

# **Funktionelle Analyse von komplexen Hepatitis-B-Virus-Varianten, assoziiert mit Leberzirrhose bei Immunsupprimierten**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom-Biologin Stefanie Märschenz

geboren am 27.12.1975 in Berlin

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Christoph Marksches

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Thomas Buckhout, PhD

Gutachter:       1. Prof. Dr. Detlev H. Krüger  
                      2. Prof. Dr. Günther Schönrich  
                      3. Prof. Dr. Wolfgang Jilg

Tag der mündlichen Prüfung:       10. August 2006



## **Abstract (deutsch)**

Obwohl der Wildtyp des Hepatitis-B-Virus (HBV) nicht zytopathogen und die Pathogenese der Hepatitis B generell immunvermittelt ist, können in immunsupprimierten Nierentransplantatempfängern mit chronischer Hepatitis B schwere Leberschäden bis hin zu Leberzirrhose und Leberversagen entstehen. Die Entwicklung von Leberzirrhose in den Nierentransplantierten ist assoziiert mit der Akkumulation und Persistenz von komplexen HBV-Varianten mit Mutationen im Core-Promotor / X-Gen, Deletionen im Core (C)-Gen und teilweise zusätzlichen Deletionen im präS-Bereich. Dies lässt eine Rolle der Varianten in der speziellen Pathogenese bei Immunsupprimierten vermuten. In der vorliegenden Arbeit wurden funktionelle Analysen der komplexen Varianten im Vergleich zu Referenz-Wildtypgenomen und Wildtyp-ähnlichen Genomen der Patienten aus der frühen Infektionsphase durchgeführt, um Hinweise auf den potentiellen Beitrag der Varianten zur Pathogenese zu erlangen. Die Analysen erfolgten durch transiente Transfektion der humanen Hepatomazelllinie HuH7 mit repräsentativen HBV-Gesamtgenomen, die aus 2 Patienten während des Krankheitsverlaufs von einer asymptomatischen Infektion hin zur Leberzirrhose isoliert und kloniert worden waren. Trotz einiger Unterschiede im Detail wiesen die komplexen Varianten einen gemeinsamen, drastisch vom Wildtyp abweichenden Phänotyp auf. Dieser war gekennzeichnet durch eine veränderte Transkription mit reduzierten präC- und Oberflächen-mRNAs und verstärkter Expression der prägenomischen RNA, eine starke Reduktion des häufigsten Spleißprodukts der prägenomischen RNA, SP1, eine extrem reduzierte oder fehlende Expression und/oder Sekretion aller Oberflächenproteine und des HBeAg, ein verändertes intrazelluläres Verteilungsmuster des schwach exprimierten Core-Proteins und teilweise der Oberflächenproteine sowie eine erhöhte Replikation und Anreicherung gegenüber Wildtyp-HBV aufgrund einer verstärkten reversen Transkription der prägenomischen RNA. Dieser Phänotyp basierte zum Teil auf den Mutationen in Core-Promotor und C-Gen, wurde jedoch deutlich durch zusätzliche Mutationen in den übrigen Genomabschnitten beeinflusst. Die vielfältigen Veränderungen der Varianten unterstützen ihren vermuteten Beitrag zur Pathogenese.

## **Abstract (english)**

Although wild-type hepatitis B virus is not cytopathogenic and the pathogenesis of hepatitis B is generally immune mediated, also immuno-suppressed patients, such as renal transplant recipients, with chronic hepatitis B may develop liver cirrhosis and end-stage liver disease. In renal transplant recipients, the development of liver cirrhosis is associated with the accumulation and persistence of complex HBV variants with mutations in core promoter / X gene, deletions in core (C) gene and sometimes additional deletions in the preS region. This suggests a role of these variants in the special pathogenesis in immuno-suppressed patients. In the present work, the complex variants were functionally analyzed in comparison to reference wild-type genomes and wild-type-like HBV genomes from the early asymptomatic phase of infection. For the analyses, representative cloned full-length HBV genomes isolated from 2 patients before and during liver cirrhosis were transiently transfected into the human hepatoma cell line HuH7. In spite of some variations, the complex variants showed a common phenotype, which was drastically altered compared to wild-type. It was characterized by reduced preC and surface mRNAs and increased expression of pregenomic RNA, by a strong reduction of the major spliced pregenomic RNA, SP1, by a partial or complete defect in expression and/or secretion of surface proteins and HBeAg, by an aberrant intracellular localization of the weakly expressed core protein and in some cases of the surface proteins, and by an enhanced replication and enrichment over wild-type HBV due to an enhanced reverse transcription of variant pregenomic RNA. The phenotypic alterations were often based on the mutations in core promoter and C gene but were considerably influenced by the additional mutations in other genomic regions. The multiple functional changes of the variants support their assumed contribution to pathogenesis.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>11</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>15</b>
<b>1.1 Das Hepatitis-B-Virus (HBV).....</b>	<b>15</b>
1.1.1 Struktur und Genomorganisation .....	15
1.1.2 Replikation .....	17
1.1.3 Regulatorische Elemente .....	20
1.1.4 Virale Genprodukte .....	23
1.1.4.1 Produkte des C-ORF .....	23
1.1.4.2 Produkte des S-ORF .....	24
1.1.4.3 Polymerase .....	25
1.1.4.4 X-Protein .....	26
<b>1.2 Die HBV-Infektion.....</b>	<b>27</b>
1.2.1 Klinische Formen der Hepatitis B .....	27
1.2.2 Pathogenese der HBV-Infektion.....	27
1.2.3 Besonderheiten der HBV-Infektion bei immunsupprimierten Nierentransplantatempfängern.....	28
1.2.4 Therapie .....	30
<b>1.3 HBV-Varianten.....</b>	<b>31</b>
1.3.1 Entstehung und Selektion von HBV-Varianten.....	31
1.3.2 Häufig auftretende Varianten .....	32
1.3.3 HBV-Varianten bei Immunsupprimierten, insbesondere bei Nierentransplantierten .....	32
<b>1.4 Funktionelle Analyse von HBV-Genomen .....</b>	<b>34</b>
1.4.1 Modellsysteme.....	34
1.4.2 Funktionelle Analysen von künstlich generierten Hybridgenomen .....	36
1.4.3 Funktionelle Analysen von kompletten, natürlich auftretenden Genomen .....	37

<b>2</b>	<b>Zielsetzung .....</b>	<b>39</b>
<b>3</b>	<b>Die Patienten und ihre HBV-Populationen .....</b>	<b>41</b>
<b>3.1</b>	<b>Patient A.....</b>	<b>41</b>
3.1.1	Klinik .....	41
3.1.2	HBV-Populationen.....	43
<b>3.2</b>	<b>Patient B.....</b>	<b>44</b>
3.2.1	Klinik .....	44
3.2.2	HBV-Populationen.....	44
<b>4</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>47</b>
<b>4.1</b>	<b>Material.....</b>	<b>47</b>
4.1.1	Verbrauchsmaterialien, Geräte und Chemikalien .....	47
4.1.2	Marker .....	48
4.1.3	Standardpuffer und -lösungen.....	49
4.1.4	Plasmide .....	49
4.1.4.1	HBV-Patientenklone .....	49
4.1.4.2	Referenz-Genome WtD und WtA.....	49
4.1.4.3	pCore.....	50
4.1.4.4	SEAP-Plasmid.....	50
4.1.5	Antikörper und Konjugate .....	50
<b>4.2</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>52</b>
4.2.1	Sequenzierung.....	52
4.2.2	Klonierung der Hybridgenome .....	52
4.2.2.1	C/Cp-Hybridvarianten.....	52
4.2.2.2	Cp-Hybridvarianten .....	53
4.2.2.3	C-Gen-Hybridvariante .....	54
4.2.2.4	Transformation.....	54
4.2.3	Zellkultur.....	54
4.2.4	Transfektion .....	55
4.2.4.1	Aussäen der Zellen.....	55
4.2.4.2	SapI-Restriktion .....	55

---

4.2.4.3	Transfektion.....	55
4.2.4.4	SEAP-Assay .....	56
4.2.5	Nachweis der Nukleinsäuren.....	56
4.2.5.1	DNA-Isolierung aus zytoplasmatischen Core-Partikeln.....	56
4.2.5.2	DNA-Isolierung aus Zellkernen .....	57
4.2.5.3	DNA-Isolierung aus Viruspartikeln im Zellkulturüberstand.....	57
4.2.5.4	RNA-Isolierung .....	58
4.2.5.5	Southern Blot.....	58
4.2.5.6	Northern Blot.....	60
4.2.5.7	Differenzierung der WtD- und Varianten-Nukleinsäuren mittels Pyrosequenzierung .....	62
4.2.5.8	Berechnungen zur Analyse der Replikation nach Kotransfektion der Varianten und WtD .....	66
4.2.5.9	Primer-Extension-Analyse der Core-Promotor-Transkripte .....	66
4.2.5.10	Analyse der gespleißten replikativen Intermediate aus Core-Partikeln.....	67
4.2.6	Proteinnachweise .....	69
4.2.6.1	Protein-Isolierung .....	69
4.2.6.2	SDS-PAGE und Immunoblot .....	69
4.2.6.3	Immunzytochemie .....	70
4.2.6.4	Immunfluoreszenz-Doppel-Färbungen.....	71
4.2.6.5	HBsAg- und HBeAg-Nachweis aus dem Zellkulturüberstand.....	72
<b>5</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>73</b>
<b>5.1</b>	<b>Screening und Überblick über phänotypische Veränderungen in den HBV- Populationen .....</b>	<b>73</b>
5.1.1	Replikation .....	74
5.1.2	Transkription .....	76
5.1.3	Proteinexpression .....	79
<b>5.2</b>	<b>Analyse von komplexen Varianten .....</b>	<b>80</b>
5.2.1	Transkription .....	84
5.2.2	Proteinexpression .....	86
5.2.2.1	HBeAg im Zellkulturüberstand.....	86

5.2.2.2	Core-Proteinexpression.....	86
5.2.2.3	Oberflächenproteinexpression .....	88
5.2.3	Replikation der komplexen Varianten .....	92
5.2.3.1	Replikative Intermediate in HuH7-Zellen.....	92
5.2.3.2	Replikative Intermediate in HepG2-Zellen.....	97
5.2.3.3	Anreicherung der verpackten prägenomischen RNA .....	99
5.2.3.4	Anreicherung der Varianten in extrazellulären Partikeln .....	99
<b>5.3</b>	<b>Replikation von Variantenpools .....</b>	<b>101</b>
<b>5.4</b>	<b>Analyse von Hybridgenomen .....</b>	<b>103</b>
5.4.1	Replikation der C/Cp-Hybridvarianten.....	103
5.4.2	Replikation der Cp- und C-Gen-Hybridvarianten.....	105
5.4.3	Transkription.....	107
<b>5.5</b>	<b>Auswirkungen auf das Spleißen der pg/präC-RNAs .....</b>	<b>110</b>
5.5.1	Gespleißte SP1-RNA der HBV-Genome der Patienten A und B .....	111
5.5.2	Gespleißte SP1-RNA der HBV-Genome weiterer Patienten.....	112
5.5.3	Gespleißte replikative Intermediate in Core-Partikeln.....	113
<b>6</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>117</b>
<b>6.1</b>	<b>Replikationskompetenz der klonierten HBV-Genome.....</b>	<b>117</b>
<b>6.2</b>	<b>Phänotyp der komplexen Varianten .....</b>	<b>117</b>
<b>6.3</b>	<b>Einfluss der Mutationen in Cp und C-Gen.....</b>	<b>118</b>
<b>6.4</b>	<b>präC-mRNA und pgRNA .....</b>	<b>120</b>
<b>6.5</b>	<b>HBeAg-Expression .....</b>	<b>121</b>
<b>6.6</b>	<b>Core-Proteinexpression .....</b>	<b>121</b>
<b>6.7</b>	<b>Oberflächen-mRNAs und -Proteine .....</b>	<b>123</b>
<b>6.8</b>	<b>Replikation.....</b>	<b>125</b>
6.8.1	Rolle von Mutationen in Cp, C-Gen und im restlichen Genom .....	126
6.8.2	Interaktion mit Wt-HBV .....	128

---

6.8.3	Unterschiede der Replikation in HuH7- und HepG2-Zellen.....	131
6.8.4	Replikation von Variantenpools.....	133
6.8.5	Mechanismus der verstärkten Replikation und Anreicherung .....	134
<b>6.9</b>	<b>Virus im Zellkulturüberstand .....</b>	<b>135</b>
<b>6.10</b>	<b>Auswirkungen auf das Spleißen.....</b>	<b>136</b>
6.10.1	Molekulare Ursachen.....	136
6.10.2	Mögliche Rollen des Spleißens bzw. des Nicht-Spleißens .....	139
<b>6.11</b>	<b>Mögliche Rolle der komplexen Varianten in der Pathogenese .....</b>	<b>141</b>
<b>6.12</b>	<b>Korrelation zwischen HBV-Population und Krankheitsverlauf.....</b>	<b>143</b>
<b>6.13</b>	<b>Notwendigkeit und Aussagekraft der funktionellen Analysen von HBV- Gesamtgenomen.....</b>	<b>144</b>
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>147</b>
	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>151</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>165</b>
	<b>Publikationen.....</b>	<b>167</b>
	<b>Selbständigkeitserklärung.....</b>	<b>171</b>
	<b>Anhang .....</b>	<b>I</b>



## Abkürzungsverzeichnis

In dieser Arbeit werden die international üblichen chemischen Symbole und Abkürzungen der SI-Einheiten (Système International d'Unités) verwendet. Ein- und Dreibuchstabencodes für Aminosäuren entsprechen der Konvention der „International Union for Biochemistry“. Die Abkürzungen gelten für Singular und Plural.

*	Stoppkodon
3TC	Lamivudin
A	Adenin
Abb.	Abbildung
Ag	Antigen
ALAT	Alaninaminotransferase
<i>Aqua bidest.</i>	2-mal destilliertes Wasser
<i>Aqua dest.</i>	destilliertes Wasser
AS	Aminosäure
ASAT	Aspartat-Aminotransferase
BCP	basaler Core-Promotor
bp	Basenpaare
Bsp.	Beispiel
C	Cytosin
ca.	zirka
cccDNA	kovalent geschlossen zirkuläre (engl. <i>covalently closed circular</i> ) DNA
COUP-TF1	engl. <i>chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor 1</i>
Cp	Core-Promotor
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten
CURS	Core stromaufwärts regulierende Sequenz, engl. <i>core upstream regulating sequence</i>
Del	Deletion
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DHBV	Enten-Hepatitis-B-Virus, engl. <i>duck HBV</i>
Dig	Digoxigenin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Deoxyribonuklease
DR	direkte Wiederholung, engl. <i>direct repeat</i>
ds	doppelsträngig
Du	Duplikation
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	engl. <i>enzyme linked immunosorbant sandwich assay</i>
Enh	Enhancer
ER	endoplasmatisches Retikulum
ESE	Exonischer Spleiß-Enhancer, engl. <i>exonic splicing enhancer</i>
ESS	Exonischer Spleiß-Silencer, engl. <i>exonic splicing silencer</i>
FA	Formaldehyd
FCH	Fibrosierende cholestatische Hepatitis
FCV	Famciclovir
FKS	fetales Kälberserum
fsh	Verschiebung des Leserahmens, engl. <i>frame-shift</i>

G	Guanin
GLP	Gelladepuffer
GSHV	Erdhörnchen-Hepatitis-Virus, engl. <i>ground squirrel HV</i>
Gt	Genotyp
h	Stunde
HBcAg	Hepatitis-B-Core-Antigen
HBeAg	Hepatitis-B-e-Antigen
HBsAg	Hepatitis-B-Oberflächen (engl. <i>surface</i> )-Antigen
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCC	hepatozelluläres Karzinom
HNF	Leberzellkernfaktor, engl. <i>hepatocyte nuclear factor</i>
IFN	Interferon
Ins	Insertion
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
l	Liter
LHBs	großes Hepatitis-B-Oberflächenprotein, engl. <i>large HB surface protein</i>
LTx	Lebertransplantation
LZ	Leberzirrhose
M	mol · l <sup>-1</sup>
MHBs	mittleres Hepatitis-B-Oberflächenprotein, engl. <i>middle HB surface protein</i>
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	Boten-RNA, engl. <i>messenger RNA</i>
NK	Negativkontrolle
NRE	negativ regulierendes Element
nt	Nukleotid
NTx	Nierentransplantation
ORF	offener Leserahmen, engl. <i>open reading frame</i>
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung, engl. <i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion, engl. <i>polymerase chain reaction</i>
pgRNA	prägenomische RNA
PPAR $\alpha$	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor $\alpha$
PRE	posttranskriptionell regulatorisches Element
r	terminal redundante Region des HBV-Genoms
rcDNA	relaxiert zirkuläre DNA, engl. <i>relaxed circular DNA</i>
RFLP	Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RXR	Retinoid-X-Rezeptor
S1p	präS1-Promotor
S2/Sp	präS2/S-Promotor
StA	Standardabweichung
S/C-Ratio	Quotient von Probenwert und Grenzwert, engl. <i>sample/cut-off</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEAP	sezernierte alkalische Phosphatase
SHBs	kleines Hepatitis-B-Oberflächenprotein, engl. <i>small HB surface protein</i>

SNP	Einzel-Nukleotid-Polymorphismus, engl. <i>single nucleotide polymorphism</i>
ss	einzelsträngig
SSC	Natriumsalz-Citrat, engl. <i>sodium salt citrate</i>
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TBP	TATA-bindendes Protein
TE	Tris-EDTA-Puffer
Th-Zelle	T-Helfer-Zelle
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
U	Einheit, engl. <i>unit</i>
ü. N.	über Nacht
V	Volt
Var	Variante
v/v	Volumen pro Volumen, engl. <i>volume per volume</i>
WHV	Waldmurmeltier-Hepatitis-Virus, engl. <i>woodchuck HV</i>
Wt	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen, engl. <i>weight per volume</i>



# 1 Einleitung

## 1.1 Das Hepatitis-B-Virus (HBV)

### 1.1.1 Struktur und Genomorganisation

Das humane HBV gehört zur Familie der Hepadnaviridae [1] und zum Genus Orthohepadnavirus. Alle Hepadnaviren sind durch ihren Lebertropismus charakterisiert und nur in sehr kleinen Mengen auch in Nieren, Pankreas und mononukleären Zellen der infizierten Organismen zu finden. Tierische Viren dieser Familie, wie das Walddarmtortier (*woodchuck*)-Hepatitis-Virus (WHV), das Erdhörnchen (*ground squirrel*)-Hepatitis-Virus (GSHV) und das Enten (*duck*)-Hepatitis-B-Virus (DHBV), dienen häufig als Modellsysteme in der Hepatitisforschung. Die infektiösen, sphärischen Viruspartikel des HBV (auch nach seinem Entdecker Dane-Partikel genannt) haben einen Durchmesser von ca. 42 nm und sind von einer Lipidhülle umgeben, die die 3 viralen Oberflächenproteine enthält. Hauptbestandteil der Hülle ist das kleine Oberflächenprotein (SHBs), während das mittlere (MHBs) und das große (LHBs) Oberflächenprotein zu gleichen Teilen zusammen etwa 30 % der Hüllproteine ausmachen [2,3] (Abb. 1.1). Innerhalb der Virionhülle befindet sich das ikosaedrische Nukleokapsid, das aus 90 oder 120 Core-Protein-Dimeren aufgebaut ist. Es umschließt das offen zirkuläre, partiell doppelsträngige, mit der viralen Polymerase assoziierte DNA-Genom, das je nach Genotyp 3181–3221 bp groß ist.

