit durchgezogener Linie für Neumutation, gestrichelter Linie für seltene Mutation, verdoppelter Länge für gleiche Mutation in zwei Pat. Darüber als schraffierte Balken die Promotor-Bereiche Enhancer (ENH) I und II bzw. Basic Core Promoter (BCP), S-Promotor (SP) I und II sowie die a-Determinante (a-Det.), als leere Balken die vier offenen Leserahmen für S-, P-, X- und C-Gen, als gestrichelte Senkrechte das Ende von prä-C und prä-S.

3.3 Deletionsvarianten in der Direkt-Sequenzierung

Bei den insgesamt sechs kompletten HBV-Populationen aus drei Patienten ließen sich nahezu alle Genabschnitte problemlos direkt sequenzieren. Ausnahmen bildeten die Genome aus Patient #1 und #2, bei denen sich Deletionen fanden. Diese äußerten sich durch massive Heterogenitäten, die zu beiden untersuchten Zeitpunkten in den Direktsequenzen jeweils ab einer bestimmten Position auftraten und sich bis zum Ende der jeweiligen Gelaufentrennung fortsetzten. Diese Heterogenitäten traten gleichermaßen bei der Sequenzierung von jeweiligem Plus- und Minus-Strang auf und waren in wiederholten Sequenzreaktionen, auch mit Proben aus verschiedenen PCR-Amplifikationsreaktionen, reproduzierbar. Das entsprechende Sequenzbild aus der Serumprobe von Patient #2 nach Ausbruch der FCH ist als Beispiel in Abb. 8b gezeigt. Auf dem Plus-Strang lassen sich bei zuvor sauberer Sequenz die Heterogenitäten ab Nukleotid-Position 1763 nachweisen, auf dem Minus-Strang zeigte sich ein vergleichbares Bild ab Pos. 1770 (hier nicht gezeigt). Dieses deutet darauf hin, daß zwischen diesen beiden Punkten in einem Teil der Genome eine Deletion vorliegt. Es entsteht bei der Sequenzierung bis zum Beginn bzw. Ende der Deletion auf beiden Strängen eine einheitliche Sequenz, dann verschiebt sich aber in den deletierten Genomen das Leseraster. Dies stellt sich im Sequenzgel als Heterogenitäten dar, da nun zwei verschiedene Sequenzen sich überlappen. Würde es sich um eine Insertion handeln, träten die Heterogenitäten ab der gleichen Nukleotid-Position auf Plus- und Minus-Strang auf.

Zur genaueren Darstellung einer Deletion zwischen den Nukleotiden 1763 und 1770 bei Pat. #2 wurden die sich überlappenden Sequenzen "subtraktiv" gelesen, d.h. erst wurde die erwartete (Referenz-)Sequenz markiert und dann die übrigen Banden (siehe Abb. 8a). Diese ergaben dann eine um die acht Nukleotide 1763-1770 verkürzte, ansonsten identische Sequenz.

Bei Patient #1 ergab sich ein ähnliches Bild von Heterogenitäten im präS-Bereich. Hier wurde eine Deletion in einer Teilpopulation im Bereich der Nukleotide 2849-2863 vermutet, die allerdings durch ihre Länge und durch weitere Unsauberkeiten in der Minus-Strang-Sequenz nicht eindeutig durch "subtraktive" Darstellung ermittelt werden konnte.

Deshalb wurde in diesem Fall als zusätzlicher Anhalt eine PCR durchgeführt (s.a. Kap. 2.3.3), die ein 250 bp-Fragment dieser Region ergab. Bei dessen elektrophoretischer Auftrennung in einem 2,5 %-igen Agarosegel konnten dann zwei Fragmente verschiedener Größe nachgewiesen werden (Abb. 8b).

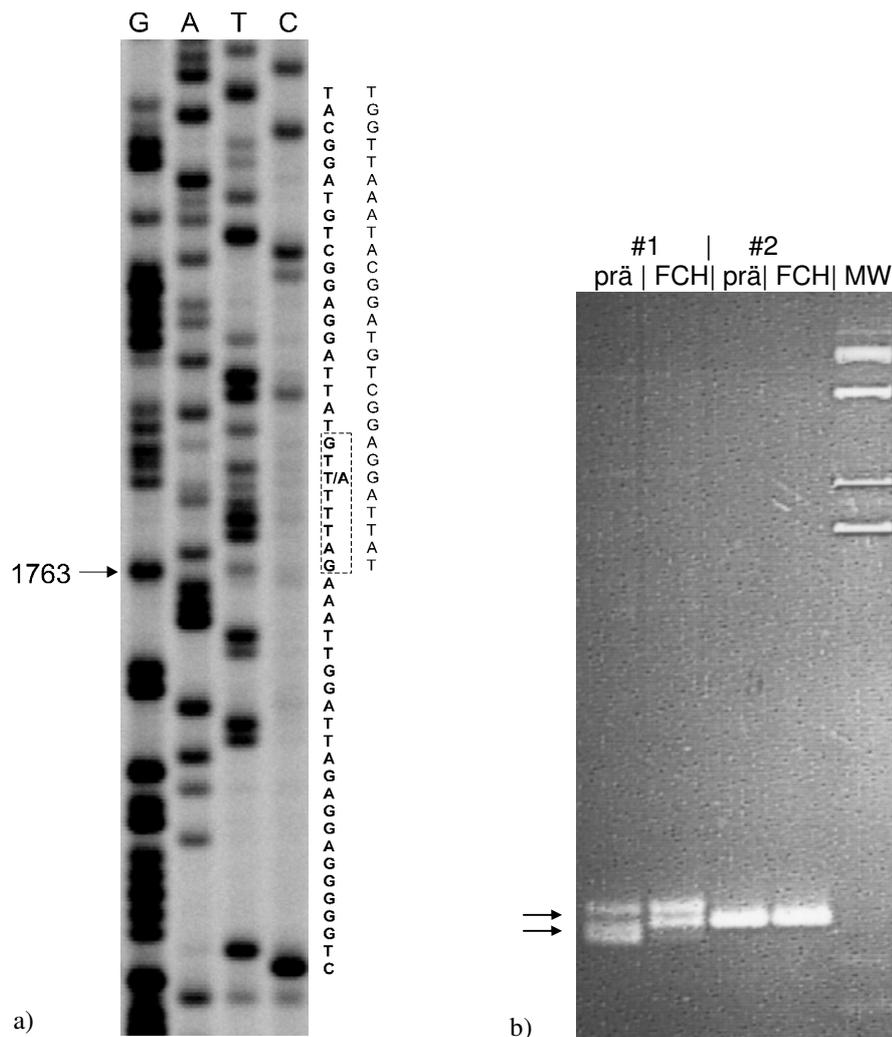


Abbildung 8: Nachweis von Deletionen bei den HBV-Populationen aus Pat. #1 und 2 durch unterschiedliche Methoden. a) Auszug aus Direktsequenz von #2 zum Zeitpunkt FCH; Heterogenitäten ab Pos. 1763; in durchgehender Beschriftung und Fettdruck die Hauptsequenz, rechts daneben die um die deletierten Nukleotide (im gestrichelten Kasten) "subtraktiv" gelesene Zweitsequenz. b) elektrophoretische Auftrennung der Fragment-PCR mit Nachweis zweier Banden (mit/ohne Deletion) bei #1 in beiden Proben, keine Deletion in diesem Bereich bei #2; prä: Serumprobe vor LTX, FCH: Serumprobe aus Phase der FCH, MW: Längenstandard.

3.4 Sequenzerggebnisse klonierter HBV-Genome

Die Direktsequenz ergab für die HBV-Genome, die aus den Seren der Patienten #1 und #2 isoliert worden waren, deutliche Hinweise auf Deletions-Varianten in einem Teil der Genome. Um diese in einzelnen Genomen - nicht wie bei der Direkt-Sequenzierung in einer gemischten Population - nachzuweisen und genau zu charakterisieren, wurden sie mit Hilfe des Vektors pUC 19 in *Escherichia coli* kloniert. Anschließend wurden die Virus-Abschnitte mit Deletionsverdacht sequenziert. Bei Patient #1 war dies die präS-Region, bei #2 der Basic Core Promoter (BCP).

Patient #1

Es wurden insgesamt 14 klonierte HBV-Genome im präS-Bereich sequenziert, davon fünf zum Zeitpunkt vor LTX (im Folgenden prä 1-5 genannt) und neun während FCH (FCH 1-9). Der Vergleich mit den Direkt-Sequenzen ergab bis auf wenige Ausnahmen eine weitestgehende Homologie (siehe Abb. 9 u. 10). Auch Heterogenitäten aus der Direktsequenz ließen sich durch die Klone bestätigen, beispielsweise in den klonierten Genomen FCH 1-9 an Pos. 2898 (T in 5 bzw. G in 4 Sequenzen). Ausnahme war das klonierte Genom FCH 8, das deutlich mehr Sequenzunterschiede zur Direktsequenz aufwies, die dem Genotyp C angehörte. Durch Vergleich mit den 40 Referenzgenomen ließ sich dieses Genom FCH 8 dem Genotyp A zuordnen.

Alle fünf klonierten Sequenzen aus der Zeit vor LTX wiesen eine Deletion auf, vier in den Nukleotiden 2846-2863, einer bei 2853-2867 mit Mutation 2849/50. Von den neun Genomen aus der FCH-Zeit hatten zwei ebenfalls die Deletion an Pos. 2846-2863, drei entsprachen dem Wildtyp und vier zeigten eine weitere Deletion, nämlich der Nukleotide 3148-3186 (Abb. 11).

Also bestätigte sich der Verdacht auf eine Deletion in einer Virus-Teilpopulation aus der Direkt-Sequenz zu beiden untersuchten Zeitpunkten, allerdings war diese mit 18 Nukleotiden drei länger als zuvor angenommen. Durch den Verlust der Nukleotide 2846-2863 fehlt das erste Startkodon des präS1-Gens. 33 Nukleotide weiter in 3'-Richtung folgt innerhalb des Leserahmens ("in-frame") ein zweites ATG. Unter der Voraussetzung, daß dieses bei Verlust des ersten ATG die Translation von präS1 initiiert, entsteht ein um die ersten 11 Aminosäuren verkürztes präS1-Protein. Die vorhersagbare Folge für das P-Protein, dessen Leserahmen ebenfalls in diesem Genomabschnitt liegt, ist ein Verlust der AS 181-186.

Die zweite Deletion der 39 Nukleotide 3148-3186 liegt in-frame am 3'-Ende von präS1 und im SP II. Hierdurch fehlen vorhersagbar die AS 101-113 des präS1-Proteins/largeHBsAg und die AS 282-294 des P-Proteins. Sie konnte nur in Genomen aus der FCH-Zeit nachgewiesen werden. Korrespondierend waren auch in der Direkt-Sequenz aus dieser Zeit deutliche Heterogenitäten in diesem Bereich feststellbar, was in der Direkt-Sequenz vor LTX nicht der Fall war.

In keinem der klonierten Genome wurde das gleichzeitige Auftreten beider Deletionen beobachtet.

	2810	2820	2830	2840	2850	2860	2870	2880	2890	2900
	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *
#1 FCH	CGCCTCATT	TGTGGGTCAC	CATATTCTTG	GGAACAAGAG	CTACAGCATG	GGAGGTTGGT	CTTCCAAACC	TCGACAAGGC	ATGGGGACGA	ATCTTTCKGT
#1 prä-LTXT..>
prä 1T..>
prä 2T..>
prä 3G.T..>
prä 4T..>
prä 5G.AA.T..>
FCH 1T..>
FCH2T..>
FCH 3T..>
FCH 4T..>
FCH 5C.G..>
FCH 6G..>
FCH 7G..>
FCH 8A.C.AA.CA.T..>
FCH 9G..>

Abbildung 9: Sequenzergebnisse der klonierten HBV-Genome bei Pat. #1 im präS-Anfangsbereich. Vergleich der Sequenzen aus der Direktsequenzierung während FCH (#1 FCH, Zeile 1) bzw. vor LTX (#1 prä-LTX, Zeile 2) mit klonierten Genomen vor LTX (prä 1-5, Zeile 3-7) und während FCH (FCH 1-9, Zeile 8-16). Im gestrichelten Kasten von Pos. 2846-2863 der heterogene Abschnitt (mit/ohne Deletion) der Direktsequenz; gepunktet dargestellt sind identische, gestrichelt deletierte Nukleotide, unterstrichen Startkodon von präS1; K: G/T-Heterogenität.

	3110	3120	3130	3140	3150	3160	3170	3180	3190	3200
#1 FCH	* * TGACAACAGT	* * GCCAGTAGCA	* * CCTCCTCCTG	* * CCTCCACCAA	* * TCGGCAGTCA	* * GGAAGACAGC	* * CYACTCCCAT	* * CTCTCCACCT	* * CTAAGAGACA	* * GTCATCCTCA
#1 prä-LTX>
prä 1>
prä 2>
prä 3>
prä 4>
prä 5>
FCH 1>
FCH 2>
FCH 3	C.....>
FCH 4>
FCH 5>
FCH 6>
FCH 7>
FCH 8	...C....	.T.AC.ATT>
FCH 9>

Abbildung 10: Sequenzergebnisse der klonierten HBV-Genome bei Pat. #1 im N-terminalen präS-Bereich. Vergleich der Sequenzen aus der Direktsequenzierung während FCH (#1 FCH, Zeile 1) bzw. vor LTX (#1 prä-LTX, Zeile 2) mit klonierten Genomen vor LTX (prä 1-5, Zeile 3-7) und während FCH (FCH 1-9, Zeile 8-16). Im gestrichelten Kasten von Pos. 3148-3186 der heterogene Abschnitt (mit/ohne Deletion) der Direktsequenz; gepunktet dargestellt sind identische, gestrichelt deletierte Nukleotide; unterstrichen ist die CCAAT-Box. Y: C/T-Heterogenität.