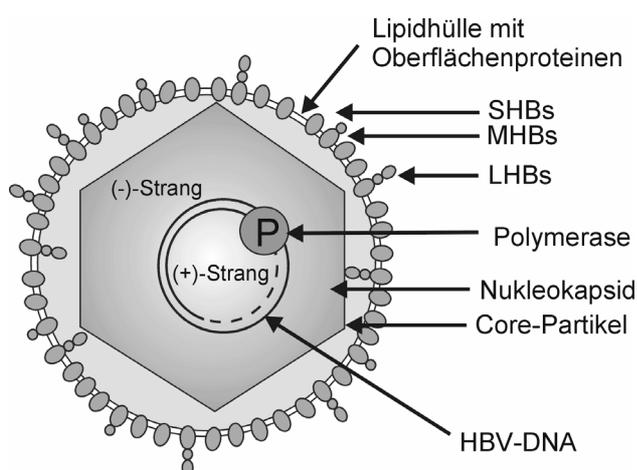
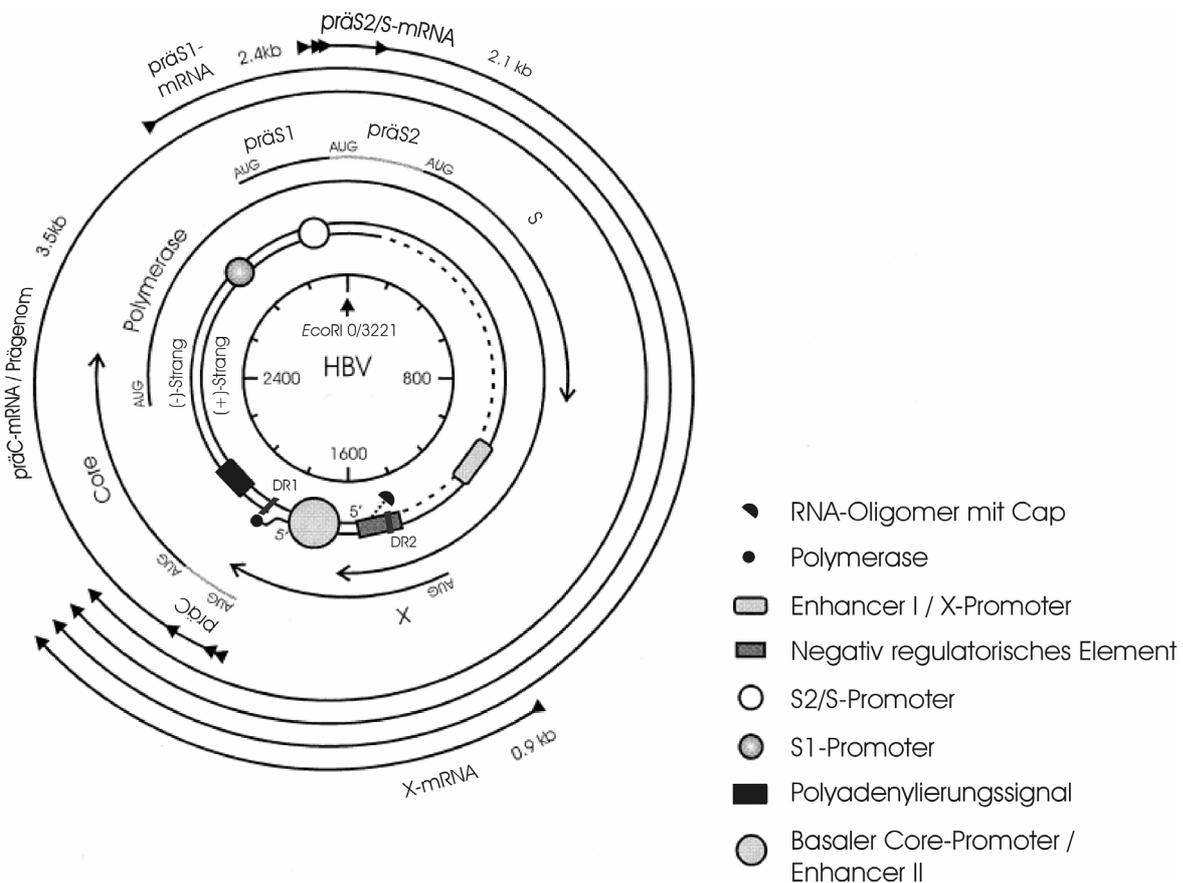


Abbildung 1.1: Aufbau des HBV (nach Preikschat [4]).

Die zirkuläre Genomstruktur entsteht durch die Überlappung der kohäsiven 5'-Enden des Plus- und Minus-DNA-Stranges in einem Bereich von 226 bp zwischen den *direct repeat*

(DR)-Sequenzen 1 und 2 (Abb. 1.2). Der vollständige Minusstrang ist also nicht kovalent geschlossen, sondern bleibt am sogenannten *nick* des HBV-Genoms offen. Er bindet an seinem teilweise redundanten 5'-Ende das terminale Protein der viralen Polymerase. Der Plusstrang umfasst nur einen Teil des Genoms und bindet an seinem 5'-Ende ein RNA-Oligomer mit Cap-Struktur. Das hochkomplexe Genom enthält 4 teilweise überlappende offene Leserahmen (ORF), die in verschiedenen Leserastern abgelesen werden. Der präC/Core (C)-ORF kodiert für das Präcore- und das Core-Protein, der präS/S-ORF für die 3 Oberflächenproteine, der P-ORF für die virale Polymerase (auch P-Protein genannt) und der X-ORF für das X-Protein (HBx). Vier Promotoren und 2 Enhancer, deren Sequenzen ebenfalls mit denen der ORFs überlappen, regulieren die Genexpression.



**Abbildung 1.2: Genomorganisation des HBV.** Die Koordinaten des Genoms (Genotyp A) sind relativ zur einzigen *EcoRI*-Schnittstelle angegeben. Dargestellt ist die partiell doppelsträngige DNA mit der Polymerase am 5'-Ende des vollständigen Minusstrangs und dem RNA-Oligomer mit Cap-Struktur am unvollständigen Plusstrang sowie den Positionen der *direct repeats* (DR1 und 2). Die regulatorischen *cis*-Elemente der Transkription sind als rechteckige und kreisförmige Symbole gezeigt. Die inneren Pfeile zeigen die ORFs mit ihren Startcodons (AUG). Die äußeren Pfeile stellen die viralen Transkripte in 5'-3'-Orientierung mit ihren teilweise heterogenen Transkriptionsstartorten (Pfeilspitzen) dar. Alle Transkripte haben ein gemeinsames 3'-Ende am Polyadenylierungssignal. Modifiziert nach Moolla *et al.* [5].

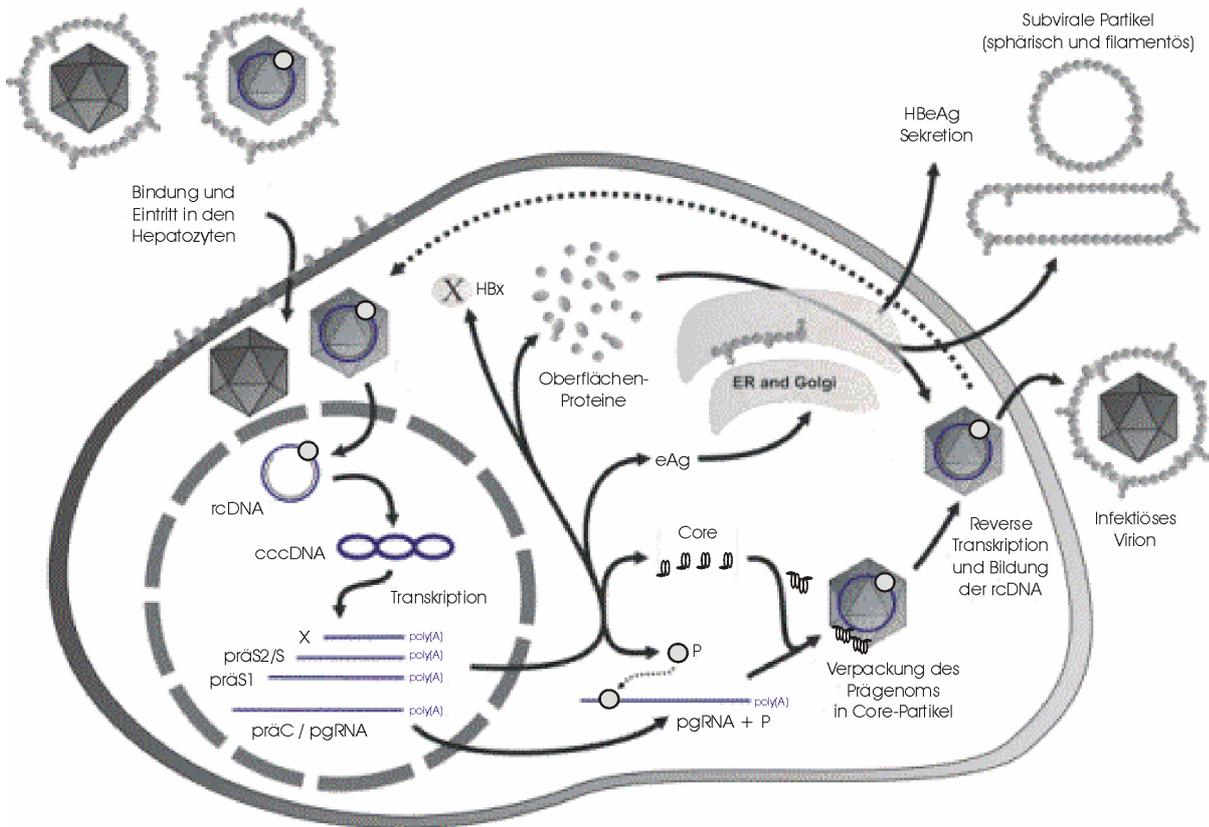
Gegenwärtig werden, basierend auf Sequenzabweichungen von mindestens 8 %, 8 Genotypen (A–H) von HBV unterschieden, die eine charakteristische geographische Verteilung

aufweisen [6]. In Deutschland wie auch im restlichen Nordwesteuropa und Nordamerika sind die Genotypen A und D am häufigsten. Genotyp-A-Genome sind durch eine Insertion von 6 Nukleotiden (nt) am 3'-Ende des C-Gens charakterisiert, während Genotyp-D-Genomen 33 nt in der präS1-Region fehlen. Anhand der Antigenität der Oberflächenproteine wird HBV außerdem in 4 Serotypen (ayw, adw, adr, ayr) eingeteilt.

### *1.1.2 Replikation*

Die ersten Schritte des Replikationszyklus sind aufgrund eines mangelnden Modellsystems für deren Untersuchung nicht gut charakterisiert. Das Virus gelangt durch Endozytose über einen noch unbekanntem Rezeptor in die Leberzelle. Dabei spielen die viralen Oberflächenproteine und insbesondere das myristoylierte LHBs mit den N-terminalen Aminosäuren (AS) 2–48 eine Rolle [7,8,9,10,11,12,13]. Nach dem Eintritt des Nukleokapsids ins Zytoplasma wird es zum Kern transportiert und entlässt die partiell doppelsträngige virale DNA in den Nukleus [14] (Abb. 1.3). Diese wird nach Entfernung des gecapten RNA-Oligomers und der viralen Polymerase durch die zelluläre DNA-Polymerase zu einem kovalent geschlossenen, zirkulären (ccc) DNA-Doppelstrang komplettiert.

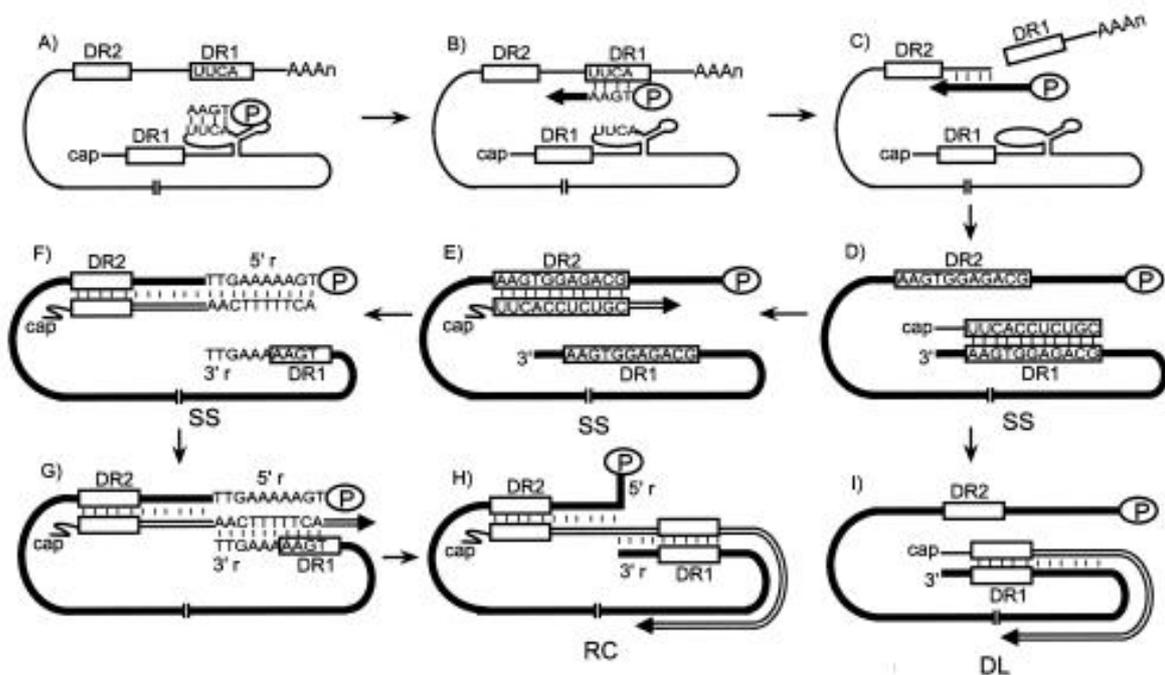
Die cccDNA dient als Matrize für die anschließende Transkription der viralen mRNAs (0,7 kb, 2,1 kb, 2,4 kb, 2 x ca. 3,5 kb) durch die zelluläre RNA-Polymerase II, wobei jede mRNA von ihrem eigenen Promotor transkribiert wird und alle an einem gemeinsamen Polyadenylierungsort enden. Alle RNAs werden anschließend durch eine 5'-Cap-Struktur und durch 3'-Prozessierung sowie Polyadenylierung modifiziert. Ein Teil der 3,5-kb-RNAs und nach neuesten Erkenntnissen auch der subgenomischen präS2/S-mRNA wird gespleißt [15,16]. Die Rolle dieses Spleißens im HBV-Replikationszyklus ist bisher unbekannt, da die Translation aller essentiellen viralen Proteine im Zytoplasma von ungespleißten mRNAs stattfindet. Von der subgenomischen präS2/S-mRNA (2,1 kb) werden das MHBs und SHBs, von der präS1-mRNA (2,4 kb) das LHBs und von der X-mRNA (0,7 kb) das HBx synthetisiert. Zur Transkription der beiden ca. 3,5 kb großen RNAs wird das Polyadenylierungssignal beim ersten Passieren überlesen und erst in der zweiten Runde benutzt, so dass terminal redundante RNAs mit Übergenomlänge entstehen. Sie unterscheiden sich in ihrer Größe am 5'-Ende um ca. 30 nt. Die längere präC-mRNA kodiert ausschließlich für das HBeAg. Dagegen dient die kürzere der beiden, die prägenomische RNA (pgRNA), nicht nur zur Translation des Core-Proteins und der Polymerase, sondern auch als Matrize für die Replikation des viralen Genoms durch reverse Transkription.



**Abbildung 1.3: Der Replikationszyklus des HBV.** Das infektiöse Virion bindet über einen noch unbekanntem Rezeptor an den Hepatozyten. Das Nucleokapsid tritt ins Zytoplasma ein und gibt die relaxiert zirkuläre (rc), virale DNA in den Nucleus frei, wo sie zu ihrer ccc-Form komplettiert wird. Die cccDNA dient als Matrize für die Transkription der genomischen und subgenomischen RNAs, die im Zytoplasma translatiert werden. Core-Protein und Polymerase, die von der prägenomischen RNA (pgRNA) exprimiert werden, interagieren mit dem Prägenom und assemblieren zu neuen Nucleokapsiden. Durch reverse Transkription der pgRNA wird der komplette DNA-Minusstrang synthetisiert. Durch die virale DNA-Polymeraseaktivität wird anschließend die DNA-Plusstrang-Synthese gestartet. Die reifen Kapside entlassen ihre DNA entweder zurück in den Nucleus oder sie werden exportiert, wobei sie im endoplasmatischen Retikulum (ER) mit den Oberflächenproteinen interagieren und umhüllt werden. Leere Hüllen (subvirale Partikel) werden im Überschuss zu den Viria sekretiert. Modifiziert nach „[www.biology.kenyon.edu/slone/bio38/scuderi/parti.html](http://www.biology.kenyon.edu/slone/bio38/scuderi/parti.html)“.

Zur Initiation der reversen Transkription bindet die virale Polymerase im Zytoplasma nach Interaktion mit zellulären Chaperonen (z. B. Hsp90 und Hsp60 [17,18]) an die Haarnadel-Struktur (*stem loop*) des sogenannten Verpackungssignals  $\epsilon$  am 5'-Ende des Prägenoms. Dadurch wird die Verpackung des Komplexes in das sich aus Dimer-Untereinheiten des Core-Proteins bildende Nucleokapsid ausgelöst und die reverse Transkription der pgRNA initiiert [19,20,21]. In ca. 90 % der Fälle wird die Polymerase mit ihrer eigenen mRNA verpackt [22]. Die reverse Transkription und Bildung der zirkulären, partiell doppelsträngigen DNA sind detailliert in Abb. 1.4 erklärt (siehe auch Übersichtsarbeiten [23] und [3]). Das terminale Protein der Polymerase (beim DHBV die OH-Gruppe des Tyrosins an AS-Position 63) dient als Proteinprimer für die Synthese eines 3–4 nt langen DNA-Primers mit einem Teil der Schlaufe von  $\epsilon$  als Matrize (Abb. 1.4A). Danach wird dieser Initiationskomplex aus

Polymerase und DNA-Primer an eine aufgrund der terminalen Redundanz des Prägenoms am 3'-Ende vorhandene komplementäre Region (r) verlagert (Abb. 1.4B), wo der Primer an DR1 bindet.



**Abbildung 1.4: Modell der reversen Transkription und der DNA-Plusstrang-Synthese des HBV.** A) Initiation der DNA-Minusstrang-Synthese. Die Polymerase (P) bindet an die Schlaufe von  $\epsilon$  am 5'-Ende der pgRNA (dünne Linie) und synthetisiert 3–4 nt mit der  $\epsilon$ -Sequenz als Matrize. B) Das Tetranucleotid mit der Polymerase wird zur komplementären Sequenz im *direct repeat* (DR) 1 am 3'-Ende der pgRNA transferiert. Von hier aus erfolgt die DNA-Minusstrang-Synthese (dicke Linie). C) Während der Minusstrang-Synthese wird die pgRNA-Matrize durch die RNaseH-Aktivität der Polymerase verdaut. D) Am 3'-Ende des komplett synthetisierten Minusstrangs verbleibt ein nicht verdauter Rest der pgRNA als Primer. E) Der RNA-Primer wechselt vom DR1 zum DR2 am 5'-Ende des DNA-Minusstrangs und initiiert von dort die Plusstrang-Synthese (Doppellinie). F) Der Plusstrang wird bis zum 5'-Ende des Minusstrangs verlängert. Die End-Region ist terminal redundant und findet sich daher sowohl am 5'- (5'r) als auch am 3'-Ende (3'r). G) Durch Bindung des Plusstrangs an die komplementäre 3'r-Region zirkularisiert das Genom. Die Plusstrang-Synthese wird vom 3'r aus weitergeführt. H) Die Elongation des Plusstranges führt zur relaxiert zirkulären (RC) DNA-Form des HBV-Genoms. I) Wird die Plusstrang-Synthese ohne Primer-Translokation vom DR1 aus initiiert (*in situ priming*) entsteht eine doppelsträngige, lineare (DL) DNA. Nach Liu *et al.* [24].

Von hier aus erfolgt die Synthese des DNA-Minusstrangs durch die Reverse-Transkriptase-Aktivität der Polymerase, wobei zeitgleich die pgRNA durch deren RNaseH-Aktivität abgebaut wird (Abb. 1.4C). Nur die letzten 17–18 nt am 5'-Ende der pgRNA inklusive DR1 und Cap-Struktur bleiben erhalten (Abb. 1.4D). Diese dienen nach ihrer Verlagerung an die komplementäre Sequenz des DR2 am 5'-Ende des DNA-Minusstrangs als Primer für die Synthese des DNA-Plusstrangs durch die DNA-Polymerase-Aktivität der viralen Polymerase (Abb. 1.4E). Gelangt die Elongation dabei an das 5'-Ende des Minusstrangs, erfolgt eine weitere Translokation der Polymerase an die redundante komplementäre Region r an dessen

3'-Ende und die Fortsetzung der Plusstrang-Synthese von dort. Dies bewirkt die Zirkularisierung des Genoms zur relaxiert zirkulären (rc) DNA (Abb. 1.4G, H). Bleibt der Matrizenwechsel von DR1 zu DR2 aus, kann die Synthese des Plusstrangs auch von DR1 erfolgen (sogenanntes *in situ priming*), so dass ein doppelsträngiges, lineares DNA-Molekül entsteht (Abb. 1.4I). Die Bedeutung dieser DNA-Form für die Replikation *in vivo* ist noch ungeklärt. Abgesehen von  $\epsilon$ , DR1, DR2 und r wurden kürzlich weitere in *cis* agierende Regionen identifiziert, die für die Synthese des Minus- oder Plusstrangs und die korrekte Bildung der rcDNA eine wichtige Rolle spielen [24,25,26,27]. Vermutlich tragen sie dazu bei, die für die verschiedenen Translokationen entscheidenden Bereiche der pgRNA bzw. des DNA-Minusstrang in die richtige Konformation und räumliche Nähe zu bringen. Ihre genaue Charakterisierung steht jedoch noch aus.

Nur reife Nukleokapside mit einem partiell doppelsträngigen DNA-Genom werden in einem post-Endoplasmatischen-Retikulum (ER)-/prä-Golgi-Kompartiment mit den in der ER-Membran eingelagerten Oberflächenproteinen umhüllt und über den konstitutiven sekretorischen Weg aus der Zelle freigesetzt [28,29,30] (Abb. 1.3). Während für die Verpackung der pgRNA und die DNA-Synthese eine Phosphorylierung des Core-Proteins nötig ist [31,32,33], dient wahrscheinlich die Dephosphorylierung der reifen Nukleokapside als Signal für deren Umhüllung und Sekretion [34]. Zur Umhüllung ist außerdem die spezifische Interaktion von bestimmten LHBS- und SHBS-Regionen mit dem Nukleokapsid essentiell [35,36]. Leere, nicht infektiöse subvirale Partikel (HBsAg), die aus den drei Oberflächenproteinen bestehen, können im Vergleich zu infektiösen Viren in 10000fachen Überschuss ins Blut ausgeschüttet werden. Besonders in der frühen Phase der Infektion entlassen reife Kapside ihre DNA auch wieder in den Nukleus, was zu einem Anstieg an cccDNA führt [37] (Abb. 1.3). Dieser Prozess wird vermutlich durch die Oberflächenproteine, insbesondere durch LHBS, reguliert, da das Fehlen von LHBS zu einem deutlichen Anstieg der cccDNA im Kern führt [38,39].

### 1.1.3 Regulatorische Elemente

Die virale Genexpression wird durch vier Promotoren kontrolliert, die ihrerseits durch zwei Enhancer (Enh) und diverse Transkriptionsfaktoren reguliert werden [5] (Abb. 1.2).

Der Core-Promotor (Cp) reguliert die Transkription der beiden 3,5 kb langen RNAs, der präC-mRNA und der pgRNA. Damit spielt er einerseits eine zentrale Rolle für die Steuerung der Virusreplikation und Translation von Core-Protein und Polymerase von der pgRNA und regelt andererseits die Synthese des HBeAg von der präC-mRNA. Der Initiationsort der längeren präC-mRNA liegt ca. 30 nt stromaufwärts vom Startpunkt der kürzeren pgRNA.



für die leberspezifische Promotoraktivität [47] und für die Feinabstimmung der Transkription der pgRNA und der präC-mRNA, die durch die Bindung der verschiedenen Faktoren sehr unterschiedlich beeinflusst wird [41,46,48]. Die aktivierende CURS- $\alpha$ -Box bindet zusätzlich u. a. das leberspezifische CCAAT/Enhancer-bindende Protein (C/EBP) oder verwandte Transkriptionsfaktoren (z. B. E4BP4) [49], den Fetoprotein-Transkriptionsfaktor (FTF) und den Hepatozyten-Leukämiefaktor (HFL, Abb. 1.5B) [5].

Die Transkription der LHBs-kodierenden 2,4-kb-präS1-mRNA wird durch den S1-Promotor (S1p, Genotyp A: nt 2716–2806) gesteuert (Abb 1.2). Er enthält als einziger HBV-Promotor eine klassische TATA-Box, hat Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren HNF1, TBP, Sp1, NF1 und HNF3 und wird durch Sequenzen im stromabwärts liegenden S2/S-Promotor negativ reguliert [5]. Der S2/S-Promotor (S2/Sp, Genotyp A: nt 2989–3216) reguliert die von allen HBV-RNAs am stärksten transkribierte präS2/S-mRNA, von der MHBs und SHBs translatiert werden. Er enthält ein CCAAT-Motiv, das die Produktion der präS2/S-mRNA stimuliert und die der präS1-mRNA unterdrückt. Sieben transkriptionelle Elemente mit teilweise funktioneller Redundanz binden Transkriptionsfaktoren, wie z. B. Sp1 [5]. Des Weiteren wird der S2/S-Promotor durch Akkumulation von LHBs im ER und die resultierende Induktion von ER-Stress stimuliert [50].

Die Synthese der 0,7-kb-mRNA für HBx erfolgt unter der Kontrolle des X-Promotors (nt 1171–1361), der mit dem 3'-Ende des EnhI überlappt [51]. Er enthält u. a. Bindungsorte für die Transkriptionsfaktoren NF1, C/EBP, ATF, AP1/Jun-Fos und das regulatorische X-Promotor-Binde-Protein (X-PBP) [5]. Das Tumorsuppressorprotein p53 kann ebenfalls binden und die Funktion des Promotors unterdrücken [52].

Der EnhI (nt 957–1361) [53] stimuliert insbesondere den X-Promotor und den Cp, in geringerem Maße aber auch die Transkription der beiden Oberflächen-mRNAs, und wird durch die Bindung verschiedener Transkriptionsfaktoren reguliert [5]. Er besteht aus 3 Domänen: dem 5' modulatorischen Element (ca. nt 957–1050), der zentralen Core-Domäne (nt 1050–1171) und der 3'-Domäne (nt 1171–1361), die mit dem X-Promotor überlappt. In der Core-Domäne, die starken Einfluss auf die HBV-Replikation hat [53], befinden sich u. a. Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren HNF3, NF1, HNF4, RXR $\alpha$ -PPAR $\alpha$ , COUP-TF1 und STAT3. Die 5'- und 3'-Elemente können durch Bindung weiterer Faktoren (z. B. C/EBP und HNF1) die Aktivität der Core-Domäne ca. 10fach steigern. Der EnhII überlappt stromaufwärts des BCP mit der CURS des Cp und hat einen stimulierenden Einfluss auf alle vier Promotoren (Abb. 1.5). Er setzt sich aus der  $\alpha$ -Box (siehe oben, nt 1644–1666) und  $\beta$ -Box (nt 1702–1713) der CURS zusammen und funktioniert nur bei Kooperation der beiden

Regionen [54]. Wie beim Cp wird seine Funktion durch die Interaktion diverser Transkriptionsfaktoren bestimmt, die an die CURS-Boxen binden. Noch stärker als der Cp wird die Aktivität des EnhII durch die NRE negativ beeinflusst [44]. Neuere Daten weisen auf eine wichtige Rolle der beiden Enh in der globalen und zeitlichen Regulation der HBV-Transkription hin [55]. Erst nach der Aktivierung des EnhI und der durch ihn regulierten frühen Genexpression des HBx beginnt die durch den EnhII regulierte Expression der späten (aller übrigen) Gene. Somit ist der EnhI autonom und essentiell für EnhII-Aktivität [55].

Neben den Promotoren und den Enh spielt auch das posttranskriptionell regulatorische Element (PRE, nt 1203–1515) eine Rolle in der HBV-Genexpression [56]. Es agiert in *cis* auf RNA-Level und fördert den Export ungespleißter Transkripte, die das PRE enthalten, vermutlich durch die Bindung zellulärer Proteine [57,58,59]. Die Bindung des Autoantigens La an das PRE ist entscheidend für die Stabilität der RNAs [60,61].

#### 1.1.4 Virale Genprodukte

##### 1.1.4.1 Produkte des C-ORF

Der C-ORF kodiert für das Core-Protein und das HBeAg. Er hat zwei *in frame* befindliche Startkodons, wobei die Region zwischen dem ersten (präC-ATG) und zweiten (C-ATG) Startkodon als präC-Region bezeichnet wird (Abb. 1.2).

Ausgehend vom C-ATG wird von der pgRNA im Zytoplasma das Core-Protein (21 kD) synthetisiert, das je nach Genotyp 183 bzw. 185 AS (Genotyp A: 185 AS) lang ist. Es ist N-terminal durch eine Assemblierungsdomäne (AS 1–144) und C-terminal ca. ab AS 150 durch eine argininreiche, nukleinsäurebindende Region charakterisiert, die für die Verpackung der pgRNA und Replikation benötigt wird [62]. Nach Expression bildet das Core-Protein sofort Homo-Dimere [63], die durch Disulfidbrücken zwischen den Cysteinen an Position 61 stabilisiert werden [64,65]. Neunzig oder 120 Dimere assemblieren spontan zusammen mit dem Prägenom-Polymerase-Komplex zum ikosaedrischen Partikel (Nukleokapsid), in dem auch zelluläre Faktoren, wie Chaperone und eine Proteinkinase, mitverpackt werden [33,66,67]. Basierend auf elektronenmikroskopischen Daten wurde ein Strukturmodell erarbeitet, nach dem das Core-Protein aus vier  $\alpha$ -Helices besteht, wobei die beiden inneren eine antiparallele Haarnadelstruktur bilden [68]. Die aus den Haarnadelstrukturen bestehenden *Spikes* liegen an der Oberfläche des Nukleokapsids und tragen das immunodominante HBcAg-B-Zellepitop (AS 74–89) [69]. Aufgrund der porösen Struktur der Kapsidoberfläche können Nukleotide frei ins und aus dem Kapsidlumen diffundieren.

Von der präC-mRNA wird, vom präC-ATG ausgehend, das Präcore-Polypeptid synthetisiert, das mit seinen im Vergleich zum Core-Protein N-terminal zusätzlichen 29 AS ein Vorläufer des HBeAg ist. Die in diesem Bereich lokalisierte Signalpeptidsequenz vermittelt den Transport des Proteins in das ER-Lumen [70], wo 19 AS am N-Terminus durch eine Signalpeptidase entfernt werden. Verbleibende AS der präC-Region verhindern eine Multimerisierung des Proteins. Durch weitere Abspaltung von AS am C-Terminus entsteht das 17 kD große HBeAg. Dieses wird von der Zelle sezerniert und zirkuliert im Blut, wo es serologisch nachweisbar ist [71]. Es wird weder für die Replikation noch für die Morphogenese oder Infektion benötigt. Aufgrund der ähnlichen Sequenzen von HBeAg und Core-Protein, haben beide überlappende T- und B-Zellepitope. Vermutlich hat das HBeAg eine duale Rolle. Während zytosolisches HBeAg Ziel einer inflammatorischen Immunantwort ist, scheint HBeAg im Serum eine immunregulatorische Funktion auszuüben, indem es T-Zell-Toleranz auslöst und damit auch eine HBcAg-spezifische zytotoxische T-Zell (CTL)-Antwort hemmt [72,73].

#### **1.1.4.2 Produkte des S-ORF**

Die Translation der 3 C-terminal identischen HBV-Oberflächenproteine LHBs, MHBs und SHBs wird *in frame* an drei verschiedenen ATGs initiiert, die den S-ORF in die 3 Domänen präS1, präS2 und S teilen (Abb. 1.2). Das große LHBs (400 AS) besteht aus der präS1-Region (AS 1–119), der präS2-Region (AS 120–174, gezählt vom Start der präS1-Domäne fortlaufend bis zum Start der S-Domäne) und der S-Region (AS 1–226). Das mittlere MHBs (281 AS) enthält die präS2- und S-Domänen, und das kleine SHBs (226 AS) besteht lediglich aus der S-Domäne. Die Gesamtheit der Oberflächenproteine bildet das so genannte HBs-Antigen (HBsAg), das Bestandteil der Virushülle ist, aber zum Großteil als sphärische oder filamentöse nichtinfektiöse HBsAg-Partikel von der infizierten Zelle sezerniert wird. Die sphärischen Partikel enthalten nur wenige Moleküle des LHBs, während ihr Anteil in den Filamenten höher, in den Viria aber am höchsten ist.

Die S-Domäne aller 3 Oberflächenproteine ist am Asparagin 146 und die präS2-Domäne im MHBs, aber nicht im LHBs, am Asparagin 124 N-glykosyliert [74,75]. Das LHBs ist am Glycin 2 myristoyliert [76]. Die Oberflächenproteine werden am ER synthetisiert und zeigen eine komplexe Membrantopologie [28].

Das SHBs bzw. die S-Domäne verfügt über 4 Transmembranregionen [77], wobei der N-Terminus zur luminalen Seite, die AS 23–79 als Schleife zur zytosolischen Seite, die AS 99–169 als Schleife wiederum zur luminalen Seite der ER-Membran zeigen und die C-terminalen AS 170–226 eingebettet in die Membran vorliegen. Die luminal Schleife wird nach dem

Budding auf der externen Oberfläche des Virions exponiert und trägt das Hauptepitop des HBsAg, die sogenannte „a“-Determinante, und 2 Subtyperdeterminanten (d oder y bzw. w oder r).

Beim MHBs liegen die N-terminal zusätzlichen 55 AS im ER-Lumen, und die Transmembranorganisation der S-Domäne ist mit der des SHBs identisch. Die Funktion des MHBs ist noch nicht gut verstanden, da das Protein an sich nicht essentiell für die Virusinfektion, Replikation, Morphogenese oder Sekretion zu sein scheint [78]. Gleichzeitig wird jedoch das für das MHBs spezifische N-Glykan für die Virion-Sekretion benötigt [79].

Bei der LHBs-Synthese wird zunächst nur die S-Domäne zum Teil in die ER-Membran inseriert, während die präS1- und präS2-Domänen sowie der N-Terminus des S auf der zytosolischen Seite verbleiben. Erst posttranslational werden bei etwa der Hälfte der Moleküle die präS-Regionen in das ER-Lumen transloziert [80,81,82]. Aufgrund der dualen Topologie des LHBs kann sich im Virion also die auf der Oberfläche exponierte präS-Region an Infektion und Rezeptorbindung beteiligen [11,12,83], während die präS-Domäne im Inneren des Virions zur Morphogenese mit dem Nukleokapsid interagieren kann [35,36,84]. Außerdem kann die präS2-Region bei zytosolischer Orientierung in der Zelle, wie im LHBs oder bei einer trunkierten Form des MHBs, als transkriptioneller Aktivator auf eine Reihe von Promotoren wirken [85,86,87,88,89]. Weiterhin enthält die präS2-Region ein Zell-Permeabilitäts-Motiv (TLM), dem eine Rolle bei der Fusion und Internalisierung der Viruspartikel zugeschrieben wird [90].

### 1.1.4.3 Polymerase

Das beginnend von einem internen Startkodon auf der pgRNA translatierte Polymerase-Protein ist je nach Genotyp 834–845 AS lang (Genotyp A: 845 AS) und hat ein Molekulargewicht von 90 kD. Es vermittelt die Verpackung des Prägenoms in das Nukleokapsid und synthetisiert darin das HBV-Genom. Das Protein, dessen ORF mit allen anderen des HBV-Genoms überlappt, setzt sich aus vier funktionellen Domänen zusammen [91]. N-terminal befindet sich die bei der Initiation der reversen Transkription als Proteinprimer fungierende Domäne des terminalen Proteins (AS 1–179) [92]. Sie wird gefolgt von einer Spacer-Region ohne enzymatische Aktivität (AS 180–348). An diese schließt sich die zentrale Domäne an, die bei der Minusstrangsynthese als Reverse Transkriptase (RNA-abhängige DNA-Polymerase) und bei der Elongation des Plusstranges als DNA-abhängige DNA-Polymerase aktiv ist (AS 349–692). Die virale Polymerase besitzt keine *Proof-reading*-Aktivität. Das hochkonservierte katalytische Zentrum ist das YMDD-Motiv (Tyrosin-

Methionin-Aspartat-Aspartat). Strukturmodelle konnten bisher nur begrenzt anhand der Homologie zur retroviralen Reversen Transkriptase erstellt werden [93,94]. C-terminal ist die RNaseH-Domäne lokalisiert (AS 693–845), die für die Entfernung der pgRNA nach der reversen Transkription sorgt.

#### **1.1.4.4 X-Protein**

Das nicht-strukturelle X-Protein des HBV (17 kD, 154 AS) agiert sowohl im Zytoplasma als auch im Kern infizierter Zellen. Ihm werden vielfältige, regulatorische Funktionen zugeschrieben, aber seine tatsächliche Rolle im HBV-Replikationszyklus ist nach wie vor ungeklärt. Grund hierfür sind Schwierigkeiten, das Protein im Kontext eines replizierenden Genoms (ohne Überexpression) nachzuweisen, und die Nutzung unterschiedlichster Testbedingungen. Zusammenfassend sind folgende Erkenntnisse festzuhalten: In einigen Systemen wie transgenen Mäusen und der humanen Hepatomazelllinie HepG2 wurde eine Steigerung der Replikation durch HBx beobachtet [95,96,97,98,99]. HBx wirkt als Transaktivator auf diverse Promotoren, u. a. indem es mit Komponenten der Transkriptionsmaschinerie oder Transkriptionsfaktoren wie dem TATA- oder dem *cAMP-response-element*-bindenden Protein TBP bzw. CREB interagiert, oder Transkriptionsfaktoren wie NFκB und AP1 beeinflusst [100,101]. Es hat selbst keine DNA-bindenden Eigenschaften. HBx kann verschiedene zytoplasmatische Signaltransduktionswege stimulieren, wobei vermutlich die Modulation des Kalziumspiegels im Zytosol durch HBx eine größere Rolle spielt [96,101]. Des Weiteren beeinflusst HBx Prozesse wie Apoptose, Zellzyklusregulation und DNA-Reparatur [99,100,102]. Aufgrund von Sequenzhomologien des X-ORF zu Kunitztyp-ähnlichen Serinprotease-Inhibitoren wird vermutet, dass das HBx als Proteasemmer wirken könnte [103]. Es wurde gezeigt, dass HBx sowohl als Substrat als auch als Inhibitor des Proteasoms agiert [104]. Auch eine Rolle bei der Entstehung des hepatozellulären Karzinoms wird diskutiert [105,106].

Die AS 52–148 sind essentiell für die diversen, beobachteten Eigenschaften des HBx [107]. Insbesondere liegen Transaktivierungsdomänen bei den AS 60–76 und AS 110–139 [108], während die AS 1–20 eine negativ regulierende Funktion für die Transaktivierung ausüben [109,110].

## 1.2 Die HBV-Infektion

### 1.2.1 Klinische Formen der Hepatitis B

Das HBV wird durch Blut und Blutprodukte bzw. durch sexuellen Kontakt über virushaltige Körperflüssigkeiten übertragen. Eine HBV-Infektion kann abhängig vom Alter bei Infektion, dem Infektionsmodus und dem Immunstatus inapparent, akut, fulminant oder chronisch verlaufen. Bei immunkompetenten Erwachsenen heilt die akute Hepatitis meist aus und resultiert in einer lebenslangen Immunität. In weniger als 1 % der Fälle kommt es zur fulminanten Hepatitis B, die in ca. 70 % in rasantem Tempo zum Leberversagen führt. Ca. 5 % der infizierten immunkompetenten Erwachsenen entwickeln eine chronische Hepatitis B, d. h. eine länger als 6 Monate andauernde Persistenz von HBsAg. Sie kann von einer asymptomatischen Form bis zur chronisch-aktiven Hepatitis mit fortschreitender Leberschädigung und Entwicklung einer Leberzirrhose (LZ) reichen. Häufig kommt es auch bei milden Verläufen mit niedriger Virämie immer wieder zu Schüben mit erhöhten Alaninaminotransferase (ALAT)-Werten, die eine Leberschädigung anzeigen. In allen Fällen ist die Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms (HCC) möglich. Eine vertikale Übertragung des Virus, meist perinatal von der Mutter auf das Kind, resultiert in etwa 90 % der Fälle, häufig ohne Auftreten einer akuten Phase, in einer chronischen Hepatitis, die nach vielen Jahren ohne Symptome über eine LZ zum HCC führen kann.