Patient #2

Es wurden acht klonierte HBV-Genome sequenziert, davon zwei aus der Serumprobe vor LTX (im Folgenden prä 1 und prä 2 genannt) und sechs während FCH (FCH 1-6). Der Sequenzvergleich mit den Direkt-Sequenzen ergab eine weitestgehende Homologie (Abb. 9). Auch hier konnten in der Direktsequenz festgestellte Heterogenitäten bestätigt werden, z.B. fand sich an Position 1727 vor LTX jeweils ein A und G, während FCH vier A und zwei G.

Ebenfalls fand sich ein Genom, das offensichtlich einen anderen Genotyp aufwies, nämlich prä 2 mit Genotyp C im Vergleich zu Genotyp A in den weiteren Sequenzen.

In zwei klonierten HBV-Genomen fand sich eine Deletion der Nukleotide 1763-1770. Beide stammten aus Serumproben während FCH. Die restlichen vier Genome aus dieser Zeit wiesen keine Deletion, aber die schon in der Direkt-Sequenz beobachteten Mutationen der Pos. 1764 (G→A) und 1766 (C→T) auf. Diese und zusätzlich ein Austausch T→A an Pos. 1768 wurden auch in einem Klon vor LTX gefunden. Der andere Klon vor LTX wies eine 2-Nukleotid-Insertion an Pos. 1765 (TA) auf, zusätzlich Mutationen der Nukleotide 1762 A→T, 1763 G→C, 1764 G→A.

Die Vermutung einer Deletion der Nukleotide 1763-1770 in einem Teil der Virus-Population, die sich aus der Direkt-Sequenz ergab, konnte hier in zwei von sechs Klonen zum FCH-Zeitpunkt exakt bestätigt werden. Sie liegt im funktionell bedeutenden Basic Core Promoter, außerdem im Leserahmen des X-Gens und führt vorhersagbar zu einem um die letzten 25 AS verkürzten X-Protein.

In den beiden klonierten Genomen vor LTX wurde die Deletion nicht gefunden, es ist aber durch das deutlich heterogene direkte Sequenzbild sehr wahrscheinlich, daß sie auch zu diesem Zeitpunkt schon vorlag und wegen der geringen Anzahl der untersuchten Klone nicht nachgewiesen werden konnte. Stattdessen wurde vor LTX (prä 2) eine 2-Nukleotid-Insertion bei Pos. 1765 gefunden.

	1710	1720	1730	1740	1750	1760	1770	1780	1790	1800
#2 prä-LTX	* * GCCTACTTCA	* * AAGACTGTGT	* * GTTTAAAGAC	* * TGGGAGGAGC	* * TGGGGGAGGA	* * GATTAGGTTA	* * AAGATTTTGG	* * TATTAGGAGG	* * CTGTAGGCAT	* * AAATTGGTCT
#2 FCHR.....>
prä 1A.....>
prä 2	..A.....T.....G.....T.....A.....	TC.C.....	..C.....>
FCH 1>
FCH 2>
FCH 3>
FCH 4G.....>
FCH 5>
FCH 6G.....>

Abbildung 11: Sequenzergebnisse der klonierten HBV-Genome im Basic Core Promotor bei Pat. #2. Vergleich der Sequenzen aus der Direktsequenzierung vor LTX (#2 prä-LTX, Zeile 1) bzw. während FCH (#2 FCH, Zeile 2) mit klonierten Genomen vor LTX (prä 1 u. 2, Zeile 3-4) und während FCH (FCH 1-6, Zeile 5-10). Im gestrichelten Kasten von Pos. 1763-1770 der heterogene Abschnitt (mit/ohne Deletion) der Direktsequenz; gepunktet dargestellt sind identische, gestrichelt deletierte Nukleotide; R: A/G-Heterogenität.

Zusammenfassend wurde der sich aufgrund der Direkt-Sequenz ergebende Verdacht auf Deletionen durch die Sequenzierung klonierter HBV-Genome bestätigt.

In einer Virus-Teilpopulation aus Patient #2 wurde eine 8 Nukleotide umfassende Deletion an Pos. 1763-1770 im Core Promotor gefunden. Virus-DNA aus Patient #1 wies z.T. zwei Deletionen im präS1-Gen an Pos. 2846-2863 (18 Nukl.) und 3148-3186 (39 Nukl.) auf. Alle diese Deletionen waren in keinem der 40 kompletten Referenzgenome vorbeschrieben.

3.5 Mutationen in funktionell bedeutsamen Regionen

Es wurden Mutationen im Vergleich zu den 40 Referenzgenomen zusammengetragen, welche Auswirkungen auf replikative und pathogenetisch relevante Eigenschaften des Virus haben könnten. Als relevante Lokalisationen wurden Promotor- und Enhancer-Regionen gewertet, namentlich Enhancer (ENH) I und II, Basic Core Promoter (BCP) und die S-Promotoren (SP) I und II (s.a. Kap. 1.2). Desweiteren sind Mutationen aufgeführt, die eine Verschiebung des Leserasters bewirken wie Stopkodons, Deletionen und Insertionen. Die entsprechenden Mutationen und Regionen/Strukturen fanden zu überwiegenden Teilen schon in den vorhergehenden Unterkapiteln Erwähnung.

Patient #1

Hier fand sich zu beiden untersuchten Zeitpunkten im Virus-Genom eine G→A-Mutation an Pos. 1896. Diese führt zu einem TAG-Stopkodon im präC-Gen. Desweiteren fielen zwei Mutationen im Basic Core Promoter (BCP) auf: 1762 A→T, 1764 G→A. Vier weitere Mutationen wurden im Enhancer II (ENH II) festgestellt. Im Enhancer I (ENH I) wurden fünf, im S-Promotor II (SP II) drei Mutationen gefunden. Auffällig war in einer Teilpopulation während FCH ein G→A-Austausch an Pos. 700, der zu einem TGA-Stopkodon im 3'-terminalen S-Gen führt. Außerdem fielen die beiden Deletionen von 18 bzw. 39 Nukleotiden im präS1-Gen auf (s. Tab. 13).

Patient #2

Im BCP konnten zu beiden untersuchten Zeitpunkten folgende Mutationen beobachtet werden: 1764 G→A, 1766 C→T sowie in einer Teilpopulation vor LTX 1768 T→A. Außerdem fielen eine Deletion der 8 Nukleotide 1763-1770 und in einem klonierten

Genom vor LTX eine TA-Insertion an Pos. 1765 auf. Desweiteren konnte eine Mutation im SP II gefunden werden (Tab. 13).

#1

Struktur	Pos.	prä-LTX	FCH	Referenz	Auftreten
ENH I	984	G	G	A	je 1 A,B,C
	1014	G	G	C	2 B
	1098	T	T	C	2 B, 1 C, 1 F
	1167	A/C	A	A	neu
	1347	A	A	C	1 B
ENH II	1613	A	A	G	1C
	1653	C/T	C	C	bek.
	1674	G	G	T	neu
	1728	A	A	G	neu
BCP	1762	T	T	A	bek.
	1764	A	A	G	bek.
präC-Stopcodon	1896	A	A	G	bek.
präS1	2846-2863	Deletion	Deletion		neu
präS1,SP II	3148-3186		Deletion		neu
SP II	3026	T	T/C	C	bek.
	3099	G	G	A	je 1 A,E,F
	3162	C	C	T	neu
S: Stopcodon	700	G	A/G	G	neu

#2

Struktur	Pos.	prä-LTX	FCH	Referenz	Auftreten
BCP	1764	A	A	G	bek.
	1766	T	T	C	1 D (fulm.)
	1768	A/T	T	T	1 D (fulm.)
	1763-1770	Deletion	Deletion		neu
	1765	Insertion TA			neu
SP II	2973	T	C/T	T	neu

#3

Struktur	Pos.	prä-LTX	FCH	Referenz	Auftreten
ENH I	1120	T	T	C	neu
ENH II	1589	A	A	C	neu
	1739	A/G	A/G	G	neu
BCP	1753	C	C	T	neu
	1762	T	T	A	bek.
	1764	A	A	G	bek.
	1766	T	T	C	1 D (fulm.)

Tabelle 13: Mutationen in funktionell bedeutsamen Regionen in den HBV-Populationen aus Pat. #1-3.

Struktur: funktionell wichtige Struktur, Pos.: Nukleotidposition, prä-LTX: Nukleotid vor LTX, FCH: Nukleotid in Phase der FCH, Referenz: Nukleotid im jeweiligen Referenzgenom des gleichen Genotyps, Auftreten: Häufigkeit der Mutation in den 40 Referenzgenomen unter Angabe des Genotyps; bek.: häufig vorbeschrieben, neu: neu beschrieben, fulm.: Genom aus Pat. mit fulminanter Hepatitis B.

Patient #3

Hier wurden folgende Mutationen im BCP zu beiden untersuchten Zeitpunkten festgestellt: 1753 T→C, 1762 A→T, 1764 G→A und 1766 C→T. Zwei weitere Mutationen fanden sich innerhalb des ENH II, eine wurde im ENH I beobachtet (Tab. 13).

Zusammenfassend hatten in allen drei Patienten die HBV-Genome Mutationen, zum Teil Deletionen (#2) im Basic Core Promoter. Darüberhinaus fielen bei #1 Deletionen in präS1 und Stopkodons in präC- und S-Gen auf.

4 Diskussion

Die Pathogenese der fibrosierenden cholestatischen Hepatitis (FCH) ist ungeklärt. Vermutet wird unter anderem, daß Virus-Mutanten eine Rolle spielen, die zu Überexpression und intrazellulärer Akkumulation viraler Antigene führen.

In dieser Arbeit wurden erstmals HBV-Populationen, die aus Seren von an FCH erkrankten Patienten zum Zeitpunkt der chronischen Infektion vor Lebertransplantation (LTX) und bei Auftreten der FCH nach LTX isoliert wurden, in ihrer *vollen Länge* sequenziert.

Die Auswertung erfolgte unter verschiedenen Gesichtspunkten:

1. Veränderungen der HBV-Populationen zwischen chronischer Infektion und FCH
2. Vergleich der HBV-Populationen mit vorbeschriebenen kompletten Genomen
3. Analyse von funktionell wichtigen HBV-Regionen auf Mutationen.

4.1 Methodische Anmerkungen

Die Methodik der Direkt-Sequenzierung von PCR-Produkten birgt die Gefahr von Ergebnisverfälschungen durch artifizielle Mutationen in sich. Während der PCR-Amplifikation kann es durch Lesefehler der Polymerase zu Nukleotidaustauschen kommen, die durch die exponentielle Vervielfältigung so stark vermehrt werden, daß sie in den anschließenden Auswertungstechniken nachweisbar werden und zu Auswertungsfehlern führen können.

Um die Wahrscheinlichkeit technisch bedingter artifizieller Mutationen weitestgehend zu reduzieren, wurden die angewandten Methoden soweit möglich optimiert. Für die PCR wurde der Expand High Fidelity Enzym-Mix (Boehringer Mannheim) verwendet, ein Gemisch aus Taq- und Pwo-DNA-Polymerasen, das eine hohe Amplifikationsrate bei sehr niedriger Lesefehlerrate ($8,5 \times 10^{-6}$) aufweist (siehe Kap. 2.3.1). Diese Lesefehlerrate bedeutet eine statistische Wahrscheinlichkeit von 0,03 Mutationen pro HBV-Gesamtgenom. Desweiteren wurden HBV-Plus- und Minus-Strang unabhängig voneinander komplett sequenziert. Dies gelang nur im Bereich von Deletionen nicht. Komplementäre Bereiche von Plus- und Minus-Strang wurden aus verschiedenen PCRs sequenziert. Hierbei zeigten sich keinerlei Differenzen, was unterstrich, daß mit der

verwendeten Polymerasen-Kombination artifiziell entstandene Mutationen sehr selten sind und hier nicht nachweislich auftraten.

Bei der Kontrolle der Bindungsstellen für die PCR-Primer fand sich in allen untersuchten Genomen je nur eine Differenz zu den Sequenzen der verwendeten Primer, jeweils im Primer P3 (siehe Abb. 2). Alle weiteren Primer-Sequenzen waren mit denen der untersuchten Genome identisch, wodurch eine selektive Amplifikation einer Teilpopulation praktisch ausgeschlossen war.

Unter Kap. 3.1 wurde beschrieben, daß bei der Gesamt-Genom-PCR auch kleinere Fragmente als das Gesamt-Genom von ca. 3200 Basen auftraten. Es ist davon auszugehen, daß es sich bei diesen kleineren Fragmenten ebenfalls um HBV-DNA und nicht um Reaktionsartefakte handelte, da diese bei den einzelnen Proben unterschiedlich waren, sich jedoch für jede einzelne Probe in verschiedenen PCRs in gleicher Weise reproduzieren ließen. Desweiteren sind derartige HBV-Genome mit ausgedehnten Deletionen und vergleichbarer Gesamtlänge z.B. als Splicing-Varianten vielfach in der Literatur beschrieben und diskutiert worden (Günther et al. 1995, 1997). Ihre Funktion im HBV-Lebenszyklus konnte bislang nicht festgelegt werden. Da sie meist in Patienten mit chronischer Infektion gefunden wurden, könnten sie eine Rolle in der Chronifizierung spielen.