### 1.2.2 Pathogenese der HBV-Infektion

Das Wildtyp (Wt)-HBV selbst ist nicht zytopathogen, was erklärt, warum viele chronische HBV-Träger trotz starker viraler Replikation keine Symptome zeigen [111]. Die Pathogenese der Hepatitis B wird vielmehr durch das wirtseigene Immunsystem hervorgerufen. Es wurde gezeigt, dass die antigenspezifische antivirale zelluläre Immunantwort eine Reihe von unspezifischen Effektorsystemen auslöst, die in ihrer Gesamtheit sowohl zur Viruselimination als auch zur Leberzellschädigung führen können (siehe Übersichtsarbeit [112]). Dennoch ist die Immunantwort auf HBV und ihre Rolle in der Pathogenese noch nicht vollständig verstanden.

Die Heilung einer akuten selbstlimitierenden Hepatitis B ist typischerweise mit einer starken T-Zellantwort assoziiert. Dabei liegt sowohl eine starke MHC-Klasse-II-restringierte CD4<sup>+</sup> T-Helfer (Th)-Zellantwort gegen HBc/HBeAg, Polymerase und eine schwächere gegen die Oberflächenproteine vor als auch eine ausgeprägte polyklonale MHC-Klasse-I-

restringierte CD8<sup>+</sup> CTL-Anwort gegen multiple Epitope aller viralen Proteine [113,114]. Die HBV-spezifischen CTLs erkennen und vernichten infizierte Zellen. Die Viruselimination erfolgt vermutlich jedoch hauptsächlich durch einen nichtzytolytischen Mechanismus, bei dem eine durch HBV-spezifische T-Zellen vermittelte Ausschüttung inflammatorischer Zytokine wie Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) und Interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) die Hemmung der viralen Genexpression und Replikation bewirkt [115,116,117,118,119]. Da das Ausmaß der Leberzellschädigung nicht mit dem Auftreten und der Zerstörung durch CTLs korreliert [120], sind wahrscheinlich auch sekundäre, durch CTLs ausgelöste nichtantigenspezifische Nebenprodukte der inflammatorischen Antwort, wie z. B. TNF, freie Radikale oder Proteasen, und/oder andere Immunzellen, wie natürliche Killerzellen, darin involviert [113,121].

Bei chronisch Infizierten ist eine CTL-Antwort kaum nachweisbar [114]. Eine ineffektive Immunantwort und insbesondere fehlende oder mangelhafte T-Zell- und CTL-Antworten gegen HBcAg/HBeAg sind wahrscheinlich entscheidend für die Viruspersistenz [122]. Die hohe Chronifizierungsrate nach einer vertikalen Mutter-Kind-Übertragung lässt sich mit der neonatalen Immuntoleranz erklären [123]. Bei Erwachsenen können Faktoren wie eine hohe Viruslast zu Beginn der Infektion, der HLA-Typ, eine Immunsuppression, eine gehemmte Präsentation viraler Antigene oder das Auftreten von Virusmutanten, die sich der Antigenerkennung durch T-Zellen und Antikörper entziehen, zu einem chronischen Verlauf beitragen.

Antikörper werden (auch bei chronischer Infektion) gegen alle viralen Proteine produziert. Die Antikörper gegen HBsAg wirken neutralisierend, d. h. sie blockieren die Virusausbreitung im Blut und können vor einer Reinfektion schützen. Die bereits in der frühen Phase der Infektion auftretenden und lebenslang nachweisbaren Antikörper gegen HBcAg sind dagegen nicht virusneutralisierend. Ihre Bedeutung ist unklar, genauso wie die der Antikörper-Antwort gegen Epitope des P- und des X-Proteins. Antikörper gegen HBeAg treten meist mit oder nach dem Verschwinden von HBeAg aus dem Serum auf und können dann über Jahre persistieren. In einer chronischen Infektion ist die Serokonversion zu Anti-HBeAg meist mit einem starken Abfall der Viruslast, Abnahme der Entzündungsaktivität und daher mit einer guten Prognose assoziiert [124]. Reaktivierungen sind aber nicht ausgeschlossen.

### *1.2.3 Besonderheiten der HBV-Infektion bei immunsupprimierten Nierentransplantatempfängern*

Niereninsuffiziente Patienten, die Dialyse benötigen, gehören zu den Hochrisikogruppen für

eine HBV-Infektion, obwohl das Infektionsrisiko in Westeuropa und Nordamerika durch verbesserte Diagnostik und Hygienemaßnahmen bereits deutlich reduziert werden konnte [125]. Bei ihnen verlaufen HBV-Infektionen meist mild, werden aber aufgrund einer stark veränderten T-Zell-vermittelten Immunität zu einem hohen Prozentsatz chronisch (80 % im Vergleich zu 15 % bei nichturämischen Patienten) [126,127,128]. Auch HBV-Impfungen schlagen in diesen Patienten nur schlecht an [129]. Erfolgt eine Nierentransplantation, wird der Patient zur Verhinderung von Abstoßungsreaktionen permanent immunsupprimiert. Meist werden verschiedene Immunsuppressiva mit synergistischem Effekt kombiniert. Neben Glukokortikoiden (Prednisolon, Methylprednisolon) werden inzwischen häufig u. a. Azathioprin, Mycophenolat Mofetil, Ciclosporin A, FK506 und Rapamycin eingesetzt. Nach der Nierentransplantation und Immunsuppression besteht bei Transplantierten mit chronischer HBV-Infektion ein deutlich erhöhtes Risiko für die Entwicklung schwerer Lebererkrankungen [130]. Nach einer langen Phase sehr milder Hepatitis kommt es häufig zu einer fortschreitenden Verschlechterung der Leberfunktion, Entwicklung einer LZ mit Leberversagen und erhöhter Letalität [131,132,133]. Es konnte gezeigt werden, dass die schweren Verläufe mit einer Akkumulation und Persistenz von HBV-Varianten mit komplexen Mutationen im Cp, Deletionen im C-Gen und zum Teil mit zusätzlichen Deletionen in der präS-Region assoziiert waren (siehe unten) [134]. Da eine Immunpathogenese in diesen Patienten äußerst unwahrscheinlich ist, könnten die komplexen Varianten eine Rolle bei der Entwicklung der schweren Lebererkrankung spielen. Außerdem ist bekannt, dass Glukokortikoide die HBV-Replikation und -Proteinexpression steigern können, indem sie über ein zytoplasmatisches Rezeptorprotein an ein *glucocorticoid responsive element* (GRE) [135] auf dem HBV-Genom binden [136,137]. Auch dies könnte zur negativen Entwicklung des Krankheitsverlaufs beitragen. Generell ist der Einfluss der Immunsuppression auf HBV und Pathogenese jedoch nach wie vor wenig untersucht [138].

Eine weitere besondere Verlaufsform der chronischen Hepatitis bei Nierentransplantatempfängern [139] und anderen stark immunsupprimierten Patienten (z. B. anderen Transplantatempfängern [140] oder HIV-Koinfizierten [141]) ist die fibrosierende cholestatische Hepatitis (FCH). Sie ist charakterisiert durch ein plötzlich einsetzendes, rasantes Leberversagen bei starker Virusreplikation, aber nur moderater Entzündungsreaktion und kaum immunvermittelter Leberschädigung [142]. Daher wird auch hier ein Zusammenhang der Pathogenese mit einem direkten zytopathischen Effekt durch bestimmte HBV-Varianten vermutet, die eine Überexpression und intrazelluläre Akkumulation von HBV-Proteinen zeigen [142,143,144].

### 1.2.4 Therapie

Da eine chronische Hepatitis B mit Entzündungsaktivität, insbesondere bei HBeAg-positiven Patienten, mit einem stark erhöhten Risiko für die Entwicklung einer LZ oder eines HCC einhergeht [145,146], werden solche Patienten mit dem Ziel der Verbesserung der Leberwerte, einer Reduzierung der Viruslast und einer Serokonversion zu Anti-HBeAg therapiert. Eine komplette Heilung der Infektion mit dauerhaftem Verschwinden der HBV-DNA und Serokonversion von HBsAg zu Anti-HBs wird zur Zeit nur sehr selten (1–5 % der Patienten) erreicht.

Für die Behandlung steht zum einen das immunstimulatorische Zytokin Interferon  $\alpha$  (IFN $\alpha$ ) zur Verfügung. Es ist in ca. 30 % der Fälle wirksam und führt zur anhaltenden Unterdrückung der Virusreplikation, verbunden mit einer Serokonversion von HBeAg zu Anti-HBeAg und einer Verbesserung der Leberfunktionswerte [147]. Allerdings geht die IFN $\alpha$ -Therapie mit starken Nebenwirkungen einher und ist für Immunsupprimierte (wie z. B. Nierentransplantierte) und Patienten mit schwerer Lebererkrankung aufgrund der Immunstimulation ungeeignet.

Seit einiger Zeit wird daher das Nukleosidanalogen Lamivudin (3TC), und seit 2002/2003 auch das Nukleotidanalogen Adefovir (ADV), zur Therapie eingesetzt [113]. Diese Substanzen bewirken eine direkte, starke Hemmung der Virusreplikation durch Kettenabbruch bei der Synthese der viralen DNA durch die Reverse Transkriptase. Beide führen zu einem schnellen Absinken der Viruslast, sind gut verträglich und für alle Patientengruppen einsetzbar [148]. Problematisch ist jedoch die Selektion von Resistenzmutationen, die nach einem Jahr bei ca. 18–20 % der mit 3TC und bei ca. 2 % der mit Adefovir behandelten Patienten auftreten. Außerdem findet keine Eliminierung der viralen cccDNA im Kern statt, so dass auf die Beendigung der Therapie Rezidiven der chronischen Infektion folgen. Das früher verwendete Nukleosidanalogen Famciclovir (FCV) wird aufgrund seiner geringen Wirksamkeit, der notwendigen hohen Dosierung und der häufigen Entwicklung von Resistenzen heute nicht mehr eingesetzt. Seit März 2005 ist ein zusätzlicher, hochwirksamer Hemmstoff der HBV-Polymerase, das Nukleosidanalogen Entecavir, von der U.S.-amerikanischen *Food and Drug Administration* FDA zur Behandlung von HBV-Infektionen freigegeben [149]. Entecavir wirkt auch bei 3TC-resistenten HBV, und bisher wurden nach einem Jahr Therapie keine Entecavir-Resistenzmutationen beobachtet. Weitere Nukleosid-/Nukleotidanaloga wie Tenofovir und Emtricitabine befinden sich in unterschiedlichen Phasen der klinischen Erprobung.

## 1.3 HBV-Varianten

### 1.3.1 Entstehung und Selektion von HBV-Varianten

Während der HBV-Replikation entstehen durch fehlerhaften Nukleotideinbau der HBV-Polymerase bei der reversen Transkription aufgrund der abwesenden *Proof-reading*-Funktion in hohem Maße Punktmutationen im gesamten Genom. Die Fehlerrate der HBV-Polymerase ist dabei vergleichbar mit anderen bekannten Reversen Transkriptasen der Retroviren [150]. Auch Fehler der zellulären RNA-Polymerase bei der Synthese der pgRNA tragen zur Mutationsrate bei. Da durch die überlappenden Leserahmen im komplexen HBV-Genom jedoch viele Nukleotidaustausche nicht toleriert werden und zu Polymerase- und replikationsdefekten Viren führen [151], liegt die Häufigkeit von Punktmutationen bei HBV *in vivo* zwischen der anderer DNA- und RNA-Viren [150,152]. Zusätzlich entstehen Deletionen und Insertionen, vermutlich durch Prozesse wie *template-switching* der Polymerase während der reversen Transkription, Spleißen der pgRNA, TopoisomeraseI-Spaltung und Ligation der HBV-DNA oder nicht-homologe Rekombination linearer HBV-DNA-Moleküle [153].

Somit bestehen HBV-Populationen *in vivo* aus einer Mischung verschiedenster Varianten (Quasispezies), die sich individuell innerhalb des Wirtes entwickelt hat und durch Faktoren wie immunselektiven Druck oder antivirale Therapie beeinflusst werden kann. Verschiedene Stadien einer chronischen Hepatitis scheinen durch Varianten mit unterschiedlichen Mutationsmustern charakterisiert zu sein [124]. Im Verlauf einer Infektion können Varianten selektiert und angereichert werden, die der Situation im Wirt besser angepasst sind und gegenüber dem Wt Vorteile wie eine verstärkte Replikation, Immun-*escape*- oder Resistenzmutationen haben. Allerdings können sich Varianten in der Population nur halten, wenn ihre Replikationsfähigkeit erhalten bleibt. Viele Varianten, die aufgrund defekter Core- oder Oberflächenproteine nicht eigenständig replizieren oder keine kompletten Viren bilden können, benötigen zum Überleben die *trans*-Komplementation durch den Wt. Dabei werden defekte Varianten-Proteine durch die funktionstüchtigen Proteine eines Wt, der dieselbe Zelle infiziert hat, ersetzt [154]. Nur die *Trans*-Komplementation der Polymerase ist ineffizient, da diese bevorzugt mit der eigenen pgRNA verpackt wird [22]. Daher führen Mutationen, die die Funktion der Polymerase beeinträchtigen, häufig zu vollständig replikationsunfähigen Varianten. Gleiches kann für ungünstige Sequenzveränderungen in anderen, nichtkodierenden, für die pgRNA-Synthese oder Replikation essentiellen Bereichen, wie z. B. dem Verpackungssignal  $\epsilon$  oder den DR, gelten. Grundsätzlich ist die Variabilität des HBV-

Genoms durch die Überlappung der verschiedenen ORFs und regulatorischen Sequenzen stark eingeschränkt, da ein Nukleotidaustausch meist mehr als nur eine Funktion beeinflusst.

### *1.3.2 Häufig auftretende Varianten*

In natürlich auftretenden HBV-Varianten sind Mutationen in allen Genabschnitten und regulatorischen Sequenzen beschrieben worden, von denen einige mit bestimmten Verlaufsformen der Hepatitis in Verbindung gebracht wurden (für eine umfassende Übersicht siehe Referenzen [124,153,155]).

Varianten, die aufgrund von Mutationen in der präC-Region kein HBeAg synthetisieren, treten besonders bei chronischer Hepatitis während der Serokonversion zu Anti-HBeAg auf. Gleiches gilt für Punktmutationen im C-Gen, die meist in den immundominanten Epitopen außerhalb der Sequenzen für Dimerisierung und Assemblierung lokalisiert sind. Deletionen im C-Gen liegen vorwiegend *in frame* in der zentralen Region, so dass die Funktion der Polymerase nicht zerstört wird. Die häufigsten Mutationen im Cp/EnhII stellen Nukleotidaustausche bei nt 1762 (A>T) und 1764 (G>A) dar. Sie führen, wie auch andere Cp-Mutationen, zu verminderter HBeAg-Synthese und wurden vermehrt bei Patienten mit aktiver chronischer bzw. fulminanter Hepatitis nachgewiesen. Mutationen im Cp, insbesondere Deletionen und Insertionen, resultieren meist auch in einer Verschiebung des Leserasters und Trunkierung des X-Proteins. Die Oberflächenproteine mutieren u. a. in der immunogenen a-Determinante und entgehen damit dem selektiven Druck durch protektive und neutralisierende Anti-HBs-Antikörper, die während einer natürlichen Infektion oder nach einer Impfung gebildet werden. Deletionen im präS-Bereich wurden mit fulminanter Hepatitis, FCH und/oder HCC in Verbindung gebracht. Sie können die Balance der stark regulierten Oberflächenproteinexpression stören und damit eine intrazelluläre Akkumulation und zytotoxische Wirkung der Oberflächenproteine verursachen. In der Polymerase werden während antiviraler Therapie Resistenzmutationen selektiert. Klassische Resistenzmutationen gegen 3TC sind AS-Austausche im hochkonservierten aktiven Zentrum (YMDD-Motiv) der reversen Transkriptase.

### *1.3.3 HBV-Varianten bei Immunsupprimierten, insbesondere bei Nierentransplantierten*

Viele dieser HBV-Varianten treten auch oder sogar bevorzugt in immunsupprimierten Patienten auf. Dazu zählen u. a. Mutationen im Cp/X-Gen, die dort z. B. neue HNF1-Bindungsstelle schaffen [156,157,158], Deletionen im C-Gen [159] und präS-Bereich

[140,156] sowie Punktmutationen im S-Gen [160] bzw. Stoppkodonmutationen im präS- und S-Bereich [134].

In Langzeit-immunsupprimierten Nierentransplantierten konnte gezeigt werden, dass die Akkumulation und Persistenz von komplexen Varianten mit Deletionen/Insertionen im Cp/X-Gen, Deletionen im C-Gen und teilweise zusätzlichen Deletionen in der präS-Region signifikant mit schwerer Lebererkrankung und der Entwicklung von LZ assoziiert waren [134]. Die Deletionen und Insertionen im Cp traten im Verlauf der Infektion zuerst auf und waren allein noch nicht mit LZ assoziiert. Später im klinischen Verlauf reicherten dann zusätzlich Deletionen im C-Gen und/oder präS-Bereich an. Die Akkumulation der komplexen Varianten ging der Diagnose einer LZ in der Regel um 0,5 bis 1,5 Jahre voraus. Die genaue Größe und Position der Deletionen/Insertionen konnte sich von Patient zu Patient deutlich unterscheiden. Generell waren zu Beginn des Verlaufs Cp-Deletionen am häufigsten, die später durch zusätzliche Insertionen ergänzt wurden. Die C-Gendeletionen waren *in frame* und lagen meist im zentralen Bereich des Core-Proteins (AS 77–114). Obwohl in einem Patienten mehrere verschiedene Typen von Deletionen in C-Gen und präS-Region auftraten, akkumulierte davon meist nur einer in späteren Stadien der Erkrankung. In allen Patienten koexistierten jedoch zu nahezu allen Zeitpunkten Genome mit den verschiedensten Kombinationen von Mutationen und verursachten eine große Heterogenität der HBV-Population. Da aufgrund der Immunsuppression in diesen Patienten eine ausschließlich immunvermittelte Pathogenese der LZ unwahrscheinlich ist (vgl. Abschnitt 1.2.3), ist eine direkte Rolle der HBV-Varianten in der Pathogenese zu vermuten. Diese Hypothese wird durch die Tatsache unterstützt, dass ein günstigerer Verlauf der Lebererkrankung zu beobachten war, wenn die komplexen Varianten selektiv nach antiviraler Therapie mit 3TC oder nach Absetzen der Immunsuppression verschwanden [159]. Letzteres macht außerdem deutlich, dass die komplexen Varianten offensichtlich während der Immunsuppression einen Selektionsvorteil haben.

Generell wurden Varianten mit Deletionen im C-Gen über längere Zeit hauptsächlich in Patienten mit einer verminderten Immunantwort gefunden. So wurden sie neben den Transplantierten unter medikamentöser Immunsuppression [159,161] auch bei chronisch Infizierten in der Immuntoleranzphase [124], in durch vertikale Übertragung infizierten Patienten [162] und in Patienten ohne Anti-HBcAg [163,164] nachgewiesen. Nach Transplantation scheinen C-Gendeletionsvarianten insbesondere bei seit langem HBV-infizierten Nierentransplantierten ohne vorhergehenden Leberschaden, aber (abgesehen von seltenen Ausnahmen) nicht bei *de novo* infizierten Herztransplantierten oder bei aufgrund von

Leberversagen Lebertransplantatierten aufzutreten [161]. In immunkompetenten chronisch infizierten Patienten waren C-Gendelektionsvarianten, im Gegensatz zu den Immunsupprimierten, zunächst mit einer Aktivierung der Hepatitis, dann aber mit verbesserter Leberfunktion und sinkender Viruslast (d. h. einer guten Prognose) assoziiert und verschwanden während der HBe-/Anti-HBe-Serokonversion [162].

Auch Deletionen und Insertionen im Cp, die neue HNF1-Bindungsstelle schaffen, akkumulierten grundsätzlich besonders in Patienten mit reduzierter Immunantwort, wie z. B. in Herz-, Leber- oder Nierentransplantatierten [156,157,165] oder anderen Immunsupprimierten [166,167]. Eine 11-nt-Insertion im Cp war dabei mit dem Auftreten von fulminanter Hepatitis verbunden [156,166]. Bei Stimulation der Immunantwort, Serokonversion zu Anti-HBeAg oder in der HBeAg-negativen Phase in immunkompetenten Patienten verschwanden die HNF1-Varianten [168], was den Vorteil auch dieser Varianten bei unterdrückter Immunantwort demonstriert.

Varianten mit verschiedensten Deletionen in der präS-Region können sowohl in immunsupprimierten als auch in immunkompetenten Patienten auftreten und akkumulieren [124,153]. Dabei waren Varianten mit präS1-Deletionen bei Immunsupprimierten nach Herztransplantation mit fulminanter Hepatitis [156] und nach Lebertransplantation mit FCH [140] und intrazellulärer Virusretention [169] assoziiert. In einem lebertransplantierten Patienten mit fulminanter Hepatitis trat eine ungewöhnliche Kombination verschiedener AS-Austausche im S-Gen auf, die zur Retention der Oberflächenproteine im ER und einer stark reduzierten Virussekretion führte [160].

Im Gegensatz zur Studie von komplexen Varianten in Nierentransplantatierten wurden in vielen der zitierten Arbeiten zu Mutationen in Cp, C-Gen und präS-Region nur Teilbereiche des HBV-Genoms analysiert. Daher bleibt in diesen Fällen unklar, ob neben den untersuchten noch weitere Mutationen in anderen Genomabschnitten vorlagen.

## **1.4 Funktionelle Analyse von HBV-Genomen**

Zur Untersuchung der Rolle von HBV-Varianten in der Pathogenese der chronischen Hepatitis B sind funktionelle Analysen, d. h. die Charakterisierung ihrer Replikation, Transkription, Proteinexpression etc., erforderlich. Vor allem die Evaluierung der Replikation ist nur bei in voller Länge eingesetzten HBV-Genomen möglich.

### *1.4.1 Modellsysteme*

Zurzeit steht für funktionelle Analysen von HBV-Genomen oder komplexen HBV-

Populationen kein zufriedenstellendes Tiermodell zur Verfügung. Aufgrund des engen Wirtsspektrums des HBV sind Schimpansen und die nahe mit Primaten verwandten Spitzmäuse *Tupaia belangeri* die einzigen bekannten mit HBV infizierbaren Tiere. Schimpansen kommen jedoch wegen hoher Kosten und eingeschränkter Verfügbarkeit (Ethik, Tierschutz) nicht für diese Untersuchungen in Frage, während eine niedrige Infektionseffizienz die Einsetzbarkeit der Tupaia beeinträchtigt [170,171]. Tiermodelle wie die Ente oder das Waldmurmeltier, die sich mit den animalen Hepadnaviren DHBV und WHV infizieren lassen, sind nur eingeschränkt auf das humane System übertragbar. Es wurden diverse transgene Maus-Modelle entwickelt, bei denen HBV entweder über in Mauschromosomen integrierte HBV-DNA produziert wird [172] oder immundefizienten Mäusen menschliche oder Tupaia-Hepatozyten transplantiert wurden [173,174,175,176]. Dies erlaubt die Untersuchung spezifischer Fragestellungen, z. B. der Immunpathogenese, spiegelt jedoch nicht die natürliche Infektion wider. Ein großes Problem dieser Modelle ist außerdem der Mangel an gesunden primären menschlichen Hepatozyten für die Transplantation der Mäuse. Daher wurden kürzlich erstmals auch Tupaia-Hepatozyten dafür verwendet [177].

Aber auch *in-vitro*-Zellkultur-Experimenten sind Grenzen gesetzt, da nur primäre Hepatozyten direkt mit HBV infizierbar sind und auch diese in Zellkultur sehr schnell nonpermissiv für die HBV-Infektion werden. Als Alternative zu den schwer verfügbaren humanen Hepatozyten werden auch hier inzwischen Tupaia-Hepatozyten eingesetzt [13,178,179,180]. Zusätzlich kann die natürliche Variabilität der primären Hepatozyten für konstante Ergebnisse zum Problem werden. Erst seit kurzem existiert eine infizierbare Hepatozyten-Zelllinie (HepaRG), die inzwischen für erste Untersuchungen insbesondere der frühen Schritte des HBV-Replikationszyklus eingesetzt wird [12,181]. Funktionelle Analysen werden gegenwärtig am häufigsten mittels Transfektion von HBV-DNA in humane Hepatomazelllinien (meist HuH7 oder HepG2) durchgeführt. Die Zelllinien produzieren nach Transfektion wie *in vivo* replikative Intermediate, alle RNA-Transkripte und Proteine sowie subvirale und infektiöse Viruspartikel. Große Vorteile des *in-vitro*-Transfektionssystems sind die Verfügbarkeit und die kostengünstige Haltung der Zellen sowie die relativ unkomplizierte Durchführung der Experimente. Nachteile sind die niedrige Effizienz der Transfektion im Vergleich zur Infektion und die daraus resultierenden Probleme beim Nachweis der viralen Proteine, Nachkommen-Viren etc. Außerdem ist nach wie vor unklar, ob sich, wie in der natürlichen Infektion, im Zellkern cccDNA anreichert. Da keine Infektion der Zellen erfolgt, ist das *in-vitro*-Transfektionssystem für Untersuchungen zur Aufklärung der ersten Schritte des Replikationszyklus ungeeignet.

Die HBV-DNA wird üblicherweise kloniert, entweder in Form von monomeren Genomen [182], als Tandem-Dimer [183,184] oder als HBV-Genom mit 1,3facher Länge, für die Transfektion eingesetzt. In beiden letzteren Fällen ist keine Rezirkularisierung des Genoms zur Transkription der RNAs und Replikation nötig. Um Speziesbarrieren zu umgehen, Replikation und Genexpression zu steigern und das Feld der Untersuchungsmöglichkeiten zu erweitern, wurden Systeme wie z. B. Adenovirusvektoren [171,185] oder das rekombinante Baculovirussystem [186,187] entwickelt und erfolgreich eingesetzt. Ein entscheidender Vorteil der nach einer Methode von Günther *et al.* [182] hergestellten HBV-Monomer-Klone ist die Möglichkeit, sie direkt aus Patienten-Proben zu klonieren und ohne weitere zeitaufwendige Manipulation für die Transfektion einzusetzen. Dies lieferte die Voraussetzung für strukturelle und funktionelle Analysen von großen Anzahlen natürlich auftretender HBV-Genome aus heterogenen Populationen, wie sie in der vorliegenden Arbeit an den mit LZ in Nierentransplantierten assoziierten Varianten [134] durchgeführt wurden.

#### *1.4.2 Funktionelle Analysen von künstlich generierten Hybridgenomen*

Die meisten funktionellen Analysen von in Patienten beobachteten HBV-Varianten wurden durchgeführt, indem mutierte Abschnitte oder auffällige individuelle Mutationen einzeln in ein Wt-Genom eingebracht wurden. Auf diese Weise konnten gezielt die Auswirkungen genau dieser Mutationen auf den Phänotyp im Vergleich zum Wt-HBV untersucht werden. Auch im Falle der komplexen Varianten bei Nierentransplantierten wurden bereits solche Hybridgenome funktionell charakterisiert, die entweder den Cp [157] oder das C-Gen mit Deletion [188] der Varianten im Kontext eines Wt-Genoms enthielten. Sie zeigten einen deutlich vom Wt abweichenden Phänotyp. Hybridvarianten mit C-Gendeletionen, die aufgrund des defekten Core-Proteins allein nicht replikationsfähig waren, replizierten bei Komplementation mit ausreichend Wt-Core-Protein verstärkt [188] und reicherten sich nach Kotransfektion mit einem Wt-Genom an [188,189]. Die im Cp verschiedene neue HNF1-Bindungsstellen schaffenden Mutationen, wie z. B. eine 11-nt-Insertion bei nt 1776/1777 oder eine 8-nt-Deletion bei nt 1763-1770, führten ebenfalls zu verstärkter Replikation, häufig in Kombination mit reduzierter Expression der Oberflächen-mRNAs, der Oberflächenproteine LHBs und MHBs sowie verminderter Sekretion von HBsAg [156,157,190].

Es ist jedoch inzwischen bekannt, dass die Auswirkungen von Mutationen durch weitere Mutationen im selben oder in anderen Genomabschnitten stark beeinflusst, z. B. kompensiert oder verstärkt, werden können [191,192,193,194]. Daher bleibt unklar, ob sich die phänotypischen Konsequenzen einzeln analysierter Mutationen oder mutierter Regionen auch

im Kontext eines komplexen Mutationsmusters wiederfinden. Um den Beitrag viraler Faktoren zur Pathogenese und ihre Interaktion mit der Zelle verstehen zu können und um Zusammenhänge zwischen klinischen Verläufen und bestimmten HBV-Varianten aufzuklären, sind also funktionelle Analysen von kompletten HBV-Genomen, wie sie im Patienten vorliegen, erforderlich.

#### *1.4.3 Funktionelle Analysen von kompletten, natürlich auftretenden Genomen*

Trotz der Erkenntnis, dass komplette Genome mit vielen Mutationen einen anderen Phänotyp als konstruierte Hybridgenome haben können, wurden bisher nur wenige funktionelle Analysen von in voller Länge klonierten und sequenzierten, natürlich auftretenden HBV-Varianten durchgeführt (für eine kurze Übersicht siehe Referenz [195]). Gründe dafür sind sicherlich der enorme experimentelle Aufwand und die Schwierigkeit, konkrete Schlussfolgerungen aus den komplexen Ergebnissen zu ziehen.

In einigen Studien wurde ausschließlich die Replikationseffizienz von kompletten Varianten untersucht [156]. Dabei wurden bei der strukturellen und funktionellen Analyse von HBV-Isolaten aus chinesischen Patienten mit HCC Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen stark replizierenden Varianten und der Pathogenese gefunden [196]. Die umfassende funktionelle Charakterisierung von HBV-Varianten aus 2 Patienten mit Reaktivierung nach latenter, HBsAg-negativer HBV-Infektion konnte dagegen deren verminderte Replikationskompetenz und teilweise defekte HBsAg-Expression nachweisen [16]. Eine große Anzahl natürlich vorkommender Varianten mit verschiedenen Cp-Punktmutationen (insbesondere bei nt 1762/1764 plus weiterer Punktmutationen, z. B. bei nt 1753 und/oder 1766) wurden aus Serum chronischer HBeAg-positiver HBV-Träger untersucht [192]. Replikationseffizienz, HBeAg- und HBsAg-Expression sowie Virusekretion schwankten, abhängig vom detaillierten Mutationsmuster im Cp, erheblich. Der Einfluss der zusätzlich außerhalb des Cp vorliegenden Mutationen wurde jedoch nicht diskutiert. Um den Zusammenhang zwischen viralen Veränderungen und dem Fortschreiten der Erkrankung zu klären, sequenzierten und transfizierten Kajiya *et al.* direkt die Produkte einer Gesamtgenom-PCR aus mehreren Serumproben eines chronisch infizierten Patienten [197]. Dabei war das Auftreten von Mutationen im präS-Bereich und im Cp mit einer erhöhten Replikation und vermindertem HBsAg und HBeAg sowie mit dem Aufflammen der Hepatitis assoziiert.

Die bisher intensivsten funktionellen Analysen kompletter Genome wurden an HBV aus Patienten mit fulminanter Hepatitis durchgeführt [156,160,198,199,200]. Jedoch wurden kein spezifisches Mutationsmuster und kein gemeinsamer Phänotyp, der für die Entwicklung der

fulminanten Hepatitis verantwortlich gemacht werden konnte, gefunden. Es wurden lediglich bei vielen Genomen verschiedene Cp-Mutationen nachgewiesen.

## 2 Zielsetzung

In Langzeit-immunsupprimierten Nierentransplantatempfängern mit chronischer HBV-Infektion ist die Entwicklung von LZ signifikant mit der Akkumulation und Persistenz von komplexen HBV-Varianten mit Mutationen im Cp/X-Gen, Deletionen im C-Gen und teilweise zusätzlichen Deletionen in der präS-Region assoziiert [134]. Die Immunsuppression macht eine ausschließlich immunvermittelte Pathogenese der Hepatitis in diesen Patienten unwahrscheinlich. Da auch das selektive Verschwinden der komplexen Varianten nach Absetzen der Immunsuppression oder nach antiviraler Therapie mit 3TC mit einem günstigeren Verlauf der Lebererkrankung verbunden war [159], könnten diese eine direkte Rolle in der speziellen Pathogenese bei Nierentransplantatempfängern spielen.

Das Ziel dieser Arbeit war es, mittels funktioneller Analyse der Varianten Hinweise auf ihren potentiellen Beitrag zur Pathogenese zu erlangen. Untersuchungen von künstlich generierten Hybridgenomen, die entweder die C-Gen deletionen oder Cp-Mutationen der komplexen Varianten in einem Wt-Genom-Kontext enthielten, wiesen bereits auf einen im Vergleich zum Wt veränderten Phänotyp hin [157,188]. Es war jedoch unklar, ob sich dieser auch bei den natürlich auftretenden HBV-Varianten mit ihrer strukturellen Vielfalt und innerhalb einer sehr heterogenen Genompopulation manifestiert. Daher sollten folgende Fragen beantwortet werden:

1. Weisen die mit LZ assoziierten, komplexen HBV-Varianten einen gemeinsamen, im Vergleich zum Wt-HBV veränderten Phänotyp auf, der sich von dem Wt-ähnlicher Genome aus dem Stadium der klinisch unauffälligen chronischen Hepatitis unterscheidet?
2. Gibt dieser Phänotyp Hinweise auf ihre Rolle in der Pathogenese der LZ?
3. Welchen Beitrag leisten die Mutationen in Cp und C-Gen zum Phänotyp der komplexen Varianten?

Für die Analysen standen klonierte, in Cp, C-Gen und teilweise S-Gen sequenzierte HBV-Gesamtgenome zur Verfügung, die aus Seren (und teilweise Leber) von Nierentransplantierten während eines Beobachtungszeitraums von mehreren Jahren gewonnen worden waren [4]. Die Charakterisierung des Phänotyps sollte an beispielhaft ausgewählten komplexen HBV-Varianten (aus 2 repräsentativen Patienten mit Entwicklung von LZ) durchgeführt werden, die während des Krankheitsverlaufs von einer asymptomatischen HBV-Infektion bis zum schweren Leberschaden selektiert wurden und akkumulierten. Die

kompletten Genome der komplexen Varianten sollten nach transienter Transfektion der Hepatomazelllinie HuH7 im Vergleich zu Referenz-Wt-Genomen funktionell analysiert werden. Das *in-vitro*-Transfektionssystem und eine Zelllinie wurden aufgrund der stabilen Untersuchungsbedingungen und aus Gründen der Machbarkeit Untersuchungen an primären Hepatozyten vorgezogen. Weiterhin sollte, stellvertretend für die ursprüngliche Viruspopulation während der klinisch unauffälligen chronischen Hepatitis, jeweils ein Wt-ähnliches Genom der Patienten ohne Deletionen oder Insertionen im Vergleich zu den Referenz-Wt-Genomen und den komplexen Varianten charakterisiert werden.

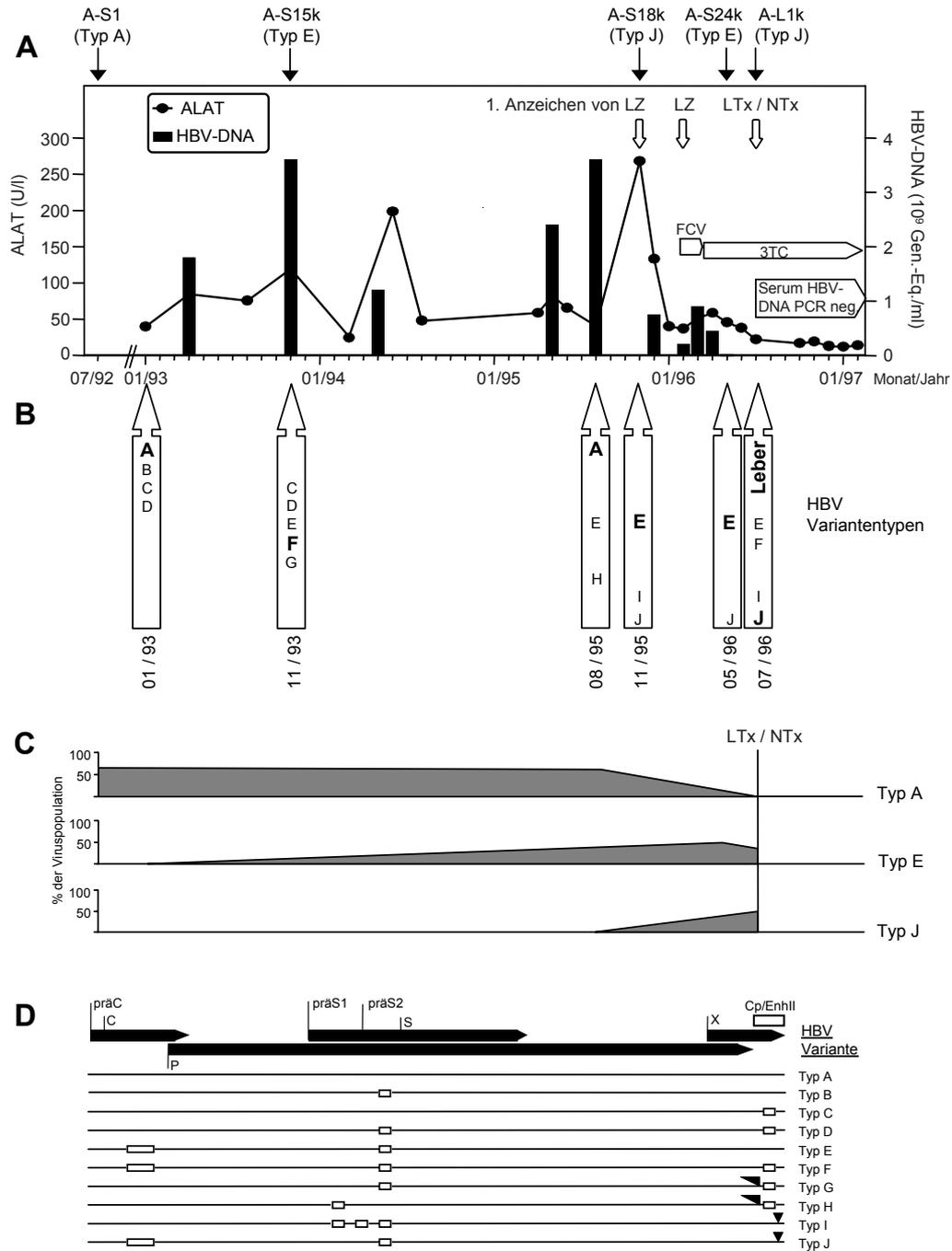
### 3 Die Patienten und ihre HBV-Populationen

Die Grundlage der vorliegenden Arbeit bilden im Rahmen der Dissertation von Petra Preikschat durchgeführte Untersuchungen der HBV-Populationen von 38 Langzeitimmunsupprimierten Nierentransplantatempfängern über Zeiträume von 6 Monaten bis zu 6 Jahren [4,134]. Alle Patienten hatten eine chronische HBV-DNA-positive Hepatitis und waren HBeAg-positiv und Anti-HBe-negativ. Die HBV-Populationen wurden durch Sequenzierung einzelner klonierter Gesamt-Genome aus Seren und Lebergewebeproben charakterisiert. Varianten wurden anhand ihrer Hauptmutationen (Deletionen/Insertionen) verschiedenen Typen zugeordnet (Abb. 3.1D und 3.2D), deren Auftreten und Anteil an der gesamten HBV-Population im Zeitverlauf der Krankheit analysiert wurden. Basierend auf den von Petra Preikschat beschriebenen klinischen Daten und charakterisierten HBV-Populationen wurden für diese Arbeit 2 repräsentative Patienten ausgewählt, die unter der typischen Entwicklung der HBV-Populationen mit Akkumulation und Persistenz der komplexen Varianten eine LZ ausgebildet hatten. Die funktionelle Analyse wurde beispielhaft mit einigen dieser komplexen Varianten durchgeführt. Im Folgenden werden die Patienten und ihre HBV-Populationen kurz vorgestellt.