Der störende Einfluß der kleineren PCR-Produkte bei der Direktsequenzierung konnte durch Berücksichtigung der Ergebnisse der PCR-Kinetik ausreichend reduziert werden. Deshalb konnte auf weitere Maßnahmen, wie eine Aufreinigung der 3,2 kB-Fraktion z.B. durch Gelextraktion (Kap. 2.8), verzichtet werden.

4.2 Genotypen

Es konnte in allen untersuchten Patientenseren durch die verwendeten Methoden HBV-DNA nachgewiesen und diese durch direkte Sequenzierung näher charakterisiert werden.

Die Viruspopulationen, die aus den Pat. #2 u. #3 isoliert wurden, konnten dem Genotyp A zugeordnet werden, der in Nordamerika verbreitet ist. Die größte Homologie beider Populationen bestand dabei mit dem aus einem Patienten mit einer hochtitrigen, HBeAg-positiven Infektion isolierten HBV-Genom (Preisler-Adams et al. 1993, keine weiteren Angaben zum klinischen Verlauf). Das HBV-Genom aus Pat. #1 konnte dem Genotyp C zugeordnet werden, dessen typisches Verbreitungsgebiet Ostasien und Fernost ist. Am

ähnlichsten war es der von Fujiyama et al. 1983 bestimmten Sequenz, die aus gesammeltem, HBeAg-positivem Plasma aus Japan gewonnen wurde.

In der Auswertung der klonierten Genome aus Serumproben von Pat. #1 und #2 fiel jeweils eine Sequenz auf, die offensichtlich einem anderen Genotyp angehörte (siehe Kap 3.4, Abb. 9 u. 10). Dies läßt nicht auf eine Verunreinigung der Proben schließen, vielmehr sind Genotyp-übergreifenden Mischinfektionen in der Literatur seit langem bekannt (Okamoto et al. 1987) und es wurden schon Genotyp-Wechsel im chronischen Krankheitsverlauf gesehen (Bahn et al. 1997).

4.3 HBV-Sequenzunterschiede zwischen LTX und FCH-Auftreten

Bisherige Untersuchungen der HBV-Sequenz bei FCH fanden meist nur zum Zeitpunkt der Krankheit statt und beschränkten sich auf subgenomische Analysen ausgewählter Genom-Bereiche (McMillan et al. 1996, Trautwein et al. 1996, Hawkins et al. 1996, Fang et al. 1993, Chen et al. 1994, Angus et al. 1995, Booth et al. 1995). Eine Analyse aller Mutationen im Gesamtgenom und deren zusammenhängende Bewertung liegt bislang nicht vor. Ebenso wurden keine Sequenzvergleiche kompletter Virusgenome, die in der chronischen Krankheitsphase bzw. nach Auftreten der Krankheit in einem Patienten zu finden sind, durchgeführt.

In dieser Arbeit wurden die kompletten HBV-Genome aus den Seren dreier Patienten jeweils vor LTX und während FCH miteinander verglichen, um der Frage nachzugehen, ob zwischen diesen Zeitpunkten neu auftretende Mutationen für den klinischen Verlauf verantwortlich sind.

Es entwickelten sich bei Pat. #1-3 insgesamt fünf komplette Nukleotid-Austausche innerhalb von 8,5, 12 bzw. 21 Monaten. Außerdem fanden sich 37 inkomplette Austausche, d.h. heterogene Viruspopulationen, bei denen in der Direkt-Sequenz jeweils das ursprüngliche und das neue Nukleotid nebeneinander nachzuweisen waren. Aus den insgesamt 42 Nukleotid-Mutationen resultierten 44 vorhersagbare Aminosäuren-Austausche, von denen sechs komplett und 38 inkomplett waren. Die Mutationen verteilten sich über das ganze Genom.

Verglichen mit der in der Literatur (Okamoto 1987 und Orito 1989) bei asymptomatischen Virusträgern beobachteten bzw. geschätzten Mutationsrate von ca. 0,1 Nukleotidsubstitutionen pro 3,2 kB-Genom und Jahr lag diese hier mit dem 28-, 20- und 6-

fachen Faktor deutlich höher. Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit Auswertungen von Günther et al. (1999), die eine erhöhte Substitutionsrate bei chronisch aktiven Infektionen ergaben.

Die Sequenzdifferenz zum Referenzgenom des jeweiligen Genotyps lag bei den untersuchten Viruspopulationen bei 0,9 bis maximal 2%. Norder et al. (1994) beschrieben Sequenzdifferenzen verschiedener Genome des gleichen Genotyps von bis zu 4,2%. Gemäß diesen Vergleichszahlen behielten die untersuchten Viruspopulationen trotz statistisch erhöhter Mutationsrate ihre genotyp-spezifischen Sequenzen.

Allein die erhöhte Mutationsrate zwischen LTX und FCH-Auftreten läßt desweiteren ohne eine Betrachtung der Lokalisation der Mutationen keine Aussagen über deren mögliche funktionelle Auswirkungen auf das Virus und dessen Virulenz zu.

Auffällig war beispielsweise in einer Teilpopulation bei Patient #1 die Neuentstehung eines Stopkodons im S-Gen an Pos. 700, das unter 4.4.4.3 näher diskutiert wird.

Bei Patient #1 war desweiteren im beobachteten Zeitraum eine Häufung von Nukleotid-Austauschen im C-terminalen Abschnitt des Core-Gens zu beobachten. Dies deckt sich mit Untersuchungen von McMillan et al. (1996), die vermehrt Mutationen in präC/C in Verbindung mit der Precore-Stopmutante an Pos. 1896 (s.a. Kap. 4.4.1) fanden, die auch Patient #1 aufwies. In der Literatur finden sich weitere Beschreibungen über gehäufte Nukleotid-Austausche im C-Gen zeitgleich mit dem Auftreten der Precore-Mutante und Exazerbation der Hepatitis B (Bozkaya et al. 1996, Carman et al. 1995 und 1997), denen bislang aber kein signifikanter Einfluß auf das Krankheitsgeschehen nachgewiesen werden konnte.

Alle AS-Austausche im Core-Protein, die bei den drei Patienten zwischen LTX und FCH-Auftreten stattfanden, fallen in die von Günther et al. (1999) beschriebenen 36 "hot spots", typische Positionen im präC/C-Bereich für Veränderungen bei chronischen Krankheitsverläufen. Die meisten davon liegen in Epitopen für verschiedene Lymphozyten-Klassen (Cytotoxische und Helfer-T-Lymphozyten, B-Lymphozyten). Dies deutet auf einen Selektionsdruck durch die Immunantwort des Wirtes hin. Andererseits wurde dieser mögliche Selektionsdruck in den hier untersuchten Fällen durch die immunsuppressive Behandlung nach LTX abgeschwächt.

Da das Auftreten dieser "hot spot"-Mutationen in den drei untersuchten Patienten sehr uneinheitlich war (sechs AS-Austausche bei Pat. #1, einer bei #2, keiner bei #3), erscheint

eine direkte ursächliche Beziehung zur Entstehung von FCH unwahrscheinlich. Vielmehr ist die bei Patient #1 beobachtete Häufung von Mutationen im Core-Protein typisch für Veränderungen des HBV während der chronischen Phase der Infektion.

Es wurde keine gemeinsame neu aufgetretene Mutation in allen drei Patienten gefunden. Zwei Mutationen an der gleichen Position konnten in zwei Patienten nachgewiesen werden, eine davon in der hochkonservierten a-Determinante des HBsAg (siehe 4.4.4.2). Da sich dieser Austausch der AS 126 aber uneinheitlich entwickelte (Isoleucin/Threonin→Isoleucin (Referenzgenom: Isoleucin) versus Threonin→Threonin/Serin (Referenzgenom: Threonin)), erscheint eine pathogenetische Relevanz unwahrscheinlich.

Aus der vorliegenden Literatur ergibt sich kein Hinweis darauf, daß die insgesamt sechs inkompletten Nukleotidaustausche, die im beobachteten Zeitraum bei den drei Patienten uneinheitlich in verschiedenen Enhancer- oder Promotor-Regionen entstanden, eine gesteigerte Genexpression bewirken.

Zusammenfassend machen diese Ergebnisse es wenig wahrscheinlich, daß eine bestimmte de novo-Mutation im HBV-Genom nach LTX für die Entstehung von FCH verantwortlich ist.

4.4 Sequenzergebnisse und mögliche funktionelle Auswirkungen

4.4.1 Mutationen im präC-Bereich

In der Vergangenheit wurden Mutationen, die die Synthese von HBeAg verhindern, intensiv untersucht (Überblick bei Günther et al. 1999). Dazu zählen die Inaktivierung des Startkodons, Verschiebungen des Leserahmens durch Insertionen und Deletionen oder die Neuentstehung eines Stopkodons im präC-Gen.

Während die Translation des Precore-Proteins verhindert wird, bleibt die des Core-Proteins bei all diesen Mutationen intakt (Tong et al. 1991a). Die Replikations-Kompetenz scheint in vivo bei präC-defekten Genomen nicht behindert zu sein (Dienes et al. 1995, Ackrill et al. 1992), was auch in Transfektions-Experimenten festgestellt wurde (Loncarevic et al. 1990, Ulrich et al. 1990, Tong et al. 1991b). Ob die Virus-Replikation bei präC-defekten

Genomen sogar gesteigert wird, wird kontrovers diskutiert. So fanden beispielsweise Scaglioni et al. (1997) und Lamberts et al. (1993) erhöhte Replikationslevel bei Stopkodon-Mutationen in präC, bei Studien von Tong et al. (1992) sowie Hasegawa et al. (1994) waren diese normal.

Auch die klinische Relevanz der präC-defekten Mutanten ist unklar. Studien von Naoumov et al. 1992 und Brunetto et al. 1990 zeigten schwerere Hepatitis B-Verläufe bei Infektion mit Stopkodon-Mutante, sie wurde auch mit dem Auftreten von fulminanter Hepatitis B assoziiert (Liang et al. 1991, Ehata et al. 1993). Andere Autoren wie Karasawa et al. (1995), Takeda et al. (1990) und Tillmann et al. (1995) konnten einen solchen Zusammenhang nicht bestätigen. In einer Auswertung der vorliegenden Literatur stellten Günther et al. 1999 zumindest eine höhere Prävalenz präC-defekter HBV in fulminanten im Vergleich zu selbstlimitierenden Verläufen fest, wenn auch genaue Mechanismen in der Pathogenese noch unklar bleiben. Diese könnten z.B. aus dem Umstand entstehen, daß sowohl HBeAg-spezifische als auch HBcAg-spezifische T-Helfer-Lymphozyten durch zirkulierendes HBeAg dezimiert werden können (Milich et al. 1998). Durch Fehlen dieser Unterdrückung der Immunantwort bei präC-Defekt könnten fulminante Verläufe ausgelöst werden.

Die am häufigsten gefundene Mutation, die zu einer defekten HBeAg-Synthese führt, ist ein G→A-Austausch an Pos. 1896, der das vorletzte Kodon der präC-Region in ein TAG-Stopkodon umwandelt. Sie wird im Folgenden als Precore-Mutante bezeichnet.

Precore-Mutante und FCH

Die Precore-Mutante wurde schon mehrmals in Patienten mit FCH nachgewiesen (Fang et al. 1993, Chen et al. 1994, Angus et al. 1995, Booth et al. 1995, McIvor et al. 1994, McMillan et al. 1996) und mit deren Auftreten in Verbindung gebracht. Angus et al. (1995) und McMillan et al. (1996) postulierten, daß durch die Infektion mit der Mutante das Risiko für eine schwere Reinfektion nach LTX steigt. Naumann et al. (1997) konnten dies in einer größeren Patientengruppe, die mit anti-HBs-Immunglobulin-Prophylaxe behandelt wurde, nicht bestätigen.

In der vorliegenden Arbeit konnte die Precore-Mutante nur in Patient #1 nachgewiesen werden, und zwar zu beiden untersuchten Zeitpunkten in der kompletten Virus-Population. In den Patienten #2 und #3 wurde nur der Wildtyp gefunden. Hierzu ist aber eine

Besonderheit für den Genotyp A anzumerken, dem beide Genome angehören: die Pos. 1896 liegt innerhalb des RNA-Verpackungssignals, das eine Schleife ("stem-loop") bildet (Abb. 12). Durch die G→A-Mutation kann sich eine Basenpaarung mit dem T an Pos. 1858 ausbilden, die die Stabilität der Sekundärstruktur der Schleife erhöht (Lok et al. 1994). Viren vom Genotyp A haben aber typischerweise ein C an Pos. 1858, das mit dem Wildtyp-G bei 1896 eine Bindung eingehen kann. Die G→A-Mutation würde diese Basenpaarung zerstören und die Struktur instabiler machen. Somit verhindert das C an Pos. 1858 bei Pat. #2 und #3 die Entstehung der Precore-Mutante an Pos. 1896 (Li et al. 1993).