#### 3.1 Patient A

##### 3.1.1 Klinik

Der Patient A („1D“ in Dissertation Preikschat [4] und „12“ in Preikschat *et al.* [134]) erwarb die Infektion mit HBV des Genotyps A während der Dialyse, die seit 12/83 infolge von Niereninsuffizienz bei der Grunderkrankung Glomerulonephritis nötig war. 05/95 erhielt er eine Nierentransplantation und entwickelte eine klinisch meist unauffällige chronische Hepatitis. Die immunsuppressive Therapie erfolgte mit Methylprednisolon, FK506 und Azathioprin. Nach einem starken Anstieg der Transaminasen 11/95 wurde sonographisch ein beginnender Leberumbau nachgewiesen und 02/96 eine LZ diagnostiziert. Die daraufhin 03/96 begonnene, nicht erfolgreiche FCV-Therapie wurde 04/96 auf 3TC umgestellt, mit dem Ergebnis einer drastischen Reduktion der Viruslast. Dies ermöglichte eine erfolgreiche kombinierte Leber-Nieren-Transplantation (07/96). Unter fortgesetzter 3TC-Therapie blieb der Patient im Beobachtungszeitraum bis 11/2001 klinisch unauffällig (Abb. 3.1A).



**Abbildung 3.1: Klinische Parameter und Entwicklung der HBV-Populationen des Patienten A im Zeitverlauf.** A: Dargestellt sind im Beobachtungszeitraum von 01/93 bis 02/97 durch Hybridisierung bestimmte HBV-DNA-Titer, Alaninaminotransferase (ALAT)-Konzentrationen als Parameter für die Leberfunktion, Therapie mit Famciclovir (FCV) und Lamivudin (3TC) sowie die Zeitpunkte der Diagnose der LZ und kombinierten Leber-Nieren-Transplantation (LTx/NTx). Oben sind die Zeitpunkte der Isolierung der 5 detailliert untersuchten HBV-Genome gezeigt. B: Zusammensetzung der HBV-Populationen in den jeweiligen Serum- bzw. Leberproben aus den in D dargestellten Variantentypen. Die Hauptvarianten eines Zeitpunktes sind fett gedruckt. C: Schematische Darstellung der Häufigkeit (%) von Wt-ähnlichen Genomen (Typ A) und Variantentypen E und J, die akkumulierten und nacheinander die Hauptpopulation bildeten, in den Viruspopulationen im Zeitverlauf. D: Darstellung der durch Klonierung von Gesamtgenom und Sequenzierung der C-Gen-, präS- und Cp/EnhII-Bereiche charakterisierten HBV-Variantentypen. Oben ist zur Orientierung das HBV-Genom schematisch gezeigt. Deletionen sind durch Rechtecke dargestellt (nt 1763–1770 im Cp, nt 2130–2219 im C-Gen [AS 77–106 des Core-Proteins], AS 65–79, 108–124, 140–141 und 121–141 im präS1/2-Bereich). Kleine Dreiecke kennzeichnen eine Insertion von TTAATCATTAG bei nt 1776/1777 im BCP. Große Dreiecke zeigen eine Duplikation der  $\alpha$ -Box im Cp/EnhII. Modifiziert nach Preikschat *et al.* [134].

### 3.1.2 HBV-Populationen

Ab 07/92 wurden 7 HBV-Populationen verschiedener Seren und der explantierten Leber des Patienten über einen Zeitraum von 5 Jahren charakterisiert (Abb. 3.1). Innerhalb der ersten 10 Monate des Untersuchungszeitraums traten bei noch milder Hepatitis zunächst Varianten mit Mutationen im Cp/EnhII auf, entweder mit Punktmutationen im BCP (Variantentyp A), u. a. an den Positionen 1762 (A>T) und 1764 (G>A), oder mit einer 8-nt-Deletion im BCP (nt 1763–1770), die nur vorübergehend akkumulierte (11/93, Variantentypen C, D, F). Zusätzlich trugen die Genome bereits in frühen Seren oft präS2-Deletionen (hauptsächlich AS 140–141, Variantentypen B, D, E, F, G, I, J), später oft in Kombination mit einer Stoppkodonmutation im präS1 (W77\*). Über den gesamten Zeitraum wiesen einige Genome eine präS2-Startkodonmutation (M120T) auf. Ab 11/93 reicherten sich komplexe Varianten mit zusätzlichen Deletionen im C-Gen an, meist mit einer Länge von 90 nt (nt 2130–2219, AS 77–106 des Core-Proteins, Variantentypen E, F, J). Als 11/95 die ersten Anzeichen einer LZ sonographisch diagnostiziert wurden, hatten 70 % aller sequenzierten Genome diese C-Gendeletion, kombiniert mit präS2-Deletionen. Komplexe Varianten mit C-Gendeletionen, präS2-Deletionen und Cp-Punktmutationen (Variantentyp E) stellten fortan im Serum mit ca. 50 % aller Genome die Hauptpopulation (Abb. 3.1B und C). Die übrigen Klone trugen häufig eine 11-nt-Insertion (nt 1776/1777) im BCP. In der explantierten Leber (07/96) repräsentierten dann komplexe Varianten mit dieser 11-nt-Insertion, C-Gen- und präS2-Deletionen (Variantentyp J) bei fortgeschrittener LZ und unter 3TC-Therapie die Hauptviruspopulation (Abb. 3.1B und C). Im Vergleich zu den Serumproben wiesen die aus der Leber isolierten Genome eine hohe Variabilität an präS-Deletionen und im S-Bereich nur vereinzelt Nukleotidaustausche auf. Der Anteil von Genomen ohne C-Gendeletion bewegte sich ab 11/93 bei ca. 30–40 % und betrug in der Leber nur noch weniger als 10 %. Während der 3TC-Therapie wurde ein Verschwinden der Varianten beobachtet. Die in dieser Zeit entnommenen Seren (ab 05/96) waren in der Hybridisierung bereits HBV-DNA-negativ (experimentelle Nachweisgrenze  $\leq 3 \times 10^5$  Genomkopien/ml). Kurz vor und während der Transplantation abgenommene Seren (07/96) wiesen wieder kurzzeitig Varianten auf, ab 08/96 waren die Seren jedoch anhaltend in der PCR HBV-DNA-negativ (Nachweisgrenze 10 Genome/ml).

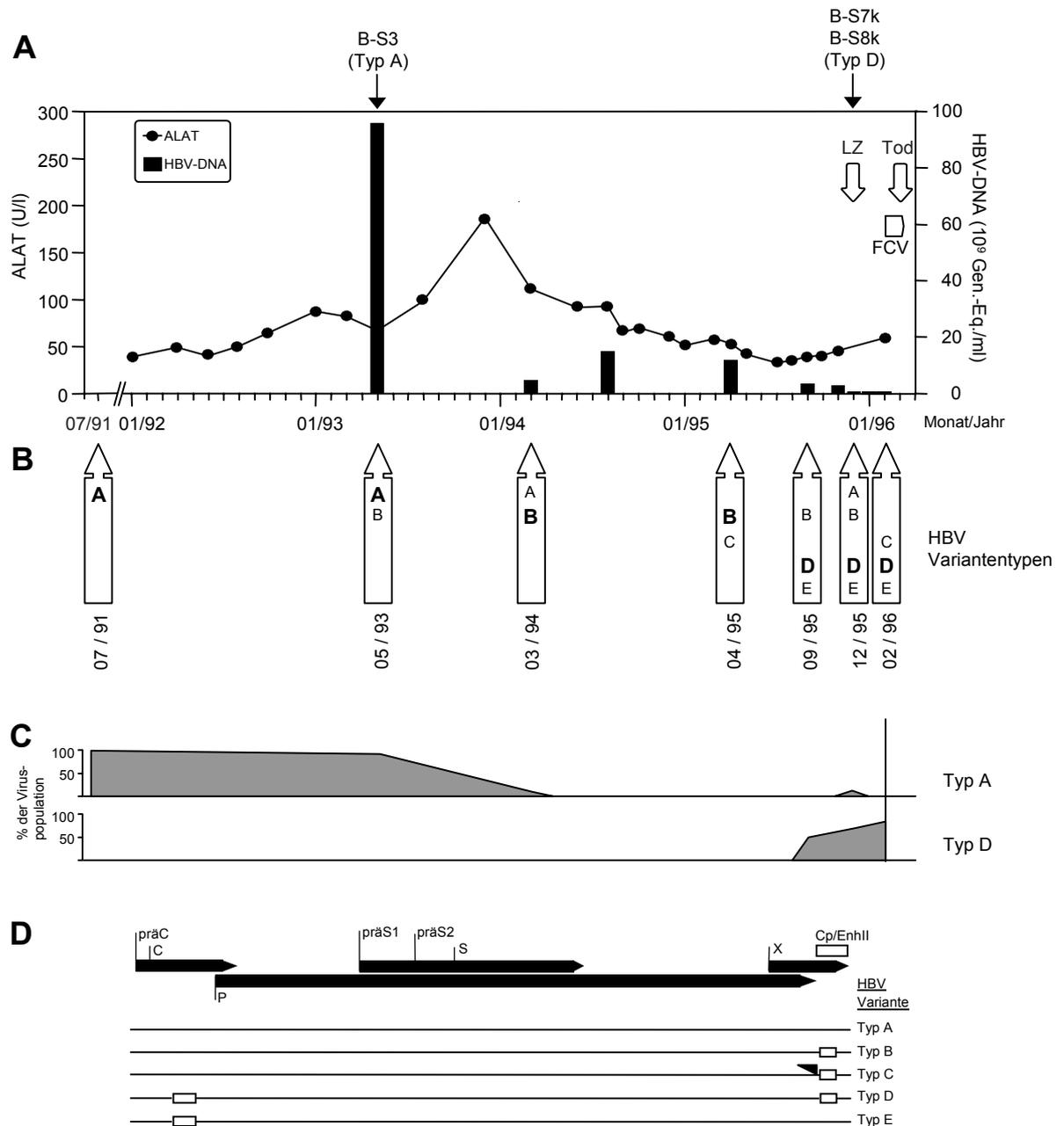
## 3.2 Patient B

### 3.2.1 Klinik

Patient B („1J“ in Dissertation Preikschat [4] und „8“ in Preikschat *et al.* [134]), der seit 05/84 aufgrund von terminaler Niereninsuffizienz durch Schrumpfnieren dialysepflichtig war, wurde vermutlich während einer Nierentransplantation 09/85 mit HBV (Genotyp A) infiziert. Die sich daraufhin entwickelnde chronische Hepatitis verlief 10 Jahre lang klinisch nahezu unauffällig. Erst nach einer kontinuierlichen Reduktion der immunsuppressiven Therapie mit Methylprednisolon, Cyclosporin A und Azathioprin ab 05/95 wurde nach 07/95 zunehmender Aszites und reduzierte Syntheseleistung der Leber festgestellt. 11/95 wurde eine LZ sonographisch bestätigt. Eine antivirale Therapie mit FCV ab 02/96 blieb erfolglos und der Patient verstarb 03/96 an Ösophagusvarizenblutung infolge terminaler Leberinsuffizienz (Abb. 3.2A).

### 3.2.2 HBV-Populationen

Über einen Zeitraum von 5 Jahren von 07/91 bis 02/96 wurden die HBV-Populationen aus 7 verschiedenen Seren des Patienten B untersucht (Abb. 3.2). Von Anfang an wurden Varianten mit Punktmutationen im Cp/EnhII an den Positionen 1753 (T>C) und/oder 1762 (A>T) und 1764 (G>A) detektiert (Variantentyp A). Varianten mit einer zusätzlichen 8-nt-Deletion (nt 1763–1770) im BCP tauchten 05/93 auf (Typ B) und akkumulierten im Verlauf. Zeitgleich mit ersten Anzeichen der LZ 09/95 wurden erstmals Genome mit einer Deletion im C-Gen von 51 nt (nt 2130–2180, AS 77–93 des Core-Proteins) detektiert, die sich anreicherten. Von diesem Zeitpunkt an bis zum Tod des Patienten 03/96 bildeten komplexe Varianten mit der 8-nt-Deletion im Cp und der C-Gendeletion die Hauptpopulation (Variantentyp D). 09/95 stellten Varianten des Typs D ca. 50 %, 12/95 bereits ca. 70 % und 02/96 ca. 80 % der Viruspopulation (Abb. 3.2C). Im gleichen Zeitraum betrug der Anteil von Genomen ohne C-Gendeletion nur noch ca. 25 % und sank ab 12/95 auf ca. 10 %. Alle untersuchten komplexen Varianten trugen auch Stoppkodonmutationen im S-Bereich (W74\*, L95\*). Jedoch wurden in HBV-Genomen des Patienten B zu keinem Zeitpunkt Deletionen in der präS-Region gefunden.



**Abbildung 3.2: Klinische Parameter und Entwicklung der HBV-Populationen des Patienten B im Zeitverlauf.** A: Klinische und virale Parameter im Beobachtungszeitraum von 07/91 bis 03/96. Oben sind die Zeitpunkte der Isolierung der 3 detailliert untersuchten HBV-Genome gezeigt. B: Zusammensetzung der HBV-Populationen in den Serumproben aus den in D dargestellten Variantentypen. Die Hauptvarianten sind fett gedruckt. C: Schematische Darstellung der Häufigkeit (%) der Wt-ähnlichen Genome (Typ A) und des akkumulierenden Variantentyps D im Zeitverlauf in den Viruspopulationen. D: Darstellung der im Patient B charakterisierten HBV-Variantentypen. Die dargestellten Deletionen (Rechtecke) liegen bei nt 1763–1770 im Cp und nt 2130–2180 im C-Gen (AS 77–93 des Core-Proteins). Das schwarze Dreieck zeigt eine Duplikation der  $\alpha$ -Box im Cp/EnhII. Modifiziert nach Preikschat *et al.* [134], für weitere Erklärungen siehe Abb. 3.1.



## 4 Material und Methoden

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Verbrauchsmaterialien, Geräte und Chemikalien

Verbrauchsmaterialien (Reaktionsgefäße, Petrischalen, Kulturflaschen, Pipettenspitzen und Ähnliches) wurden von den Firmen Eppendorf, Falcon, Roth und Nunc bezogen. Die verwendeten Laborgeräte sind in Tab. 4.1 zusammengestellt.

**Tabelle 4.1: Geräte**

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
ALFexpress DNA Sequencer	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
UV-Crosslinker CL-1000	Ultra Violet Products (UVP)
Diana II CCD-Kamera	Raytest
Elektroblotting-Apparatur	Phase
Feinwaage	Sartorius
Flachbett-Elektrophoresekammern und Spannungsgeräte	Pharmacia, Gibco BRL
Hybridisierungsöfen	GFL
Inkubationsschränke	Heraeus
Kamera (für Gelbilder)	Polaroid
Magnetrührer MR3001	Heidolph
Mikroskop ID03	OPTON
Mikrowelle	Bosch
pH-Meter (766 Calimatic)	Knick
ELISA Anthos reader 2001	Anthos labtec instruments
Schüttler: WS KL1 Wiegeschüttler MTS4	Edmund Bühler IKA
Spektrophotometer Ultrospec Plus	Pharmacia
Thermoblöcke	Techne
Thermocycler: Master Cycler 5330 plus Trio Thermoblock	Eppendorf Biometra
Univapo 150H Vakuumzentrifuge	Uniequip
UV-Lampe	MS Laborgeräte
Vertikalelektrophoresekammern	Phase
Vortex: MS2 Minishaker Vibrofix VF1	IKA Janke + Kunkel
Wasserbäder	Assistent

Zentrifugen: Ultrazentrifuge L7-55 Microliter Tischzentrifuge Megafuge 1.0R RC-24 5417R und 5415D	Beckmann Hettich Heraeus Sorvall Eppendorf
--	--

Wenn nicht anders vermerkt, wurden alle benötigten Standardchemikalien in analytischer Reinheit von den Firmen Baker, Roche, Difco, ICN-Biomedicals Inc., Merck, Roth, Serva und Sigma bezogen.

#### 4.1.2 Marker

Zur Größenbestimmung der DNA- bzw. RNA-Fragmente wurden die in Tab. 4.2 aufgeführten Marker verwendet.

**Tabelle 4.2: DNA- und RNA-Marker**

<b>Marker</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Verwendung</b>	<b>Fragmente in bp (DNA) oder b (RNA)</b>
Marker 3, Lambda-DNA mit <i>EcoRI</i> und <i>HindIII</i> geschnitten	MBI Fermentas	Kontrolle von DNA- Präparationen, Klonierung	21226, 5148, 4973, 4268, 3530, 2027, 1904, 1584, 1375, 947, 831, 564, 125
MassRuler DNA Ladder, High Range	Fermentas	Quantifizierung für Klonierung	10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2500, 2000, 1500
GeneRuler, 1-kb-DNA- Leiter	Fermentas	Fragmentgrößen- bestimmung bei Spleißanalyse	10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250
GeneRuler, 100-bp-DNA- Leiter	Fermentas	Fragmentgrößen- bestimmung, bei Spleißanalyse	1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100, 80
High DNA Mass Ladder	GibcoBRL	Mengenbestim- mung für Klonierung	10000, 6000, 4000, 3000, 1000
RNA- Längenstandard II, Dig-markiert	Roche	Northern Blots	6948, 4742, 2661, 1821, 1517
DNA- Längenstandard VII, Dig- markiert	Roche	Southern Blots	8576, 7427, 6106, 4899, 3639, 2799, 1953, 1882, 1515, 1412, 1164, 992, 718, 710, 492, 359, 81 (SPP1 DNA mit <i>EcoRI</i> geschnitten)

### 4.1.3 Standardpuffer und -lösungen

PBS (20 x):	2,7 M NaCl 0,05 M KCl 0,03 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,15 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 12 H <sub>2</sub> O
SSC (20 x):	3 M NaCl 0,3 M Na <sub>3</sub> citrat x H <sub>2</sub> O
TBE (10 x):	1 M Tris-Base 1 M Borsäure 0,01 M EDTA

### 4.1.4 Plasmide

#### 4.1.4.1 HBV-Patientenklone

Die in dieser Arbeit verwendeten HBV-Klone der Patienten liegen kloniert im Vektor pZErO™-2.1 (Invitrogen) vor, der eine Kanamycinresistenz vermittelt. Die zur Klonierung der Gesamtgenome verwendete Methode wurde detailliert von Günther *et al.* [182] beschrieben. Nach der Extraktion der DNA aus dem Patientenserum bzw. der Leber wurden komplette HBV-Genome der im Serum vorliegenden Population mittels Gesamtgenom-PCR amplifiziert. Dazu wurden Primer verwendet, die in der *nick*-Region des HBV-Genoms binden und Restriktionsschnittstellen für *Hind*III, *Sac*I und *Sap*I enthalten. Über die *Sac*I-Schnittorte wurden die Genome in den Vektor ligiert. Die meisten der in dieser Arbeit verwendeten Klone wurden mit dem ALFexpress Sequenzierer (Pharmacia) komplett sequenziert. Für die Transfektion wurden die HBV-Genome durch Restriktion mit *Sap*I ohne Sequenzverlust aus dem Vektor herausgeschnitten und dann als lineare doppelsträngige DNA eingesetzt, die nach Rezirkularisierung replizieren kann. Mutationen der Patientengenome wurden durch Vergleich mit der Sequenz des Genotyp-A-Referenzgenoms (nach Valenzuela [43]) ermittelt.

#### 4.1.4.2 Referenz-Genome WtD und WtA

Als Referenz-Wt-Genome in Transfektionen wurden grundsätzlich ein Wt-HBV-Genom des Genotyps D, Subtyp ayw („WtD“, GenBank-Nr. V01460, Galibert [201]) im Vektor pUC und/oder ein Wt-Genom des Genotyps A, Subtyp adw2 („WtA“, GenBank-Nr. X02763, Valenzuela [43]) im Vektor pZErO verwendet. Zur Transfektion wurden die Referenzgenome wie die Patientenklone mit *Sap*I aus dem Plasmid geschnitten.

#### 4.1.4.3 pCore

Das Core-Expressionsplasmid pCore basiert auf einem von M. Nassal (Freiburg) konstruierten Plasmid [202] und enthält ein HBV-C-Gen des Genotyps D (nach Galibert [201]) hinter einem CMV-Promotor. Es wurde freundlicherweise von Stephan Günther (Hamburg) zur Verfügung gestellt.

#### 4.1.4.4 SEAP-Plasmid

Das CMV-SEAP-Plasmid basiert auf dem ca. 5,2 kb großen Plasmid pBC12/PL/SEAP [203]. Es enthält das Gen der humanen plazentalen alkalischen Phosphatase, nach dessen Codon 489 ein Stoppkodon eingeführt wurde, so dass das normalerweise membranständige Genprodukt effizient und in aktiver Form sezerniert wird. Diese sezernierte alkalische Phosphatase (SEAP) wird mithilfe des dem Gen vorgeschalteten CMV-Promotors exprimiert.

#### 4.1.5 Antikörper und Konjugate

Folgende Antikörper und Konjugate wurden für Western Blots, Immunzytochemie und Immunfluoreszenz-Färbungen eingesetzt.

**Tabelle 4.3: Primäre Antikörper**

Primäre Antikörper	Spezifität	Quelle/Referenz	Spezifizierung	Anwendung in dieser Arbeit
MA 18/7	HBV präS1, AS 31–34 (Referenz [8])	Heermann <i>et al.</i> [204]	monoklonal, Maus	WB, IC, IF
F6	HBV präS2, AS 133–141	Meisel <i>et al.</i> [205]	monoklonal, Maus	WB, IC, IF
Q19/10	HBV präS2, spezifisch für N-glykosiliertes MHBs	W. Gerlich, Gießen [2]	monoklonal, Maus	IC
Anti-HBs	HBsAg	Fitzgerald Concord, MA, USA	polyklonal, Ziege	WB
RF18	HBsAg, AS 140–150	Roche Diagnostics, Penzberg	monoklonal, Maus	IC, IF
Anti-CoreSN, nativ	rekombinantes, verkürztes HBcAg, AS 1–149	Beterams <i>et al.</i> [206]	polyklonal, Kaninchen	WB, IC, IF
Anti- $\beta$ -Aktin	$\beta$ -Aktin	Abcam, Cambridge, UK	monoklonal, Maus IgG1	WB
Anti-Hsp70	Heatshock-Protein 70, Zytoplasma-Marker	Sigma, St. Louis, MO, USA	monoklonal, Maus IgG1	IF

Anti-Calnexin-C	C-Terminus von Calnexin, Marker für ER-Membran	StressGen Biotechnologies Corp., Victoria, BC, Canada	polyklonal, Kaninchen	IF
Anti-PDI	Protein-Disulfid-Isomerase, Marker für ER-Lumen	StressGen	monoklonal, Maus IgG1	IF
Anti-Golgi 58K	Golgi 58K-Protein	Sigma	monoklonal, Maus IgG1	IF
Anti-Rab2	Post-ER-Prä-Golgi Intermediäres Kompartiment	Santa Cruz Biotechnology	polyklonal, Kaninchen	IF

IC: Immunzytochemie, IF: Immunfluoreszenz, WB: Western Blot

**Tabelle 4.4: Sekundäre Antikörper und Konjugate**

<b>Sekundärer Antikörper, Konjugat</b>	<b>Markierung, Kopplung</b>	<b>Quelle/Referenz</b>	<b>Spezifizierung</b>	<b>Anwendung in dieser Arbeit</b>
Anti-Maus HRP	Peroxidase	DAKO	Kaninchen, IgG	WB: MA 18/7, F6, Anti- $\beta$ -Aktin
Anti-Ziege POD	Peroxidase	DAKO	Kaninchen, Immunglobuline	WB: Anti-HBs
Anti-Kaninchen HRP	Peroxidase	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA	Ziege, Immunglobuline	WB: Anti-CoreSN
fluoreszierendes Anti-Kaninchen IgG	Alexa Fluor 594 (rot)	Molecular Probes, Leiden, Niederlande	Esel, IgG	IF: Anti-CoreSN, Anti-Calnexin, Rab2
fluoreszierendes Anti-Maus IgG	Alexa Fluor 488 (grün)	Molecular Probes	Esel, IgG	IF: MA 18/7, F6, RF18, Anti-Hsp70, Anti-Golgi 58K, Anti-PDI
4plus ALP 1000 Universal-Kit: Anti-Kaninchen, Anti-Maus	biotinyliert, zur Detektion: Streptavidin-konjugierte Alkalische Phosphatase (AP)	Biocare Medical, Concord, CA, USA		IC: MA 18/7, F6, Q19/10, RF18, Anti-CoreSN

IC: Immunzytochemie, IF: Immunfluoreszenz, WB: Western Blot

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Sequenzierung

Die in dieser Arbeit untersuchten klonierten HBV-Genome wurden zum großen Teil vollständig sequenziert. Dies geschah mittels des ALF AutoRead Sequencing Kits (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) nach Herstellerangaben mit Cy5-markierten HBV-Primern in mehreren Schritten pro Genom (für Primer-Sequenzen siehe Dissertation Preikschat [4]). Die Produkte der Sequenzierreaktion wurden in einem 7%igen Polyacrylamid-Gel (ReproGel Long Read, Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) im ALFexpress-Sequenzierer aufgetrennt. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit der ALFwin Sequence Analyser Software und der Lasergene Software (DNASTAR, Inc., Madison, Wisconsin, USA).

### 4.2.2 Klonierung der Hybridgenome

Hybridgenome mit Cp, C-Gen oder Cp und C-Gen (C/Cp) der Varianten in einem Wt-ähnlichen Genom-Kontext wurden durch Austausch der jeweiligen Regionen eines Wt-ähnlichen Klons des selben Patienten (in diesem Abschnitt als „Wt“ bezeichnet, Patient A: A-S1, Patient B: B-S3) durch die entsprechenden Regionen der Varianten generiert.

#### 4.2.2.1 C/Cp-Hybridvarianten

Zur Herstellung der C/Cp-Varianten wurden je 10 µg der „Wt“- und Varianten-HBV-Genome, die über das *nick* (nt 1820) in den Vektor pZErO kloniert waren, mit je 20 U der Restriktionsendonukleasen *Kpn2I* und *Cfr42I* (Fermentas, St. Leon-Rot) 4 h bei 37 °C an den nt-Positionen 1450 und 2331 gespalten. Dadurch entstanden 2 Fragmente, von denen das eine (4081 bp) den Vektor mit C-Gen und Cp und das andere (2319 bp) das restliche HBV-Genom enthielt. Das Vektor-C-Cp-Fragment der Varianten sowie das Rest-Genom des Patienten-„Wt“-Klons wurden nach Elektrophorese des Restriktionsansatzes aus einem 1%igen Agarosegel (20 min bei 40 V, 2 h bei 80 V) ausgeschnitten, aufgereinigt (Qiaquick Gel Extraction Kit, Qiagen, nach Herstellerangaben) und in 30 µl eluiert. Die Eluate wurden mittels Gelelektrophorese und Massen-Standards (MassRuler DNA Ladder, High Range, Fermentas) quantifiziert. Zwei Teile (100 ng) „Wt“-Fragment und 1 Teil (100 ng) Vektor-C-Cp-Fragment der Varianten wurden mit 2,5 U T4-DNA-Ligase (Fermentas) und 2 µl 10x-Puffer in einem 20-µl-Ansatz 1 h bei 22 °C ligiert, gefolgt von 10 min bei 65 °C zur Inaktivierung der Ligase. Zur Transformation von *E.-coli*-Zellen wurden 10 µl des

Ligationsansatzes eingesetzt (4.2.2.4). Zur Testung der transformierten *E.-coli*-Kolonien wurde zunächst aus Einzelkolonien Plasmid-DNA mittels des Miniprep Kits (NucleoSpin Plasmid, Macherey-Nagel) nach Herstellerangaben präpariert und in 50 µl aufgenommen. 5 µl wurden mit 5 U *Kpn2I* 1 h bei 37 °C verdaut und in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt. Positive C/Cp-Klone, die die erwartete Bande des linearisierten Plasmids von ca. 6400 bp zeigten, wurden schließlich zur Kontrolle am ALFexpress-Sequenzierer sequenziert und im Transfektionssystem auf Replikationskompetenz getestet.

#### 4.2.2.2 Cp-Hybridvarianten

Zur Herstellung der Cp-Hybridgenome mit dem Cp von Varianten des Patienten A im „Wt“-Genom A-S1 wurden zunächst die HBV-Genome von „Wt“ und Variante aus dem Vektor pZErO geschnitten und der Cp vom übrigen HBV-Genom getrennt. Dies erfolgte durch gleichzeitige Spaltung mit den Restriktionsendonukleasen *SacI* (Fermentas) und *Cfr42I* ü. N. bei 37 °C:

	„Wt“ A-S1	Variante
HBV-Plasmid	3 µg	10 µg
<i>SacI</i>	2,0 µl (20 U)	4,0 µl (40 U)
<i>Cfr42I</i>	1,0 µl (10 U)	4,0 µl (40 U)
Puffer B	4,0 µl	4,0 µl
<i>Aqua bidest.</i>	<i>ad</i> 40 µl	<i>ad</i> 40 µl

Der Ansatz wurde mit 5 µl Gelladepuffer versetzt und in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt. Sowohl das Cp-Fragment der Variante (370 bp) als auch das restliche Genom ohne Cp des „Wt“ (2830 bp) wurden ausgeschnitten und aufgereinigt (siehe Abschnitt 4.2.2.1). Möglichst im Doppelansatz wurden 400 ng des „Wt“-Stücks und 100 ng des Varianten-Cp-Fragments (molares Verhältnis 1:2) mit 5 U T4-DNA-Ligase in einem 20-µl-Ansatz ü. N. bei 4 °C ligiert, gefolgt von 20 min Inaktivierung bei 65 °C. Dieses erste Ligationsprodukt wurde durch Zugabe von 10 U *SacI* und 2 µl 10x Puffer B und 2 h Inkubation bei 37 °C linearisiert. Nach Zugabe von 3 µl Gelladepuffer wurde die DNA in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt und die Bande der korrekt ligierten, kompletten Hybrid-HBV-Genome von 3200 bp wurde ausgeschnitten. Es folgte die Aufreinigung der gesamten DNA über eine Säule des MinElute Gel Extraction Kits (Qiagen) nach Herstellerprotokoll und die Eluation in 10 µl *Aqua bidest.* Der Vektor pZErO wurde ebenfalls mit 10 U *SacI* pro µg DNA geschnitten. Nach der Quantifizierung im Gel erfolgte eine 2. Ligation von 150 ng des 1. Ligationsproduktes mit 25 ng pZErO (molares Verhältnis 6:1) mit 0,1 U T4-DNA-Ligase von Invitrogen in einem 20-µl-Ansatz ü. N. bei 14 °C und 10 min

Inaktivierung bei 70 °C. Der gesamte Ansatz wurde zur Transformation der *E.-coli*-Zellen verwendet (siehe Abschnitt 4.2.2.4). Zur Testung der Kolonien wurden je 3 µl einer Mini-Plasmidpräparation mit 5 U *Cfr42I* und in einem 2. Ansatz mit 10 U *EcoRI* (Fermentas) 1 h bei 37 °C gespalten. Positive Klone zeigten im 1%igen Agarosegel die erwarteten Banden von 6400 bp nach *Cfr42I*-Verdau, bzw. von 1850 und 4550 bp nach *EcoRI*-Verdau und wurden zur Kontrolle sequenziert.

#### 4.2.2.3 C-Gen-Hybridvariante

Das C-Gen-Hybridgenom des Patienten A wurde analog zur Klonierung der Cp-Varianten hergestellt, indem zunächst das „Wt“-Genom A-S1 und das Varianten-Genom A-L1k mittels *SacI*-Verdau aus dem Vektor geschnitten und das C-Gen mittels des Restriktionsenzym *Kpn2I* vom übrigen Genom getrennt wurde. In folgendem Ansatz erfolgte der Verdau 4 h bei 37 °C:

	„Wt“ A-S1	Variante
HBV-Plasmid	3 µg	15 µg
<i>SacI</i>	2,0 µl (20 U)	10,0 µl (100 U)
<i>Cfr42I</i>	1,0 µl (10 U)	5,0 µl (50 U)
Puffer Y	4,0 µl	4,0 µl
<i>Aqua bidest.</i>	ad 40 µl	ad 40 µl

Nach Agarosegelelektrophorese des Verdau wurden das C-Gen-Fragment der Variante (500 bp) und das Fragment des restlichen „Wt“-HBV-Genoms (2700 bp) ausgeschnitten, aufgereinigt und quantifiziert. Alle weiteren Schritte von der 1. Ligation bis zur Kontrolle der Klone durch Sequenzierung erfolgten wie zur Cp-Klonierung.

#### 4.2.2.4 Transformation

Zur Transformation wurden 10 µl der Ligationsprodukte mit 50 µl kompetenter Top10 *E.-coli*-Zellen (Invitrogen) gemischt, 30 min auf Eis inkubiert und nach 30 s Hitzeschock bei 42 °C (Wasserbad) 2 min auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 250 µl SOC-Medium (Invitrogen) wurde die Mischung 1 h 15 min bei 37 °C und 225 rpm geschüttelt, vollständig auf antibiotikahaltigem Agar ausplattiert (für Vektor pZErO mit 50 mg/ml Kanamycin) und ü. N. bei 37°C inkubiert.

#### 4.2.3 Zellkultur

Zur Transfektion wurden die humanen Hepatoma-Zelllinien HuH7 und HepG2 verwendet, die vom hepatozellulären Karzinom eines Japaners [207] bzw. vom Hepatoblastom eines 15-jährigen Kaukasiers [208] stammen. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im

Brutschrank in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco) mit 10 % FKS, 1 % L-Glutamin (200 MM, Gibco), 1 % nichtessentiellen Aminosäuren (Biochrom KG), 1 % Natriumpyruvat (Biochrom KG) und 0,1 % Gentamycin (10 mg/ml, Biochrom KG) gehalten und alle 2–3 Tage bei 80–100%iger Konfluenz im Verhältnis 1:5 umgesetzt. Nach 20 Passagen wurden die Zellen verworfen und frische Kulturen aus einer Stammkultur angelegt. Regelmäßig fand eine Überprüfung auf Mycoplasmen-Kontamination durch PCR mit dem Mycoplasma Detection Kit VenorGeM (Minerva Biolabs, Berlin) nach Herstellerangaben statt.

#### 4.2.4 Transfektion

##### 4.2.4.1 Aussäen der Zellen

Am Tag vor der Transfektion wurden die Zellen in 60 x 15 mm großen Zellkulturschalen mit einer Dichte von  $9 \times 10^5$  Zellen pro Schale ausgesät. Dazu wurden die Zellen aus mehreren großen Zellkulturflaschen trypsinisiert und gepoolt. Zur Entfernung des Trypsins wurden die Zellen bei Raumtemperatur (RT) für 10 min bei 800 rpm zentrifugiert. Nach dem Abgießen des Mediums wurden die Zellen in 10–20 ml frischem Medium resuspendiert. Durch eine dünne Kanüle wurden die Zellen vereinzelt und während der darauf folgenden Zellzählung ständig aufgeschüttelt. Zur Zellzählung wurden 160 µl PBS, 20 µl Trypanblau und 20 µl Zellsuspension gemischt. Davon wurden 20 µl in die Rosenthal-Zählkammer gegeben. Vier Quadrate wurden ausgezählt und die Summe der Zellen wurde mit 12.480 multipliziert, um die Zellzahl pro ml zu ermitteln. Die Zellsuspension wurde mit Medium auf die gewünschte Konzentration von  $9 \times 10^5$  Zellen pro Schale gebracht, und 5 ml der Gesamtsuspension pro Schale wurden schneckenförmig ausgesät. Vor der Überführung in den Brutschrank blieben die Schalen noch mindestens 15 min ruhig stehen.

##### 4.2.4.2 *SapI*-Restriktion

Für die Transfektion wurden die linearen Gesamtgenom-HBV-DNA-Monomere mit 2 U/µg DNA des Restriktionsenzym *SapI* (New England Biolabs) für 7 h bei 37 °C im Eppendorf Mastercycler aus dem Vektor herausgeschnitten. Nach Kontrolle der vollständigen Restriktion im 1%igen Agarosegel wurde der ungereinigte Restriktionsansatz zur Transfektion eingesetzt.

##### 4.2.4.3 Transfektion

3–4 h vor der Transfektion wurde das Medium durch frisches Medium mit 2 % FKS ersetzt und das Zellwachstum kontrolliert. Dabei sollte die Konfluenz der Zellen 60–80 % betragen.

Zwei Mikrogramm HBV-DNA wurden mithilfe des Polyethylenimins ExGen500 (Fermentas) nach Herstellerangaben transfiziert (HuH7: 2,2  $\mu$ l pro  $\mu$ g DNA, HepG2: 6,6  $\mu$ l pro  $\mu$ g DNA). Die Transfektion von 2  $\mu$ g der leeren pZerO Vektor-DNA diente als Negativkontrolle. Zur Analyse der Replikation wurden die Genome der Varianten mit C-Gendeletion mit 1,6  $\mu$ g pCore oder dem WtD-Genom zur Komplementation des Core-Proteins kotransfiziert, wobei die Menge transfizierter HBV-Gesamtgenom-DNA immer konstant blieb (2  $\mu$ g). Ausschließlich bei den HepG2-Zellen erfolgte 1 Tag nach Transfektion ein weiterer Mediumwechsel. Nach 4 (HuH7) oder 5 Tagen (HepG2 und zur Analyse der RNA aus Core-Partikeln) wurden die Zellen geerntet.

#### **4.2.4.4 SEAP-Assay**

Zum Vergleich der Transfektionseffizienz wurde in jeder Schale 1  $\mu$ g des SEAP-Reporterplasmids kotransfiziert, das für die sezernierte alkalische Phosphatase (SEAP) kodiert [203]. Die SEAP-Enzymaktivität, die proportional zur in die Zelle gelangten DNA ist, wurde im Zellkulturüberstand gemessen. Das geerntete Medium wurde 5 min bei 65 °C erhitzt, um selektiv die endogenen Phosphatasen der Zelle zu inaktivieren, und dann 2 min bei 14000 rpm zentrifugiert. 50  $\mu$ l des 1:10 verdünnten Überstandes wurden mit 100  $\mu$ l SEAP-Puffer (1 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 M Diethanolamin, 4,5 mg/ml L-Homoarginin) in einer Mikrotiterplatte gemischt. Nach 10-minütiger Inkubation bei 37 °C wurden 50  $\mu$ l des frisch angesetzten Substrats p-Nitrophenol-Phosphat (50 mM) dazu gegeben, und anschließend wurde die Lichtabsorption bei 405 nm im Photometer über eine halbe Stunde alle 5 min gemessen. Zwischen den Messungen wurde die Platte immer wieder bei 37°C inkubiert. Die Einzelwerte der Kinetik wurden graphisch über die Zeit dargestellt, wobei die SEAP-Aktivität sich als Änderung der Lichtabsorption pro Minute ausdrückt. Die Steigung im linearen Bereich der Kurve spiegelt die Enzymaktivität und damit die Transfektionseffizienz wider. Nur Transfektionen mit vergleichbaren SEAP-Werten der Proben wurden ausgewertet.