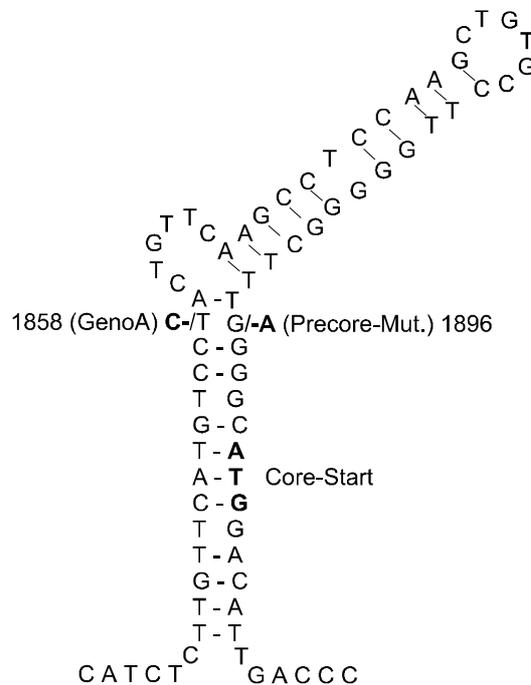


Abbildung 12: "Stem-loop"-Sekundärstruktur des RNA-Verpackungssignals. Gezeigt wird die Sequenz des Wildtyps (nach Galibert et al. 1979) vom Genotyp D, an Pos. 1858 und 1896 ist jeweils außen im Fettdruck die Variante bei Genotyp A bzw. Precore-Mutante; ebenfalls fett gedruckt das Startkodon des C-Gens.

Es bleibt aber festzuhalten, daß nach den Ergebnissen dieser Arbeit die Precore-Mutante keine zwingende Voraussetzung für die Entstehung von FCH ist.

Nebenbefundlich war überraschend, daß Patient #1 trotz alleinigen Nachweises der Precore-Mutante in der Direkt-Sequenzierung, die die HBeAg-Synthese verhindert, in serologischen Tests positiv für das Antigen war (s. Tab. 1). Allerdings ist diese

Kombination in der Literatur schon öfter beschrieben worden (z.B. Sterneck et al. 1996, Lok et al. 1994), und im Enten-Modell konnte gezeigt werden, daß weniger als 0,1% Wildtyp-Genome ausreichen, um einen Serumtest für HBeAg positiv werden zu lassen (Schneider et al. 1991). Eine so geringe Menge an HBeAg-sezernierenden Wildtyp-Genomen, daß sie unter der Nachweisgrenze durch die Direkt-Sequenzierung lagen, ist auch bei Pat. #1 die wahrscheinlichste Erklärung für dieses Phänomen. Daß ein PCR-Reaktionsartefakt zum Stopkodon führte ist unwahrscheinlich, da für beide untersuchten Zeiträume jeweils Plus- und Minus-Strang aus verschiedenen PCR-Reaktionen sequenziert wurden.

4.4.2 Mutationen im Core-Promotor

Der Basic Core Promotor (BCP) ist der essentielle Teil des Core-Promotors für eine suffiziente Transkription der prägenomischen und C-mRNA (Yuh et al. 1992). In diesem Bereich, der sich über die Nukleotide 1742-1850 erstreckt, wurden Mutationen in den HBV-Genomen aller drei Patienten gefunden.

In Patient #1 und #3 fand sich zu beiden untersuchten Zeitpunkten eine kombinierte Mutation bei Pos. 1762 A→T und 1764 G→A. Diese Konstellation ist häufig in Patienten mit chronischer Lebererkrankung anzutreffen und wird mit aktiver Hepatitis in Verbindung gebracht (Okamoto et al. 1994, Laskus et al. 1995). In Transfektionsstudien konnte gezeigt werden, daß sie den Transskriptionslevel der präC-mRNA und folglich die Sekretion von HBeAg um 50-70% senkt (Scaglioni et al. 1997, Moriyama et al. 1996, Buckwold et al. 1996, Günther et al. 1998). Darüber, ob durch diese Mutation die Virus-Replikation gesteigert wird, liegen unterschiedliche in vitro-Daten vor: Scaglioni et al. (1997) und Buckwold et al. (1996) fanden eine gesteigerte Virus-Replikation, Günther et al. (1998) nicht.

Somit ist derzeit unklar, ob die 1762/64 T/A-Mutation die Replikation des HBV steigert und darüber seine Pathogenität erhöht. Sicher scheint dagegen, daß diese Mutation neben der Precore-Mutante eine weitere Strategie des Virus ist, die HBeAg-Expression zu vermindern.

Bei Patient #2 fand sich vor LTX und während FCH eine 8 Nukleotid-Deletion an Pos. 1763-1770 im BCP. Diese war in keinem der 40 Referenzgenome vorbeschrieben, aber in ebenfalls immunsupprimierten Patienten mit schwerem Hepatitis-Verlauf (Günther et al.

1996 und Laskus 1994) gefunden worden. Durch diese Deletion entsteht eine Bindungsstelle für Hepatocyte Nuclear Factor (HNF)1. HNFs sind leberspezifische Transkriptionsfaktoren, ihre Bindungsstellen liegen typischerweise in Promotoren und führen zu leberspezifischer Genexpression. Auch hepatotrope Viren besitzen solche Bindungsstellen. Eine davon für HNF1 liegt typischerweise im präS1-Promotor des HBV. Mutationen, die HNF1-Bindungsstellen im Core Promotor entstehen lassen, führen zu einer deutlich gesteigerten Virus-Replikation (Pult et al. 1997, Baumert et al. 1996, Günther et al. 1996). Außerdem ist wie bei der 1762/64 T/A-Mutation die HBeAg-Synthese vermindert.

Die durch die oben beschriebene Deletion neu entstehende HNF1-Bindungsstelle im BCP hat nach Untersuchungen von Günther et al. (1996) eine mittelstarke Bindungsaffinität. Außerdem fand sich in einem Klon von Patient #2 eine TA-Insertion an Pos. 1765, durch die ebenfalls eine HNF1-Bindungsstelle entsteht, die eine höhere Bindungsaffinität als das "Original" im präS1-Promotor hat (Günther et al. 1996).

Weiterhin wies Patient #2 in einer Virus-Teilpopulation vor LTX die kombinierte Mutation 1766 C→T und 1768 T→A auf, durch die zwei sich überschneidende HNF1-Bindungsstellen von geringer Affinität entstehen (Günther et al. 1996). Baumert et al. (1998)(110) stellten bei dieser Mutationskombination eine 15-fach erhöhte Core-Protein-Synthese und Virus-Replikation fest. Von den 40 Referenzgenomen wies nur eines diese Veränderung auf, das aus einem Patienten mit fulminanter Hepatitis stammte (Hasegawa et al. 1994). Für die alleinige Mutation 1766 C→T, die bei Pat. #2 und #3, aber in keinem Referenzgenom auftrat, sind funktionelle Auswirkungen bislang nicht beschrieben.

Da ihr Auftreten vorwiegend bei schweren Krankheitsverläufen mit Leberversagen unter Immunsuppression beschrieben wurde, kann vermutet werden, daß neue HNF1-Bindungsstellen im BCP über eine gesteigerte Replikation die Pathogenität des HBV erhöhen.

Bei Patient #1 fand sich vor LTX in einer Teilpopulation ein C→T-Austausch an Pos. 1653. Dieser liegt in der α -box, die durch Bindung von Transkriptionsfaktoren den Core Promotor aktivieren kann, und wurde meist in Verbindung mit der 1762/64 T/A-Mutation (Kurosaki et al. 1996) und bei Hepatitis-Exazerbationen (Asahina et al. 1996) sowie fulminanter Hepatitis (Kaneko et al. 1995) gefunden. Günther et al. (1998) stellten

allerdings in Transfektions-Studien keinen Einfluß dieser Mutationskombination auf die Aktivität des Core Promotors fest.

Die Mutationen im BCP beeinflussen teilweise auch die Struktur des überlappenden X-Gens. So führt die bei Patient #2 gefundene Deletion der Nukleotide 1763-1770 zu einem verkürzten X-Protein, dem eine Domäne fehlt, die nach Arai et al. (1992) essentiell für die Transaktivierungs-Aktivität des X-Proteins *in vitro* ist. Da die Deletion aber nur in einem Teil der Viruspopulation vorkommt, geht diese Aktivität nicht vollständig verloren. Desweiteren wurde in der Vergangenheit *in vitro* gezeigt, daß das X-Protein für die Virus-Replikation entbehrlich ist (Blum et al. 1992). Somit scheinen die gefundenen Mutationen im X-Gen keinen entscheidenden Einfluß auf replikative oder pathogenetische Eigenschaften des Virus zu haben.

Es ist auffällig, daß in allen drei an FCH erkrankten Patienten HBV-Genome mit Mutationen im Core-Promotor gefunden wurden, die *in vitro* die HBeAg-Synthese deutlich vermindern und die Virus-Replikation erhöhen. Diese Mutationen waren die einzigen mit vorhersagbaren funktionellen Auswirkungen, die alle untersuchten Genome aufwiesen und sie gleichzeitig vom Wildtyp unterschieden. Daher läßt sich spekulieren, daß diese Mutationen an der Pathogenese von FCH beteiligt sind. Dies gilt insbesondere für die Funde bei Patient #2, wo neue, zum Teil hoch affine HNF1-Bindungsstellen im BCP entstanden, die nach derzeitigem Wissen als effizienteste Strategie, die HBV-Replikation zu steigern, betrachtet werden können (Günther 1999). Die gesteigerte Replikation könnte zur Akkumulation von Core-Protein im Hepatozyten führen, der in Hepatoblastom-Zellen ein zytopathischer Effekt nachgewiesen werden konnte (Roingard et al. 1990).

4.4.3 Mutationen im C-Gen/ Core-Protein

Die im Vergleich mit vorbeschriebenen Genomen gefundenen AS-Austausche im Core-Protein traten überwiegend bei Pat. #1 (7) und #3 (4) auf und befanden sich mit einer Ausnahme in den schon oben erwähnten "hot spot"-Positionen. Diese sparen hochkonservierte Positionen wie z.B. die Cysteine an Pos. 48, 61, 107 und 183 bzw. die AS 113-143 aus, die für die Stabilität des Core-Proteins wichtig sind (Zhou und Standring 1992 bzw. König et al. 1998), oder das für dessen Zusammenbau ("assembly") essentielle

Prolin an Pos. 138 (Metzger und Bringas 1998). Ein nach Auswertungen von Günther et al. 1999 auffällig häufig bei Patienten mit chronisch aktiver sowie fulminanter Hepatitis B beschriebener AS-Austausch Serin→Prolin an Pos. 181 konnte in keinem der hier untersuchten Genome festgestellt werden. Dagegen wies Pat. #1 prä-LTX einen AS-Austausch Arginin→Cystein an Pos. 151 in einem Arginin-reichen "nuclear localization signal" auf, der sich unter FCH wieder inkomplett zurückbildete. Eckhardt et al. (1991) zeigten in vitro, daß ein Arginin-Austausch an dieser Position das Signal, das den Kerntransport des HBcAg steuert, inaktivieren kann. Auch wenn die gleiche Untersuchung eine fehlende nukleäre Akkumulation des HBcAg nur bei Wegfall eines weiteren "nuclear localization signal" zeigte, könnte diese Mutation einen Beitrag zu einer möglichen intrazellulären Verschiebung und Akkumulation des Core-Proteins leisten.

Ein überzeugender Beweis für einen Zusammenhang zwischen der - auch in dieser Untersuchung festgestellten - Häufung von AS-Austauschen im C-Gen und dem Krankheitsverlauf konnte bislang nicht erbracht werden.

4.4.4 Mutationen im präS/S-Bereich

4.4.4.1 Deletionen in präS1

Die auffälligsten Veränderungen in diesem Bereich fanden sich mit zwei verschiedenen "in-frame" Deletionen im präS1-Bereich bei Patient #1. Eine Deletion war vor LTX und während FCH jeweils in einem Teil der Viruspopulation nachweisbar. Sie umspannte die 18 Nukleotide 2846-2863, wodurch das erste ATG-Startkodon von präS1 fehlte. Elf Kodons weiter in 3'-Richtung ("downstream") folgt ein zweites ATG, das vorhersagbar die Translationsinitiation übernimmt, wodurch ein um elf Aminosäuren verkürztes präS1-Protein entsteht.

Die zweite, 39 Nukleotide lange Deletion befand sich am C-terminalen Ende des präS1-Bereichs an Pos. 3148-3186. Sie ließ sich nur während FCH eindeutig nachweisen.

Verkürzte präS1-Proteine, wie sie durch die zuerst beschriebene Deletion entstehen, werden von Viren vom Genotyp D normalerweise exprimiert, da sie in dieser Region eine 33 Nukleotid-Deletion aufweisen. McMillan et al. (1996) stellten eine signifikante Beziehung zwischen dem Genotyp D (mit verkürztem präS1-Protein) und schwerer

Reinfektion bzw. FCH nach LTX fest. Dabei ist offen, ob der Genotyp D per se oder die Deletion in präS1 eine pathogene Relevanz hat.

Deletionen in der präS1-Region wurden häufig in chronischen Virusträgern gefunden (Gerken et al. 1991, Nakajima et al. 1994 u.a.), insbesondere auch bei Patienten, die eine HBV-Reinfektion nach LTX erlitten (Trautwein et al. 1996). Dabei konnte für Deletionen, die wie die zweite hier beschriebene zwischen der Mitte und dem C-Terminus von präS1 liegen, eine stark reduzierte Aktivität des präS2/S-Promotors (SP II) und reduzierte HBsAg-Level nachgewiesen werden (Raney et al. 1991, Xu und Yen 1996). Darüberhinaus stellten Xu und Yen (1996) gegenüber dem Wildtyp gesteigerte Mengen präS1-Transskripte fest, die über größere Mengen insuffizient sekretierten large-HBsAg zu den sog. Milchglas-Hepatozyten führen können.

Bei vorbeschriebenen Deletionen wurde teilweise auch die sogenannte CCAAT-box im S-Promotor II (SP II) entfernt. Die CCAAT-Box fördert die Transkription des S-Promotors und unterdrückt die des präS1-Promotors, was zu starker Expression von small-HBsAg und geringer von large-HBsAg führt (Lu et al. 1995). Ein Verlust der CCAAT-box führt zu umgekehrten Verhältnissen mit einer Überexpression von präS1-Protein. Wie von Chisari et al. (1987) im transgenen Mäuse-Modell gezeigt, kann die Akkumulation der großen Proteine, die nur ineffizient sekretiert werden können, zytotoxisch wirken. Ein Patient mit FCH wurde beschrieben, bei dem neben präS-Deletionen eine Mutation in der CCAAT-box gefunden wurde (Trautwein et al. 1996). Funktionelle in vitro-Untersuchungen dieses HBV-Genoms durch Bock et al. 1997 zeigten nicht nur ein wie oben beschriebenes Mißverhältnis und intrazelluläre Retention von S-Proteinen, sondern auch eine nukleäre Akkumulation von Core-Protein und HBV-DNA, für die ebenfalls ein zytopathischer Effekt beschrieben wurde (Roingard et al. 1990, Lenhoff et al. 1994).

Da die 39 Nukleotid-Deletion in Patient #1 zwar nicht direkt die CCAAT-box betraf, aber in unmittelbarer Nähe von dieser im SP II lag (s. Abb. 10), wäre auch hier die Entstehung eines zytopathischen Effektes über eine Protein-Akkumulation, insbesondere bei gesteigerter Replikation unter Immunsuppression, und letztendlich die Entwicklung einer FCH denkbar. Interessanterweise wurde diese Deletion nur in Klonen während der FCH gefunden und konnte vor LTX nicht eindeutig nachgewiesen werden.

Die Cysteine an den AS-Positionen 48, 65 und 69 im HBsAg, die nach Untersuchungen von Mangold und Streck (1993) für die Sekretion von HBsAg essentiell sind, waren hingegen in allen untersuchten Genomen intakt.

4.4.4.2 Mutationen in der a-Determinante

Die a-Determinante ist eine hochkonservierte Region zwischen den AS 121-149 im HBsAg, die das Ziel für Virus-neutralisierende Antikörper darstellt. Sie ist auch in Impfstoffen für die aktive Immunisierung gegen Hepatitis B enthalten. Sogenannte "immune escape"-Mutanten, bei denen es trotz einer Immunisierung zu einer HBV-Infektion kommt, sind durch teilweise Deletion der a-Determinante (Carman et al. 1990) oder Mutationen insbesondere im Kodon 145 (Waters et al. 1992) gekennzeichnet. Mutationen in der a-Determinante wurden bei chronisch-aktiven Hepatitiden beschrieben (Kato et al. 1996, Asahina et al. 1996) und ihre Häufung korreliert zeitlich mit der Dauer einer anti-HBs-Hyperimmunglobulin-Prophylaxe (HBIG) (Ghany et al. 1998, Santantonio et al. 1999). So wird vermutet, daß sie unter Selektionsdruck durch HBIG entstehen und eine Rolle bei der HBV-Reinfektion nach LTX spielen.

In Verbindung mit FCH wurden bei drei Patienten, die nach LTX mit HBIG-Prophylaxe behandelt wurden, Mutationen in Kodon 145 der a-Determinante beobachtet (Hawkins et al. 1996).

Bei den hier untersuchten Genomen wurden ein kompletter und vier inkomplette AS-Austausche in der a-Determinante gefunden, die zwischen LTX und FCH unter HBIG-Gabe neu auftraten. Darunter war ein Austausch an der gleichen AS-Position 126 bei Pat. #1 und #2, der sich aber uneinheitlich entwickelte (Isoleucin/Threonin→Isoleucin bzw. Threonin→Threonin/Serin). Mutationen an dieser Position finden gehäuft bei chronischer Hepatitis B und seltener nach LTX statt (Günther et al. 1999). Die uneinheitliche und jeweils nur in einer Teilpopulation auftretende Mutation und ihr häufiges Auftreten bei chronischen Verläufen machen eine direkte Relevanz für die Entstehung der FCH unwahrscheinlich.

Zusammenfassend fanden in der hoch konservierten a-Determinante unter HBIG-Gabe bei jedem Patienten ein bzw. zwei Mutationen statt, die eine Rolle bei der Reinfektion nach LTX gespielt haben könnten. Andererseits wurden typische immune escape-Mutanten durch Deletionen der a-Determinante oder Mutation im Kodon 145 nicht gefunden.

4.4.4.3 Stopkodon im S-Gen

Bei Patient #1 entstand nach LTX in einer Virus-Teilpopulation durch eine G→A-Mutation an Pos. 700 ein Stopkodon bei AS 182 des S-Gens. Hierdurch werden alle drei verschiedenen S-Proteine (large, middle, small) um 45 Aminosäuren gekürzt. Diese Mutation ist in der Literatur nicht vorbeschrieben.

Die betroffene Region ist bislang insbesondere im Rahmen von Forschungen über eine vermutete Hepatokarzinogenese des HBV untersucht worden. Bei HBV-assoziierten hepatozellulären Karzinomen ist vielfach chromosomal integrierte HBV-DNA nachgewiesen worden (Beasley et al. 1988). Darunter fanden sich 3'-terminal verkürzte präS2/S-Gene, für die eine transkriptionelle Transaktivator-Funktion nachgewiesen wurde, welche für die Hepatokarzinogenese relevant sein könnte (Kekulé et al. 1990). Nähere Untersuchungen ergaben, daß sich die Transaktivierungs-Aktivität der verkürzten middle-S-Proteine (MHBs¹) nur entwickelt, wenn ein bestimmter Teil des S-Gens zwischen den Nukleotiden 221 und 573 deletiert ist bzw. mindestens die letzten 87 Aminosäuren fehlen (Lauer et al. 1992, Natoli et al. 1992). Kleinere 3'-Deletionen zeigten keine Aktivität. Bis zu 76 AS lange MHBs¹ akkumulierten im Endoplasmatischen Retikulum (ER) (Hildt et al. 1993). Nach diesen Erkenntnissen ist für das in diesem Fall um 45 AS gekürzte HBsAg keine Transaktivierungs-Aktivität oder Retention im ER zu erwarten.

Caselmann et al. (1997) beschrieben für ein ab AS-Position 167 verkürztes M-HBs in vitro eine transaktivierende Wirkung auf den Enhancer I (ENH I). Der ENH I wirkt aktivierend auf alle vier viralen Promotoren (Hu und Siddiqui 1991). Ob das bei Pat. #1 bei AS 182 gekürzte, also 15 AS längere HBsAg eine ähnliche Wirkung entfaltet und so die Transkriptionsrate aller oder einzelner Genprodukte erhöhen kann, ist spekulativ. Es bleibt weiterhin zu bedenken, daß alle oben beschriebenen Wirkungen unter in vitro-Bedingungen festgestellt wurden.

Es ist davon auszugehen, daß trotz dieses Defektes im S-Gen intakte Viruspartikel entstehen, da er nur in einer Teilpopulation vorlag und Okamoto et al. (1993) in vitro zeigen konnten, daß defekte Genprodukte durch trans-Komplementation von anderen, intakten HBV-Genomen ersetzt werden.

4.4.5 Mutationen im P-Protein

Durch die beiden in Kap. 4.4.4.1 beschriebenen Deletionen im präS1-Bereich entstehen auch im P-Protein "in-frame"-Deletionen, nämlich der Aminosäuren 181-186 bzw. 282-294.

In Zellkultur getestete präS1-Deletions-Varianten stellten sich als replikations-kompetent heraus (Xu und Yen 1996, Pult et al. 1997, Bock et al. 1997), woraus geschlossen werden kann, daß sie funktionstüchtiges P-Protein exprimieren. Dies ist dadurch zu erklären, daß die Deletionen in der "spacer"-Region des P-Gens liegen, die nach Radziwill und Schaller (1990) für seine Funktion entbehrlich ist. Von ihrer Lokalisation her dürften auch die hier gefundenen Deletionen keinen entscheidenden Einfluß auf die Funktionsfähigkeit der Polymerase haben.

Lin et al. (2001) beschrieben einen einzelnen Aminosäuren-Austausch an AS-Pos. 652 Prolin→Serin, der die Aktivität der Polymerase und damit die Replikationseffizienz deutlich beeinträchtigte. Die Virusgenome aller drei Patienten zeigten zu beiden untersuchten Zeitpunkten keine Mutation an dieser Stelle.

In allen untersuchten Proben fanden sich im Sequenzvergleich sowohl prä-LTX - FCH als auch mit den Referenzgenomen über das P-Gen verteilte Punkt-Mutationen, die z.T. auch zu AS-Austauschen im P-Protein - ohne charakteristische Häufung in einem Bereich - führten. Für die einzelnen Mutationen war nach der vorliegenden Literatur keine signifikante Beeinflussung auf die Polymerase-Funktion ableitbar (Günther et al. 1999).

4.5 Abschließender Vergleich mit bisherigen Sequenzanalysen bei FCH und Ausblick

Es gibt bislang nur wenige HBV-Sequenz-Untersuchungen zu fibrosierender cholestatischer Hepatitis.

Die meisten beschränkten sich auf die Precore-Region, wo häufig die Precore-Mutante an Pos.1896 gefunden wurde und wiederholt mit FCH in Verbindung gebracht wurde (Fang et al. 1993, Chen et al. 1994, Angus et al. 1995, Booth et al. 1995, McIvor et al. 1994). In dieser Untersuchung wurde in drei Patienten nur einmal (Pat. #1) die Precore-Mutante gefunden. In Übereinstimmung mit Daten von Ackrill et al. (1992) scheint sie also nicht

zwingend mit der Entstehung von FCH zusammen zu hängen. Allerdings war das Auftreten einer Precore-Mutante für die beiden anderen Patienten aufgrund ihrer Genotyp A-spezifischen Sequenzunterschiede im stem-loop (Kap. 4.4.1) sehr unwahrscheinlich.

Wie schon von McMillan et al. (1996) beschrieben, war die Precore-Mutante bei Patient #1 mit vermehrten Mutationen im C-Gen assoziiert.

Es wurde nur eine Mutation in den AS 84-101 des Core-Gens gefunden. Ehata et al. (1992) hatten über eine Korrelation zwischen Veränderungen in dieser Region und schweren Verläufen chronischer Hepatitis B berichtet.

Eine Deletion im C-Gen, wie sie in immunsupprimierten sowie -kompetenten Patienten mit einem schweren Krankheitsverlauf assoziiert zu sein scheint (Günther et al. 1996, Wakita et al. 1991), wurde in keiner der untersuchten Virus-Populationen gefunden.

McMillan et al. (1996) stellte FCH gehäuft bei Infektion mit dem HBV-Genotyp D fest. Die Viruspopulationen aus dieser Untersuchung gehörten aber Genotyp A (Pat. # 2 u. 3) und Genotyp C (#1) an. Von daher scheint das Auftreten einer FCH nicht Genotyp-gebunden zu sein. Allerdings fiel auf, daß sich bei Patient #1 eine Deletion des ersten präS1-Startkodons zeigte, wodurch ein um elf Aminosäuren gekürztes large-HBsAg entsteht, wie es für Viren vom Genotyp D typisch ist. Ob durch diese Veränderung eventuell eine zytotoxisch wirkende Akkumulation von large-HBsAg gefördert wird, ist unklar.

Trautwein et al. (1996) fanden bei einem Patienten mit FCH nach LTX eine Mutation in der CCAAT-box des S-Promotors, die zu einem Mißverhältnis von Gen-Produkten und deren zellulärer Retention führte (Kap. 4.4.4.1). Die CCAAT-box aller hier untersuchten HBV-Genome war intakt. Allerdings wurde bei Patient #1 eine Deletion in direkter Umgebung im S-Promotor während FCH gefunden. Ob hierdurch eine ähnliche Wirkung auf die S-Gen-Expression entsteht, müßte durch Zellkultur-Experimente geklärt werden.

Hawkins et al. (1996) stellten bei drei an FCH erkrankten Patienten, die eine anti-HBs-Immunglobulin-Prophylaxe erhalten hatten, eine Mutation des Kodon 145 in der immunogenen a-Determinante (s. 4.4.4.2) fest. Diese konnte bei den hier untersuchten Genomen nicht festgestellt werden.

Die erhobenen Daten, insbesondere der direkte Vergleich der Sequenzen vor und nach Auftreten einer FCH, deuten nicht darauf hin, daß eine spezifische Neumutation direkt die

Erkrankung auslöst. Dagegen kann spekuliert werden, daß die FCH über noch unbekannte Mechanismen durch das Zusammenspiel verschiedener, im einzelnen unspezifischer Neumutationen entsteht.

Wahrscheinlicher erscheint es, daß schon vor LTX im chronischen Krankheitsverlauf entstandene Mutationen unter den Bedingungen der Immunsuppression zu einer veränderten Pathogenität führen und so zum Entstehen einer fibrosierenden cholestatischen Hepatitis beitragen. Diesbezüglich auffällig waren in allen untersuchten Genomen gefundene Veränderungen, die zu einer verminderten bzw. aufgehobenen HBeAg-Synthese führen wie die Precore-Stopmutante (Pat. #1), Deletion (Pat. #2) und charakteristische Mutationen im BCP (Pat. #1 und 3), die z.T. zu neuen Bindungsstellen für den replikationssteigernden Transskriptionsfaktor HNF 1 führen. Weiterhin bedeutsam waren Deletionen im präS- und SP II-Bereich sowie ein neubeschriebenes Stopcodon im S-Gen (Pat. #1), die Veränderungen im Mengenverhältnis und der Sekretion der verschiedenen S-Protein-Klassen zur Folge haben könnten.

Diese Veränderungen könnten über eine intrazelluläre Akkumulation der entsprechenden Proteine zur vielfach in Bezug auf die Pathogenese der FCH angenommenen zytotoxischen Wirkung des Hepatitis B Virus unter Immunsuppression führen.

Zur Festigung dieser Annahmen sind weitere Sequenzanalysen mit Fokussierung auf die wohl entscheidenden Regionen präC/C und präS/S nötig sowie insbesondere geeignete Zellkultur-Experimente zum entsprechenden Nachweis der angenommenen Antigen-Akkumulation. Ebenfalls sinnvoll wäre der Sequenzvergleich mit Viruspopulationen, die aus Patienten mit gleicher Vorgeschichte (chronische Hepatitis B → LTX → Immunsuppression) stammen, die aber nicht an FCH erkrankten.

Diese Untersuchungen könnten weitere wertvolle Erkenntnisse im Hinblick auf die Entstehung der fibrosierenden cholestatischen Hepatitis sowie eine mögliche neue pathogenetische Variante des Hepatitis B Virus erbringen.

5 Zusammenfassung

Trotz der üblichen Prophylaxe mit Anti-HBs-Hyperimmunglobulin entwickeln viele Patienten, die aufgrund einer Hepatitis B transplantiert werden, nach Lebertransplantation (LTX) eine Reinfektion mit dem Hepatitis B Virus (HBV). Insbesondere wenn keine antivirale Therapie unmittelbar erfolgt, kann eine besonders aggressive Verlaufsform entstehen, die sogenannte fibrosierende cholestatische Hepatitis (FCH). Histologisch ist diese Erkrankung durch eine relativ geringe Entzündungsaktivität, aber starke Akkumulation viraler Proteine gekennzeichnet. Es wird daher vermutet, daß bei dieser Verlaufsform der Hepatitis B der zytopathische Effekt der intrazellulären viralen Proteine hauptverantwortlich für die Zerstörung des Leberparenchyms ist. Somit ist denkbar, daß bestimmte Virusmutanten durch Überexpression oder defekte Sekretion von Virusproteinen die Pathogenese der FCH bedingen.

Ziel dieser Arbeit war es, diese Hypothese zu überprüfen, indem die Viruspopulation von Patienten mit chronischer Hepatitis B vor LTX mit der derselben Patienten nach LTX unter dem klinischen Bild der FCH miteinander verglichen wurden.

Methodisch wurden dazu erstmals Virusgenome, die aus drei nach LTX an FCH erkrankten Patienten stammten, zu zwei verschiedenen Zeitpunkten in ihrer vollen Länge auf Mutationen analysiert. Dazu wurden die HBV-Populationen aus dem Serum der Patienten mittels einer speziellen Gesamtgenom-PCR amplifiziert und direkt sequenziert. Zusätzlich wurden einige HBV-Genome kloniert und anschließend sequenziert.

Es zeigte sich trotz einer statistisch erhöhten Mutationsrate eine über 99%ige Homologie der HBV-Genome, die vor LTX und während FCH im Serum der Patienten vorkamen. Unter den nach LTX während der FCH neu aufgetretenen Mutationen fand sich keine, die bei allen drei Patienten gemeinsam vorlag. Weiterhin fand sich auch keine gemeinsame Genomregion, in der sich präferenziell neue Mutationen entwickelten. Diese Befunde machen es sehr unwahrscheinlich, daß bestimmte Mutanten, die nach LTX selektioniert wurden, für die Pathogenese der FCH verantwortlich sind.

Da es jedoch auch denkbar ist, daß bestimmte bereits vor LTX vorliegende Virusmutanten durch ihre besonderen biologischen Eigenschaften unter Immunsuppression eine FCH bedingen, wurden die Sequenzen der HBV-Populationen auch sehr genau miteinander sowie mit 40 bislang veröffentlichten HBV-Genomen verglichen. Auffällig war hierbei, daß alle drei Patienten mit Viruspopulationen infiziert waren, die strukturelle

Veränderungen aufwiesen, welche die HBeAg-Synthese vermindern bzw. die Virus-Replikation steigern könnten, wie Precore-Stopmutante bzw. Mutationen und Deletionen im Bereich des Basic Core Promoter. In einem Fall zeigten sich desweiteren mit Deletionen und einem neubeschriebenen Stopkodon grobe Veränderungen im präS/S-Gen.

Zusammenfassend zeigen diese Daten, daß nicht charakteristische Neumutationen nach LTX zum Auftreten der FCH führen, sondern schon vor LTX im chronischen Krankheitsverlauf entstandene Mutationen unter Immunsuppression eine neue Pathogenität entfalten. Ob dabei eine durch bestimmte Mutationen ausgelöste Überexpression viraler Antigene und deren defekte Ausschleusung zur vermuteten direkten zytotoxischen Wirkung des HBV führt, muß in entsprechenden Zellkultur-Experimenten weiter geklärt werden.

6 Literaturverzeichnis

- Ackrill AM, Naoumov NV, Eddleston AL, Williams R (1992) Comparison of pre-core/core hepatitis B virus region in liver tissue and serum from patients with chronic hepatitis B infection. *J Hepatol* 16: 224-227
- Ackrill AM, Naoumov NV, Lau JYN, O'Grady J, Portmann B, Eddleston ALWF, Williams R (1992b) Molecular changes in hepatitis b virus core gene in liver graft recipients and association with fibrosing cholestatic hepatitis. *Hepatology* 16, No. 2, Pt. 2, 49A
- Al Faraidy K, Yoshida EM, Davis JE, Vartanian RK, Anderson FH, Steinbrecher UP (1997) Alteration of the dismal natural history of fibrosing cholestatic hepatitis secondary to hepatitis B virus with the use of lamivudine. *Transplantation* 64: 926-928
- Angus PW, Locarnini SA, McCaughan GW, Jones RM, McMillan JS, Bowden DS (1995) Hepatitis B virus precore mutant infection is associated with severe recurrent disease after liver transplantation. *Hepatology* 21: 14-8
- Arbuthnot P, Kew M (2001) Hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma. *Int J Exp Pathol* 82: 77-100
- Arii M, Takada S, Koike K (1992) Identification of three essential regions of hepatitis B virus X protein for trans-activation function. *Oncogene* 7: 397-403
- Asahina Y, Enomoto N, Ogura Y, Kurosaki M, Sakuma I, Izumi N, Marumo F, Sato C (1996) Sequential changes in full-length genomes of hepatitis B virus accompanying acute exacerbation of chronic hepatitis B. *J Hepatol* 25: 787-94
- Bahn A, Gerner P, Martine U, Bortolotti F, Wirth S (1997) Detection of different viral strains of hepatitis B virus in chronically infected children after seroconversion from HBsAg to anti-HBs indicating viral persistence. *J Hepatol* 27: 973-8
- Bartenschlager 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 TF, Rogers SA, Hasegawa K, Liang TJ (1996) Two core promotor mutations identified in a hepatitis B virus strain associated with fulminant hepatitis result in enhanced viral replication. *J Clin Invest* 98 : 2268-2276

- Baumert TF, Marrone A, Vergalla J, Liang TJ (1998) Naturally occurring mutations define a novel function of the hepatitis B virus core promoter in core protein expression. *J Virol* 72: 6785-95
- Beasley RP (1988) Hepatitis B virus. The major etiology of hepatocellular carcinoma. *Cancer* 61: 1942-56
- Benner KG, Lee RG, Keeffe EB, Lopez RR, Sasaki AW, Pinson CW (1992) Fibrosing cytolytic liver failure secondary to recurrent hepatitis B after liver transplantation. *Gastroenterology* 103: 1307-12
- Bertoletti A, Ferrari C, Fiaccadori F, Penna A, Margolskee R, Schlicht HJ, Fowler P, Guilhot S, Chisari FV (1991) HLA class I-restricted human cytotoxic T cells recognize endogenously synthesized hepatitis B virus nucleocapsid antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 10445-9
- Blum HE, Zhang ZS, Galun E, von Weizsacker F, Garner B, Liang TJ, Wands JR (1992) Hepatitis B virus X protein is not central to the viral life cycle in vitro. *J Virol* 66: 1223-7
- Bock CT, Tillmann HL, Maschek HJ, Manns MP, Trautwein C (1997) A preS mutation isolated from a patient with chronic hepatitis B infection leads to virus retention and misassembly. *Gastroenterology* 113: 1976-1982
- Boker KH, Manns MP (1993) Inhibition of the progression of chronic liver diseases. *Internist (Berl)* 34: 316-25
- Bonino F, Brunetto MR (1994) Possible immunopathogenesis for fibrosing cholestatic hepatitis. *Gastroenterology* 106: 822-3
- Booth JC, Goldin RD, Brown JL, Karayiannis P, Thomas HC (1995) Fibrosing cholestatic hepatitis in a renal transplant recipient associated with the hepatitis B virus precore mutant. *J Hepatol* 22: 500-3
- Bozkaya H, Ayola B, Lok AS (1996) High rate of mutations in the hepatitis B core gene during the immune clearance phase of chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology* 24: 32-37
- Brind AM, Bennett MK, Bassendine MF (1998) Nucleoside analogue therapy in fibrosing cholestatic hepatitis--a case report in an HBsAg positive renal transplant recipient. *Liver* 18: 134-9

- Brunetto MR, Stemler M, Bonino F, Schodel F, Oliveri F, Rizzetto M, Verme G, Will H (1990) A new hepatitis B virus strain in patients with severe anti-HBe positive chronic hepatitis B. *J Hepatol* 10: 258-261
- Buckwold VE, Xu Z, Chen M, Yen TS, Ou JH (1996) Effects of a naturally occurring mutation in the hepatitis B virus basal core promoter on precore gene expression and viral replication. *J Virol* 70: 5845-5851
- Carman WF, Zanetti AR, Karayiannis P, Waters J, Manzillo G, Tanzi E, Zuckerman AJ, Thomas HC (1990) Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus. *Lancet* 336: 325-329
- Carman WF, Thursz M, Hadziyannis S, McIntyre G, Colman K, Gioustoz A, Fattovich G, Alberti A, Thomas HC (1995) Hepatitis B e antigen negative chronic active hepatitis: hepatitis B virus core mutations occur predominantly in known antigenic determinants. *J Viral Hepat* 2: 77-84
- Carman WF, Boner W, Fattovich G, Colman K, Dornan ES, Thursz M, Hadziyannis S (1997) Hepatitis B virus core protein mutations are concentrated in B cell epitopes in progressive disease and in T helper cell epitopes during clinical remission. *J Infect Dis* 175: 1093-1100
- Casemann WH, Renner M, Schluter V, Hofschneider PH, Koshy R, Meyer M (1997) The hepatitis B virus MHBst167 protein is a pleiotropic transactivator mediating its effect via ubiquitous cellular transcription factors. *J Gen Virol* 78: 1487-1495
- Chan TM, Wu PC, Li FK, Lai CL, Cheng IK, Lai KN (1998) Treatment of fibrosing cholestatic hepatitis with lamivudine. *Gastroenterology* 115: 177-81
- Chen CH, Chen PJ, Chu JS, Yeh KH, Lai MY, Chen DS (1994) Fibrosing cholestatic hepatitis in a hepatitis B surface antigen carrier after renal transplantation. *Gastroenterology* 107: 1514-8
- Chisari FV, Filippi P, Buras J, McLachlan A, Popper H, Pinkert CA, Palmiter RD, Brinster RL (1987) Structural and pathological effects of synthesis of hepatitis B virus large envelope polypeptide in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 6909-13
- Dane DS, Cameron CH, Briggs M (1970) Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet* 1: 695-8
- Davies SE, Portmann BC, O'Grady JG, Aldis PM, Chaggar K, Alexander GJ, Williams R (1991) Hepatic histological findings after transplantation for chronic hepatitis B

- virus infection, including a unique pattern of fibrosing cholestatic hepatitis. *Hepatology* 13: 150-7
- Dienes HP, Gerken G, Goergen B, Heermann K, Gerlich W, Meyer zum Buschenfelde KH (1995) Analysis of the precore DNA sequence and detection of precore antigen in liver specimens from patients with anti-hepatitis B e-positive chronic hepatitis. *Hepatology* 21: 1-7
- Eckhardt SG, Milich DR, McLachlan A (1991) Hepatitis B virus core antigen has two nuclear localization sequences in the arginine-rich carboxyl terminus. *J Virol* 65: 575-82
- 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: 332-338
- Ehata T, Omata M, Chuang WL, Yokosuka O, Ito Y, Hosoda K, Ohto M (1993) Mutations in core nucleotide sequence of hepatitis B virus correlate with fulminant and severe hepatitis. *J Clin Invest* 91: 1206-1213
- Fang JW, Tung FY, Davis GL, Dolson DJ, Van Thiel DH, Lau JY (1993) Fibrosing cholestatic hepatitis in a transplant recipient with hepatitis B virus precore mutant. *Gastroenterology* 105: 901-4
- Fang JW, Wright TL, Lau JY (1993) Fibrosing cholestatic hepatitis in patient with HIV and hepatitis B. *Lancet* 342: 1175
- Fujiyama A, Miyanohara A, Nozaki C, Yoneyama T, Ohtomo N, Matsubara K (1983) Cloning and structural analyses of hepatitis B virus DNAs, subtype adr.. *Nucleic Acids Res* 11: 4601-4610
- Galibert F, Mandart E, Fitoussi F, Tiollais P, Charnay P (1979) Nucleotide sequence of the hepatitis B virus genome (subtype ayw) cloned in *E. coli*. *Nature* 281:646-50
- Ganem D (1996) Hepadnaviridae and Their Replication. In: Fields B, Knipe D et al.(eds) *Fields Virology*, Ed 3rd, pp 2703-2737. Philadelphia: Lippincott-Raven
- Gerken G, Kremsdorf D, Capel F, Petit MA, Dauguet C, Manns MP, Meyer zum Buschenfelde KH, Brechot C (1991) Hepatitis B defective virus with rearrangements in the preS gene during chronic HBV infection. *Virology* 183: 555-565
- Gerken G, Goergen B, Meyer zum Büschenfelde K-H (1994) Virushepatitis und B-Virusmutanten. *Dt Ärztebl* 91, Heft 47: B2408-13

- Ghany MG, Ayola B, Villamil FG, Gish RG, Rojter S, Vierling JM, Lok AS (1998) Hepatitis B virus S mutants in liver transplant recipients who were reinfected despite hepatitis B immune globulin prophylaxis. *Hepatology* 27: 213-222
- Günther S, Li B-C, Miska S, Krüger DH, Meisel H, Will H (1995) A novel method for efficient amplification of whole hepatitis B virus genomes permits rapid functional analysis and reveals deletion mutants in immunosuppressed patients. *J Virol* 69: 5437-5444
- Günther S, Baginski S, Kissel H, Reinke P, Kruger DH, Will H, Meisel H (1996) Accumulation and persistence of hepatitis B virus core gene deletion mutants in renal transplant patients are associated with end-stage liver disease. *Hepatology* 24: 751-8
- Günther S, Piwon N, Iwanska A, Schilling R, Meisel H, Will H (1996b) Type, prevalence, and significance of core promoter/enhancer II mutations in hepatitis B viruses from immunosuppressed patients with severe liver disease. *J Virol* 70: 8318-31
- Günther S, Sommer G, Iwanska A, Will H (1997) Heterogeneity and common features of defective hepatitis B virus genomes derived from spliced pregenomic RNA. *Virology* 238: 363-71
- Günther S, Piwon N, Will H (1998) Wild-type levels of pregenomic RNA and replication but reduced pre-C RNA and e-antigen synthesis of hepatitis B virus with C(1653) --> T, A(1762) --> T and G(1764) --> A mutations in the core promoter. *J Gen Virol* 79: 375-80
- Günther S, Fischer L, Pult I, Sterneck M, Will H (1999) Naturally occurring variants of hepatitis B virus. *Adv Virus Res* 52: 25-137
- Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166: 557-580
- Harrison RF, Davies MH, Goldin RD, Hubscher SG (1993) Recurrent hepatitis B in liver allografts: a distinctive form of rapidly developing cirrhosis. *Histopathology* 23: 21-8
- Hasegawa K, Huang J, Rogers SA, Blum HE, Liang TJ (1994) Enhanced replication of a hepatitis B virus mutant associated with an epidemic of fulminant hepatitis. *J Virol* 68: 1651-1659

- Hawkins AE, Gilson RJ, Gilbert N, Wreghitt TG, Gray JJ, Ahlers-de Boer I, Tedder RS, Alexander GJ (1996) Hepatitis B virus surface mutations associated with infection after liver transplantation. *J Hepatol* 24: 8-14
- Hildt E, Urban S, Lauer U, Hofschneider PH, Kekule AS (1993) ER-localization and functional expression of the HBV transactivator MHBst. *Oncogene* 8: 3359-3367
- Hollinger F (1996) Hepatitis B Virus. In: Fields B, Knipe D et al. (eds) *Fields Virology*, Ed 3, pp 2739-2807. Philadelphia: Lippincott-Raven
- Hu KQ, Siddiqui A (1991) Regulation of the hepatitis B virus gene expression by the enhancer element I. *Virology* 181: 721-6
- Hung YB, Liang JT, Chu JS, Chen KM, Lee CS (1995) Fulminant hepatic failure in a renal transplant recipient with positive hepatitis B surface antigens: a case report of fibrosing cholestatic hepatitis. *Hepatogastroenterology* 42: 913-8
- IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN) (1984) Nomenclature and symbolism for amino acids and peptides. Recommendations 1983. *Biochem J* 219: 345-73
- Jamal H, Regenstein F, Farr G, Perrillo RP (1996) Prolonged survival in fibrosing cholestatic hepatitis with long-term ganciclovir therapy. *Am J Gastroenterol* 91: 1027-1030
- Jung M-C, Pape G-R (1994) Virushepatitiden. *Deutsches Ärzteblatt* 91: B-1986-93
- Kairaitis LK, Gottlieb T, George CR (1998) Fatal hepatitis B virus infection with fibrosing cholestatic hepatitis following renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 13: 1571-3
- 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
- Karasawa T, Aizawa Y, Zeniya M, Kuramoto A, Shirasawa T, Toda G (1995) Genetic heterogeneity in the precore region of hepatitis B virus in hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B patients: spontaneous seroconversion and interferon-induced seroconversion. *J Med Virol* 45: 373-380
- Kato J, Hasegawa K, Torii N, Yamauchi K, Hayashi N (1996) A molecular analysis of viral persistence in surface antigen-negative chronic hepatitis B. *Hepatology* 23: 389-395

- Kekule AS, Lauer U, Meyer M, Caselmann WH, Hofschneider PH, Koshy R (1990) The preS₂/S region of integrated hepatitis B virus DNA encodes a transcriptional transactivator. *Nature* 343: 457-461
- König S, Beterams G, Nassal M (1998) Mapping of homologous interaction sites in the hepatitis B virus core protein. *J Virol* 72: 4997-5005
- Kurosaki M, Enomoto N, Asahina Y, Sakuma I, Ikeda T, Tozuka S, Izumi N, Marumo F, Sato C (1996) Mutations in the core promoter region of hepatitis B virus in patients with chronic hepatitis B. *J Med Virol* 49: 115-123
- Lam PW, Wachs ME, Somberg KA, Vincenti F, Lake JR, Ferrell LD (1996) Fibrosing cholestatic hepatitis in renal transplant recipients. *Transplantation* 61: 378-381
- Lamberts C, Nassal M, Velhagen I, Zentgraf H, Schroder CH (1993) Precore-mediated inhibition of hepatitis B virus progeny DNA synthesis. *J Virol* 67: 3756-3762
- Laskus T, Rakela J, Tong MJ, Nowicki MJ, Mosley JW, Persing DH (1994) Naturally occurring hepatitis B virus mutants with deletions in the core promoter region. *J Hepatol* 20: 837-841
- Laskus T, Rakela J, Nowicki MJ, Persing DH (1995) Hepatitis B virus core promoter sequence analysis in fulminant and chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 109: 1618-23
- Lau JY, Bain VG, Davies SE, O'Grady JG, Alberti A, Alexander GJ, Williams R (1992) High-level expression of hepatitis B viral antigens in fibrosing cholestatic hepatitis. *Gastroenterology* 102: 956-62
- Lau JY, Bain VG, Smith HM, Alexander GJ, Williams R (1992b) Modulation of hepatitis B viral antigen expression by immunosuppressive drugs in primary hepatocyte culture. *Transplantation* 53:894-8.
- Lauer U, Weiss L, Hofschneider PH, Kekule AS (1992) The hepatitis B virus pre-S/S(t) transactivator is generated by 3' truncations within a defined region of the S gene. *J Virol* 66: 5284-5289
- Lee HK, Yoon GS, Min KS, Jung YW, Lee YS, Suh DJ, Yu E (2000) Fibrosing cholestatic hepatitis: a report of three cases. *J Korean Med Sci* 15: 111-4
- Lenhoff RJ, Summers J (1994) Construction of avian hepadnavirus variants with enhanced replication and cytopathicity in primary hepatocytes. *J Virol* 68: 5706-5713

- Li JS, Tong SP, Wen YM, Vitvitski L, Zhang Q, Trepo C (1993) Hepatitis B virus genotype A rarely circulates as an HBe-minus mutant: possible contribution of a single nucleotide in the precore region. *J Virol* 67: 5402-5410
- Liang TJ, Hasegawa K, Rimoin N, Wands JR, Ben-Porath E (1991) A hepatitis B virus mutant associated with an epidemic of fulminant hepatitis. *N Engl J Med* 324: 1705-1709
- Lin X, Yuan ZH, Wu L, Ding JP, Wen YM (2001) A single amino acid in the reverse transcriptase domain of hepatitis B virus affects virus replication efficiency. *J Virol* 75: 11827-33
- Lok AS, Akarca U, Greene S (1994) Mutations in the pre-core region of hepatitis B virus serve to enhance the stability of the secondary structure of the pre-genome encapsidation signal. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 4077-4081
- Loncarevic IF, Schranz P, Zentgraf H, Liang XH, Herrmann G, Tang ZY, Schroder CH (1990) Replication of hepatitis B virus in a hepatocellular carcinoma. *Virology* 174: 158-168
- Lu CC, Chen M, Ou JH, Yen TS (1995) Key role of a CCAAT element in regulating hepatitis B virus surface protein expression. *Virology* 206: 1155-1158
- Mangold CM, Streeck RE (1993) Mutational analysis of the cysteine residues in the hepatitis B virus small envelope protein. *J Virol* 67: 4588-97
- Mason AL, Wick M, White HM, Benner KG, Lee RG, Regenstein F, Riely CA, Bain VG, Campbell C, Perrillo RP (1993) Increased hepatocyte expression of hepatitis B virus transcription in patients with features of fibrosing cholestatic hepatitis. *Gastroenterology* 105: 237-44
- McAleer WJ, Buynak EB, Maigetter RZ, Wampler DE, Miller WJ, Hilleman MR (1984) Human hepatitis B vaccine from recombinant yeast. *Nature* 307: 178-80
- McIvor C, Morton J, Bryant A, Cooksley WG, Durrant S, Walker N (1994) Fatal reactivation of precore mutant hepatitis B virus associated with fibrosing cholestatic hepatitis after bone marrow transplantation. *Ann Intern Med* 121: 274-5
- McMillan JS, Bowden DS, Angus PW, McCaughan GW, Locarnini SA (1996) Mutations in the hepatitis B virus precore/core gene and core promoter in patients with severe recurrent disease following liver transplantation. *Hepatology* 24: 1371-8
- Metzger K, Bringas R (1998) Proline-138 is essential for the assembly of hepatitis B virus core protein. *J Gen Virol* 79: 587-90

- Milich DR, Chen MK, Hughes JL, Jones JE (1998) The secreted hepatitis B precore antigen can modulate the immune response to the nucleocapsid: a mechanism for persistence. *J Immunol* 160: 2013-21
- Moriyama K, Okamoto H, 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: 269-280
- Nakajima 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: 329-335
- Naoumov NV, Schneider R, Grotzinger T, Jung MC, Miska S, Pape GR, Will H (1992) Precore mutant hepatitis B virus infection and liver disease. *Gastroenterology* 102: 538-543
- Nassal M, Schaller H (1993) Hepatitis B virus replication. *Trends Microbiol* 1: 221-8
- Natoli G, Avantaggiati ML, Balsano C, De Marzio E, Collepardo D, Elfassi E, Levrero M (1992) Characterization of the hepatitis B virus preS/S region encoded transcriptional transactivator. *Virology* 187: 663-670
- Naumann U, Protzer-Knolle U, Berg T, Leder K, Lobeck H, Bechstein WO, Gerken G, Hopf U, Neuhaus P (1997) A pretransplant infection with precore mutants of hepatitis B virus does not influence the outcome of orthotopic liver transplantation in patients on high dose anti-hepatitis B virus surface antigen immunoprophylaxis. *Hepatology* 26: 478-84
- Norder H, Hammas B, Lofdahl S, Courouce AM, Magnius LO (1992) Comparison of the amino acid sequences of nine different serotypes of hepatitis B surface antigen and genomic classification of the corresponding hepatitis B virus strains. *J Gen Virol* 73 : 1201-8
- Norder H, Courouce AM, Magnius LO (1994) Complete genomes, phylogenetic relatedness, and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes. *Virology* 198: 489-503
- O'Grady JG, Smith HM, Davies SE, Daniels HM, Donaldson PT, Tan KC, Portmann B, Alexander GJ, Williams R (1992) Hepatitis B virus reinfection after orthotopic liver transplantation. Serological and clinical implications. *J Hepatol* 14: 104-11

- Okamoto H, Imai M, Kametani M, Nakamura T, Mayumi M (1987) Genomic heterogeneity of hepatitis B virus in a 54-year-old woman who contracted the infection through materno-fetal transmission. *Jpn J Exp Med* 57: 231-6
- Okamoto H, Imai M, Tsuda F, Tanaka T, Miyakawa Y, Mayumi M (1987b) Point mutation in the S gene of 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: 3030-3034
- Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, Sastrosoewignjo RI, Imai M, Miyakawa Y, Mayumi M (1988) Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. *J Gen Virol* 69: 2575-2583
- Okamoto H, Wang Y, Tanaka T, Machida A, Miyakawa Y, Mayumi M (1993) Trans-complementation among naturally occurring deletion mutants of hepatitis B virus and integrated viral DNA for the production of viral particles with mutant genomes in hepatoma cell lines. *J Gen Virol* 74: 407-14
- Okamoto H, Tsuda F, Akahane Y, Sugai Y, Yoshiba M, Moriyama K, Tanaka T, Miyakawa Y, Mayumi M (1994) Hepatitis B virus with mutations in the core promoter for an e antigen-negative phenotype in carriers with antibody to e antigen. *J Virol* 68: 8102-10
- Orito E, Mizokami M, Ina Y, Moriyama EN, Kameshima N, Yamamoto M, Gojobori T (1989) Host-independent evolution and a genetic classification of the hepadnavirus family based on nucleotide sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 7059-62
- Poulet B, Chapel F, Deny P, Schneider MC, Jeantils V, Beaugrand M, Guettier C (1996) Fibrosing cholestatic hepatitis by B virus reactivation in AIDS. *Ann Pathol* 16: 188-191
- Preisler-Adams S, Schlayer HJ, Peters T, Korp R, Rasenack J (1993) Complete nucleotide sequence of a hepatitis B virus, subtype adw2, and identification of three types of C open reading frame. *Nucleic Acids Res* 21: 2258
- Pult I, Chouard T, Wieland S, Klemenz R, Yaniv M, Blum HE (1997) A hepatitis B virus mutant with a new hepatocyte nuclear factor 1 binding site emerging in transplant-transmitted fulminant hepatitis B. *Hepatology* 25: 1507-15
- Radziwill G, Tucker W, Schaller H (1990) Mutational analysis of the hepatitis B virus P gene product: domain structure and RNase H activity. *J Virol* 64: 613-620

- Raney AK, Milich DR, McLachlan A (1991) Complex regulation of transcription from the hepatitis B virus major surface antigen promoter in human hepatoma cell lines. *J Virol* 65: 4805-4811
- Roingard P, Romet-Lemonne JL, Leturcq D, Goudeau A, Essex M (1990) Hepatitis B virus core antigen (HBc Ag) accumulation in an HBV nonproducer clone of HepG2-transfected cells is associated with cytopathic effect. *Virology* 179: 113-20
- Sagnelli E, Manzillo G, Maio G, Pasquale G, Felaco FM, Filippini P, Izzo CM, Piccinino F (1980) Serum levels of hepatitis B surface and core antigens during immunosuppressive treatment of HBsAg-positive chronic active hepatitis. *Lancet* 2:395-7
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Samuel D, Muller R, Alexander G, Fassati L, Ducot B, Benhamou JP, Bismuth H (1993) Liver transplantation in European patients with the hepatitis B surface antigen. *N Engl J Med* 329: 1842-7
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 5463-5467
- Santantonio T, Gunther S, Sterneck M, Rendina M, Messner M, Launois B, Francavilla A, Pastore G, Will H (1999) Liver graft infection by HBV S-gene mutants in transplant patients receiving long-term HBIG prophylaxis. *Hepatogastroenterology* 46: 1848-54
- Scaglioni PP, Melegari M, Wands JR (1997) Biologic properties of hepatitis B viral genomes with mutations in the precore promoter and precore open reading frame. *Virology* 233: 374-381
- Schneider R, Fernholz D, Wildner G, Will H (1991) Mechanism, kinetics, and role of duck hepatitis B virus e-antigen expression in vivo. *Virology* 182: 503-512
- Schödel F, Sprengel R, Weimer T, Fernholz D, Schneider R, Will, H (1989) Animal Hepatitis B Viruses. In: Klein G (ed) *Advances in viral oncology*. Raven Press, New York, pp. 73-102
- Sterneck M, Gunther S, Santantonio T, Fischer L, Broelsch CE, Greten H, Will H (1996) Hepatitis B virus genomes of patients with fulminant hepatitis do not share a specific mutation. *Hepatology* 24: 300-6

- Takeda K, Akahane Y, Suzuki H, Okamoto H, Tsuda F, Miyakawa Y, Mayumi M (1990) Defects in the precore region of the HBV genome in patients with chronic hepatitis B after sustained seroconversion from HBeAg to anti-HBe induced spontaneously or with interferon therapy. *Hepatology* 12: 1284-1289
- Tillmann H, Trautwein C, Walker D, Michitaka K, Kubicka S, Boker K, Manns M (1995) Clinical relevance of mutations in the precore genome of the hepatitis B virus. *Gut* 37: 568-573
- Tiollais P, Buendia MA (1991) Hepatitis B virus. *Sci Am* 264: 116-23
- Tong SP, Brotman B, Li JS, Vitvitski L, Pascal D, Prince AM, Trepo C (1991a) In vitro and in vivo replication capacity of the precore region defective hepatitis B virus variants. *J Hepatol* 13 Suppl 4:S68-S73
- Tong SP, Diot C, Gripon P, Li J, Vitvitski L, Trepo C, Guguen-Guillouzo C (1991b) In vitro replication competence of a cloned hepatitis B virus variant with a nonsense mutation in the distal pre-C region. *Virology* 181: 733-7
- Tong SP, Li JS, 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: 237-245
- Trautwein C, Schrem H, Tillmann HL, Kubicka S, Walker D, Boker KH, Maschek HJ, Pichlmayr R, Manns MP (1996) Hepatitis B virus mutations in the pre-S genome before and after liver transplantation. *Hepatology* 24: 482-8
- Tur-Kaspa R, Shaul Y, Moore DD, Burk RD, Okret S, Poellinger L, Shafritz DA (1988) The glucocorticoid receptor recognizes a specific nucleotide sequence in hepatitis B virus DNA causing increased activity of the HBV enhancer. *Virology* 167: 630-3
- Ullmann A, Jacob F, Monod J (1967) Characterization by in vitro complementation of a peptide corresponding to an operator-proximal segment of the beta-galactosidase structural gene of *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 24: 339-343
- Ulrich PP, Bhat RA, Kelly I, Brunetto MR, Bonino F, Vyas GN (1990) A precore-defective mutant of hepatitis B virus associated with e antigen-negative chronic liver disease. *J Med Virol* 32: 109-118
- Waguri N, Ichida T, Fujimaki R, Ishikawa T, Nomoto M, Asakura H, Nakamaru T, Saitoh A, Arakawa M, Saitoh K, Takahashi K (1998) Fibrosing cholestatic hepatitis after living related-donor renal transplantation. *J Gastroenterol Hepatol* 13: 1133-7

- Wakita T, Kakumu S, Shibata M, Yoshioka K, Ito Y, Shinagawa T, Ishikawa T, Takayanagi M, Morishima T (1991) Detection of pre-C and core region mutants of hepatitis B virus in chronic hepatitis B virus carriers. *J Clin Invest* 88: 1793-1801
- Walker N, Apel R, Kerlin P, Horn M, Tinniswood R, Lynch S, Strong R (1993) Hepatitis B virus infection in liver allografts. *Am J Surg Pathol* 17: 666-677
- Waters JA, Kennedy M, Voet P, Hauser P, Petre J, Carman W, Thomas HC (1992) Loss of the common "A" determinant of hepatitis B surface antigen by a vaccine-induced escape mutant. *J Clin Invest* 90: 2543-2547
- Will H (1991) The X-protein of hepatitis B virus. Facts and fiction. *J Hepatol* 13 Suppl 4: S56-7
- Xu Z, Yen TS (1996) Intracellular retention of surface protein by a hepatitis B virus mutant that releases virion particles. *J Virol* 70: 133-40
- Yuh CH, Chang YL, Ting LP (1992) Transcriptional regulation of precore and pregenomic RNAs of hepatitis B virus. *J Virol* 66: 4073-84
- Zhou S, Standring DN (1992) Cys residues of the hepatitis B virus capsid protein are not essential for the assembly of viral core particles but can influence their stability. *J Virol* 66: 5393-8
- Zoulim F, Saputelli J, Seeger C (1994) Woodchuck hepatitis virus X protein is required for viral infection in vivo. *J Virol* 68: 2026-30

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
AS	Aminosäure
B	Base
BCP	Basic Core Promotor
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C	Cytidin
c	zenti-
Ca	Calcium
ca.	circa
Cl	Chlorid
CMV	Cytomegalie Virus
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten
ddNTP	2',3'-Didesoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
Det.	Determinante
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ENH	Enhancer
etc.	et cetera
FCH	fibrosierende cholestatische Hepatitis
g	Gramm
G	Guanin

h	Stunde
H	Wasserstoff
HBcAg	Hepatitis B Virus "core"-Antigen
HBeAg	Hepatitis B Virus "e"-Antigen
HBIG	Hepatitis B Hyperimmunglobulin
HBsAg	Hepatitis B Virus Oberflächen (surface)-Antigen
HBV	Hepatitis B Virus
HCV	Hepatitis C Virus
HIV	human immunodeficiency virus
HLA	humanes Leukozyten-Antigen
IRD	Infrarot-Farbstoff
k	kilo-
Kap.	Kapitel
l	Liter
LB	Luria Bertani
LTX	Lebertransplantation
m	Meter
m-	milli-
M	Mol
μ	mikro-
Mg	Magnesium
min	Minute
Mn	Mangan
Mon.	Monat
MW	DNA-Längenstandard (molecular weight marker)
n	nano-
Na	Natrium
Nukl.	Nukleotid
OD	optische Dichte
p	piko-
P	Primer
Pat.	Patient
PCR	Polymerase-Kettenreaktion

Pos.	Position
Pwo	Pyrococcus woesei
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
sog.	sogenannt
SP	S-Promotor
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Essigsäure-EDTA
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
U	Unit
u.a.	unter anderem
UV	ultraviolett
V	Volt
W.	Woche
Z.	Zyklus
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

7.2 Referenzgenome

Identifikationsnummern des NCBI (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, USA) bzw. EMBL (European Molecular Biology Laboratory)

<u>NCBI</u>	<u>EMBL</u>
329640	HPBAYW
59455	HBVXCPS
59418	HBVADW2
59416	HBVADW
60429	HVHEPB
329633	HPBADWZCG
260397	S50225
221497	HPBADW1
221499	HPBADW3
329628	HPBADWZ
221498	HPBADW2
59585	HEHBVAYR
	HHVBC
	HHVCCMA
221500	HPBCG
457780	HBVPREX
329616	HPBADR1CG
59404	HBVADR4
221494	HPBADRC
59402	HBVADR
291409	HPBETNC
59408	HBVADRM
329649	HPBCCGADR
329621	HPBADRA
59429	HBVAYWC
62280	XXHEPAV
288927	HBVORFS
59434	HBVAYWCI
329667	HPBHBVAA
313780	HBVAYWMCG
451966	HPBMUT
59439	HBVAYWE
59448	HBVDNA
	HHVBBAS
	HHVBE4
	HHVBF
	HHVBFFOU
59422	HBVADW4A
221505	HPBVCG

7.3 Danksagung

Zu allererst danke ich Frau PD Dr. Martina Sterneck als wissenschaftliche Leiterin für die Vergabe des Themas, die Bereitstellung erforderlicher Mittel und die umfassende Betreuung.

Die Kooperation mit Herrn Prof. Dr. Hans Will ermöglichte diese Arbeit, dem ich für die freundliche Bereitstellung des Arbeitsplatzes, seine Anregungen und ständige Diskussionsbereitschaft bei der praktischen Durchführung danke.

Mein besonderer Dank gebührt Herrn Dr. Lutz Fischer als ständiger Ansprechpartner bei der gesamten Durchführung des praktischen und theoretischen Teils der Arbeit.

Der Arbeitsgruppe Will am Heinrich-Pette-Institut danke ich für die nette Aufnahme und das konstruktive Klima, insbesondere Herrn Dr. Stephan Günther für anregende Diskussionen sowie Frau Tatjana Kalinina und Frau Alicja Iwanska für viele praktische Hilfestellungen im Labor.

Desweiteren möchte ich meinem Vater für seine Anregungen und kritische Durchsicht der Arbeit danken.

7.4 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Christoph Müller-Ruchholtz
 Adresse: Wespinstr. 13, 68165 Mannheim
 Geburtstag und -ort: 04.06.1971 in Kiel
 Familienstand: ledig

Schulbildung:

1978-1982 Grund- und Hauptschule Rammsee, 24113 Molfsee
 1982-1991 Gymnasium Kieler Gelehrtenschule , 24105 Kiel
 1991 Abitur

Grundwehrrersatzdienst:

08/1991-10/1992 Betreuer für körperlich und geistig Behinderte in der Werkstatt
 "Eiderheim", 24220 Flintbek

Studium:

10/1992-09/1999 Medizinstudium an der Universität Hamburg
 09/1994 Ärztliche Vorprüfung
 03/1996 1. Staatsexamen
 09/1998 2. Staatsexamen
 11/1999 3. Staatsexamen

Beruflicher Werdegang:

01/2000-07/2001 Arzt im Praktikum: Neurologische Abteilung des AK Altona,
 Hamburg
 08/2001-01/2002 Bereitschaftsdienstarzt in der Neurologischen Abteilung des
 AK Barmbek, Hamburg
 seit 02/2002 Assistenzarzt in der Neuroradiologischen Abteilung des
 Universitäts-Klinikums Mannheim

Promotion:

Molekulare Charakterisierung von Hepatitis B Virus-
 Populationen in Patienten mit fibrosierender cholestatischer
 Hepatitis. Heinrich-Pette-Institut Hamburg, Projektleitung:
 Frau PD Dr. M. Sterneck

Publikationen:

- Fischer L, Müller-Ruchholtz C, Günther S, Gish R, Will H,
 Sterneck M (1997) Hepatology 26: No. 4, Pt. 2, 507A
 - Fischer L, Sterneck M, Müller-Ruchholtz C, Gish R, Will H
 (1999) Transplantation Proceedings 31: 492-493

Mannheim, im Juni 2002

7.5 Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, daß ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe, und daß ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Christoph Müller-Ruchholtz