#### *4.2.5 Nachweis der Nukleinsäuren*

##### **4.2.5.1 DNA-Isolierung aus zytoplasmatischen Core-Partikeln**

Nach zweimaligem Waschen mit eiskaltem PBS wurden die Zellen mit 1 ml frisch sterilfiltriertem Lysispuffer (50 mM Tris, pH 8, 1 mM EDTA, 1 % Nonidet P40) 15 min auf Eis lysiert. Das homogene Lysat wurde in Eppendorf-Gefäße überführt und nach kurzem Vortexen wiederum 15 min auf Eis inkubiert. Zum Abtrennen der Zellkerne wurde die Suspension nochmals gevortext, und nach 10-minütiger Zentrifugation bei RT mit 14000 rpm

wurden die Zytoplasma-Überstände sorgfältig abgenommen. Zur weiteren Aufarbeitung der DNA aus zytoplasmatischen Core-Partikeln wurde zunächst ein DNase-Verdau mit 200 µg/ml DNase I und 20 mM MgCl<sub>2</sub> für 30 min bei 37 °C durchgeführt, um die zur Transfektion eingesetzte *Input*-DNA zu entfernen. Die Reaktion wurde nach Zugabe von EDTA, pH 8, (Endkonzentration 25 mM) für 5 min bei RT gestoppt. Daran schloss sich ein Proteinverdau mit 1 mg/ml Proteinase K und 2 % SDS für 2 h bei 37 °C zur Freisetzung der HBV-DNA aus dem Nukleokapsid an. Die Nukleinsäuren wurden mittels Phenol-Chloroform-Extraktion (1:1) aufgereinigt und aus der wässrigen Phase mit 1/10 Volumen 3 M NaCl und 1 Volumen Isopropanol über Nacht bei -20 °C gefällt. Nach einer Zentrifugation von 40 min bei 14000 rpm und 4 °C wurde das Pellet mit 700 µl eiskaltem 70%igem Ethanol gewaschen (10 min Zentrifugation, 14000 rpm, 4°C), unter Vakuum getrocknet und in 24 µl Tris/EDTA (TE, 10/10 mM) aufgenommen.

#### **4.2.5.2 DNA-Isolierung aus Zellkernen**

Die während des Prozesses der DNA-Isolierung aus zytoplasmatischen Core-Partikeln pelletierten Kerne wurden mit dem Verfahren der alkalischen Lyse zur Isolierung von zirkulärer DNA weiterbehandelt. Das Pellet wurde in 100 µl Lösung I (50 mM Glucose, 25 mM Tris/HCl, pH 8, 10 mM EDTA) resuspendiert, mit 200 µl Lösung II (0,2 N NaOH, 1 % SDS) gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 150 µl Lösung III (3 M Kaliumacetat, 11,5 % Essigsäure) und 10 min Inkubation auf Eis wurden Zellkernbruchstücke 10 min bei 14000 rpm abzentrifugiert. Mit dem Überstand wurde ein Proteinverdau wie für die Zytoplasma-DNA, aber ohne Zugabe von SDS durchgeführt, da im Puffer der alkalischen Lyse SDS ausreichend vorliegt. Dann wurden die Nukleinsäuren mittels Phenol-Chloroform-Extraktion und Isopropanol-Fällung aufgereinigt (siehe Abschnitt 4.2.5). Die Kern-DNA wurde als Kontrolle zur Pyrosequenzierung eingesetzt (siehe Abschnitt 4.2.5.7).

#### **4.2.5.3 DNA-Isolierung aus Viruspartikeln im Zellkulturüberstand**

Zur DNA-Isolierung aus extrazellulären Viruspartikeln wurde zunächst das Zellkulturmedium für 30 min bei 8000 rpm (Sorvall SS-34 Rotor) und 4 °C zentrifugiert. Dann wurden 3 ml des Überstandes auf 1 ml 20 % Sucrose in TNE (100 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl (pH 7,4), 1 mM EDTA) geschichtet und für 4 h bei 45000 rpm (TST 60.4 Rotor) und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 500 µl Tris (50 mM, pH 8) gelöst. Anschließend wurde die DNA analog zur Aufarbeitung aus dem Zytoplasma mit DNase und Proteinase behandelt, mit Phenol-Chloroform extrahiert und gefällt.

#### 4.2.5.4 RNA-Isolierung

Zur Ernte von Gesamt-RNA wurden die Zellen nach zweimaligem Waschen mit PBS in 1 ml TRIZOL® Reagent (Invitrogen) lysiert und nach Herstellerprotokoll aufgearbeitet. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform, 10 s vortexen und 3 min Inkubation bei RT wurde das Lysat bei 12000 x g und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Die RNA im wässrigen Überstand wurde mit Glykogen (20 mg/ml) und 500 µl Isopropanol präzipitiert, durch Zentrifugation pelletiert, mit 75 % und 100 % Ethanol gewaschen und in 100 µl DEPC-Wasser gelöst. Daraufhin wurde das RNA-Isolat bis zur Konzentrationsmessung und zur Analyse im Northern Blot bei -70 °C aufbewahrt. Die Konzentrationsbestimmung der isolierten RNA erfolgte durch Messung der Absorption bei 260 nm in einer 1:100-Verdünnung in DEPC-*Aqua-bidest.* im Photometer.

Für die Aufreinigung der prägenomischen HBV-RNA aus intrazellulären Core-Partikeln für die Pyrosequenzierung wurde zunächst das Zytoplasma der Zellen 5 Tage nach Transfektion wie oben beschrieben gewonnen. Die Isolierung der Core-Partikel erfolgte nach Yuan *et al.* [209] mit kleinen Veränderungen. Die Zytoplasma-Probe wurde auf 20 mM MgCl<sub>2</sub> und 8 mM CaCl<sub>2</sub> eingestellt und mit 30 U Micrococcus-Nuklease (Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ, USA) und 200 µg DNase I pro ml für 1 h bei 37 °C behandelt. Die Core-Partikel wurden mit 330 µl 26 % PEG 8000 in 1,5 M NaCl und 60 mM EDTA für 1 h bei 4 °C gefällt. Nach 4-minütiger maximaler Zentrifugation in einer Tischzentrifuge wurde der Überstand sorgfältig abgenommen und der Schritt mit einer weiteren 30-s-Zentrifugation wiederholt. Das Pellet wurde in 100 µl TE-Puffer resuspendiert. Anschließend wurde die RNA mittels TRIZOL® isoliert und mit 3,4 U RNase-freier DNase (Qiagen) 10 min bei RT verdaut, gefolgt von ihrer Inaktivierung für 10 min bei 65 °C und 2 mM EDTA. Für die Pyrosequenzierung wurden 10 µl der RNA-Probe in einem 20-µl-Ansatz mit 0,375 mM dNTP, 0,5 mM DTT, 15 ng/µl N6 Primer, 1 U/µl Rnasin und 5 U/µl MLV Reverser Transkriptase für 10 min bei 25 °C, 10 min bei 42 °C und 6 min bei 96 °C revers transkribiert.

#### 4.2.5.5 Southern Blot

Die Analyse der viralen Replikation wurde u. a. mittels Southern Blot [210] der aus zytoplasmatischen Core-Partikeln isolierten replikativen Intermediate durchgeführt.

#### Elektrophorese

Die aufgereinigten replikativen Intermediate der Hälfte der Ernte einer Schale (HuH7) bzw. von 5/6 der Ernte (HepG2) wurden in einem 1,5%igen Agarosegel mit autoklaviertem TBE

als Laufpuffer elektrophoretisch über Nacht bei 20–35 V aufgetrennt. Als Molekulargewichtsmarker wurde der Digoxigenin (Dig)-markierte DNA-Marker VII (Roche) verwendet. Als HBV-spezifischer Marker diente ein 1:1000 verdünntes Reaktionsprodukt aus einzel- und doppelsträngiger linearer HBV-DNA, das durch asymmetrische PCR eines HBV-Gesamtgenoms hergestellt worden war.

### Kapillar-Blot

Der Elektrophorese folgte die Denaturierung der DNA im Gel durch 2 x 15 min Schütteln in Denaturierungslösung (1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH) und anschließend die Neutralisierung für 2 x 15 min in Neutralisierungslösung (0,5 M Tris, 3 M NaCl, pH 7,4) und kurz in *Aqua bidest.* Mittels Kapillarblot mit 20 x SSC wurde die DNA auf eine positiv geladene Nylonmembran (Roche) geblottet und dort nach Spülen mit 2 x SSC mit einem UV-Crosslinker fixiert. Entweder wurde der Blot nun getrocknet und staubfrei aufbewahrt oder es wurde gleich mit der Hybridisierung, basierend auf dem DIG Luminescent Detection Kit (Roche), fortgefahren.

### Hybridisierung

Die Membran wurde mit der Oberseite nach innen in eine Hybridisierungsflasche überführt und mit 20 ml frisch angesetzter sterilfiltrierter und vorgewärmter Hybridisierungslösung (5 x SSC, 0,1 % [w/v] N-Lauroylsarcosin, 1 % [w/v] Blocking Reagenz [Test-Kit, Roche], 0,02 % [w/v] SDS) mindestens 4 h bei 68 °C im Hybridisierungsofen prähybridisiert. Danach fand über Nacht bei 68 °C die Hybridisierung mit der HBV-Gesamtgenomsonde statt, die folgendermaßen hergestellt wurde: 20 µg der HBV-Gesamtgenom-DNA eines Genotyp-A-Wt-Genoms (EMBL-Nr. L13994) wurden in einem 200-µl-Ansatz mit 6 µl *EcoRI* (10 U/µl, MBI Fermentas) bei 1 h Verdau (22 °C) und 5 min Inaktivierung (65 °C) aus dem Vektor pUC geschnitten. Die gesamte Restriktion wurde durch Gelextraktion (MinElute Gel Extraction Kit, Qiagen) nach dem Herstellerprotokoll aufgereinigt und die Konzentration des Eluats in 10 µl EB-Puffer (Kit) wurde in einem 1%igen Agarosegel mit Hilfe von 2, 4 und 8 µl der High DNA Mass Ladder (GibcoBRL) bestimmt. Die gewonnene DNA wurde mit der *random-priming*-Methode (DIG DNA Labeling Kit, Roche) nach dem Herstellerprotokoll in einer 20-h-Reaktion Dig-markiert. Die Sensitivität der Sonde wurde in einem Dot Blot getestet. 400–500 ng der Sonde in 10 ml Hybridisierungslösung wurden vor jeder Hybridisierung durch 10-minütiges Kochen im Wasserbad denaturiert. Danach kam die nun einzelsträngige Sonde sofort auf Eis und so schnell wie möglich in die Hybridisierungsflasche zur Membran, nachdem die Hybridisierungslösung zur Prähybridisierung entfernt worden

war. Nach der Hybridisierung wurde die Sonde abpipettiert, eingefroren und bis zu 15-mal wiederverwendet.

#### Stringentes Waschen und Detektion

Überschüssige und unspezifisch an der Membran gebundene Sonde wurde durch Behandlung der Membran für 2 x 5 min mit 60 ml Waschlösung 1 (2 x SSC, 0,1 % SDS) bei RT und für 2 x 20 min mit 30 ml vorgewärmter Waschlösung 2 (0,1 x SSC, 0,1 % SDS) bei 68 °C im Hybridisierungssofen entfernt. Danach folgte die Detektion in einer Plastikschiene auf einem Wiegeschüttler bei RT. Nach einem 5-minütigen Waschschiitt mit Waschlösung 3 (0,03 % Tween-20 in P1-Puffer [0,1 M Maleinsäure, 0,15 M NaCl, pH 7,5]) wurde die Membran 30 min in P2-Puffer (1 % Blocking-Reagent in P1) geschüttelt. Dann folgten 30 min bis 1 h Inkubation mit dem 1:10000 in 20 ml P2-Puffer verdünnten, mit alkalischer Phosphatase konjugierten Antikörper (Anti-DIG-AP, Roche), der die Dig-markierte Sonde erkennt. Nach weiteren 2 x 15 min in Waschlösung 3 erfolgte die Äquibrierung der Membran in Substratverdünnungspuffer (0,1 M Diethanolamin, 1,0 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 9,5) für 5 min. Die Membran wurde dann im Hybridisierungsbeutel mit 60 µl CDP-Star (1,2-Dioxetan, Tropix), eines Substrats der alkalischen Phosphatase, in 3 ml Substratverdünnungspuffer benetzt. Nach 5–10-minütiger, lichtgeschützter Inkubation bei 37 °C wurde die Lösung abpipettiert und nach zwischenzeitlichem Einfrieren bis zu 3-mal wiederverwendet. Die resultierende Chemilumineszenz wurde in der DIANA-CCD-Kamera detektiert, und die Intensität der Banden, dargestellt als (optische Dichte – Hintergrund)/mm<sup>2</sup>, mit dem dazugehörigen Programm „TINA 2.0“ (Raytest) bestimmt.

#### **4.2.5.6 Northern Blot**

Die Analyse der viralen RNA-Transkripte erfolgte im Northern Blot, der bis auf RNA-bedingte Veränderungen analog zum Southern Blot durchgeführt wurde. Wie auch bei der RNA-Ernte wurden alle Lösungen mit DEPC-Wasser angesetzt.

#### Formaldehyd-Agarosegel-Elektrophorese

Um Kontaminationen durch RNasen zu verhindern, wurden Elektrophoresekammer und -zubehör (Schlitten, Kamm) mit 0,5 % SDS gewaschen, anschließend mit DEPC-Wasser und Ethanol gespült und dann getrocknet. Das 1,2%ige Formaldehyd (FA)-Agarosegel (1,2 g Agarose in FA-Puffer [200 mM MOPS, 50 mM Natriumacetat, 10 mM EDTA, pH 7, sterilfiltriert], Zugabe von 12,3 M FA nach dem Schmelzen) wurde vor der Elektrophorese mindestens 30 min in 1 x FA-Laufpuffer (12,3 M FA in FA-Puffer) äquibriert. 10 µg RNA

wurden mit Ladepuffer (5 x Ladepuffer: 16 µl gesättigte Bromphenolblaulösung, 80 µl EDTA [500 mM, pH 8], 720 µl Formaldehyd [FA, 12,3 M], 2 ml 100%iges Glycerol, 3,08 ml Formamid, 4 ml 10 x FA-Puffer) 10 min bei 65 °C inkubiert, dann auf Eis gestellt und aufgetragen. Als Marker dienten 20 ng des Dig-markierten RNA-Längenstandards II (Roche). Das Gel lief 3 h bei 85 V unter einem Abzug.

#### Northern Blotting, Hybridisierung und Detektion

Für den Blot wurde das Gel 2 x 15 min in 20 x SSC gewaschen. Der Northern Blot, Hybridisierung, stringente Waschschriffe und Detektion wurden wie beim Southern Blot durchgeführt (Abschnitt 4.2.5.5). Die HBV-spezifische RNA-Sonde wurde mit Hilfe des DIG RNA Labeling Kits (Roche) aus dem gleichen Genotyp-A-Wt-Genom (EMBL-Nr. L13994) wie die Southern-Blot-Sonde hergestellt. 10 µg Plasmid-DNA wurden mit 0,2 U des Restriktionsenzym *Hind*III geschnitten (Verdau 7 h 37 °C, Inaktivierung 10 min 65 °C), so dass das HBV-Genom mit dem das Genom flankierenden T7-Promotor des Vektors freigesetzt und linearisiert wurde. Die DNA wurde mittels Phenol-Chloroform-Extraktion aufgereinigt, ihre Konzentration im Agarosegel bestimmt und 1 µg der gereinigten DNA für die Dig-Markierung mit der T7-Polymerase verwendet. Die Sensitivität der Sonde wurde im Dot Blot getestet. Zum Einsatz gelangten 2 µg markierter Sonde pro 10 ml Hybridisierungslösung. Zur Kontrolle, dass gleiche Mengen an RNA auf das Gel aufgetragen wurden, erfolgte parallel der Nachweis von β-Aktin mittels einer Dig-markierten Aktin-Sonde (Roche) in der Konzentration von 1 µg Sonde pro 10 ml Hybridisierungslösung. Da die Bande der β-Aktin-mRNA auf gleicher Höhe wie die der HBV-mRNA läuft, wurde der Nachweis auf einem zweiten, identisch behandelten Blot geführt.

#### Northern Blots zum Nachweis der gespleißten RNA

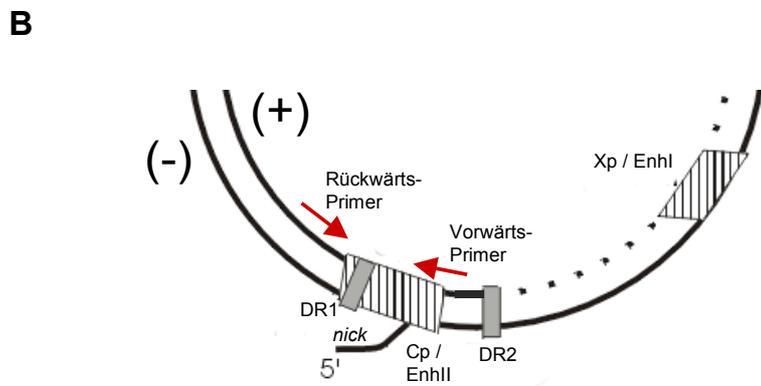
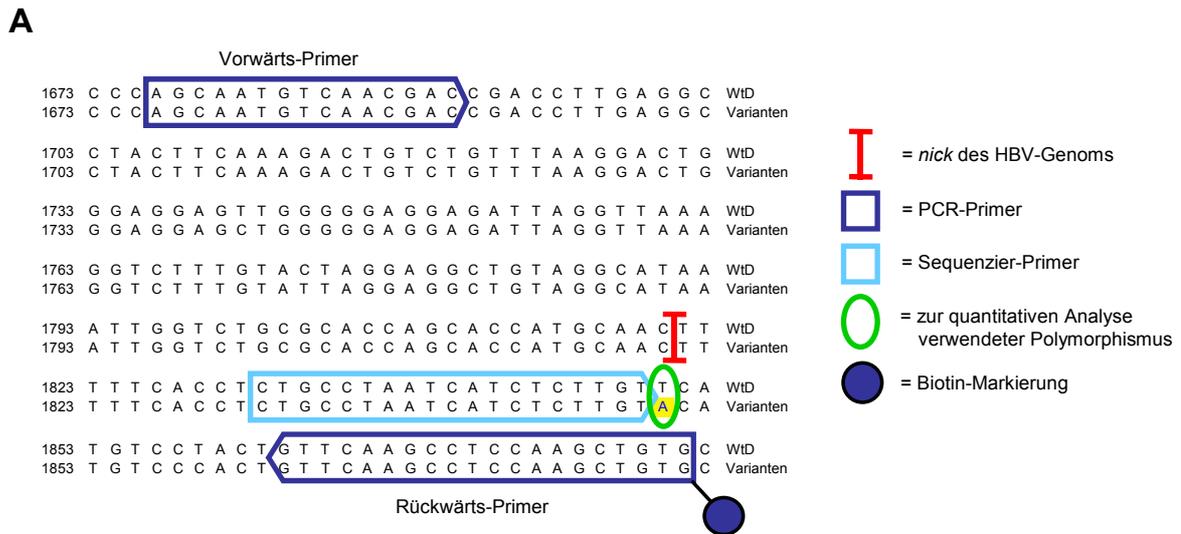
Der Nachweis der häufigsten gespleißten RNA vom Typ 1 (SP1) erfolgte nach der von Ehlers *et al.* beschriebenen Methode [60]. 10 µg Gesamt-RNA wurden in einem 1%igen FA-Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran (Osmonics, Westborough, USA) geblottet. Die Northern Blots wurden ü. N. bei 68 °C mit einer <sup>32</sup>P-markierten RNA-Sonde hybridisiert, die die nt 2021–2755 des HBV-Genoms umfasst, und somit die pgRNA, präC und SP1-RNA, aber nicht die subgenomischen Oberflächen-RNAs detektiert. Die Sonde wurde durch *in-vitro*-Transkription von einem mittels PCR generierten DNA-Fragment mit T7-RNA-Polymerase-Promotor synthetisiert. Dabei diente das HBV-Expressionsplasmid pCH-9/3091 (H. Schaller, Heidelberg) als Ausgangsmaterial für die PCR mit dem *antisense*-Primer (5'-ccatcga **taa tac gac tca cta tag** GGT GTA AAT AGT GTC TAG TTT GG'), der

die T7-RNA-Polymerase-Promotor-Sequenz (fett gedruckt) und die HBV-Sequenz von nt 2734–2755 (Großbuchstaben) enthält, sowie dem *sense*-Primer mit der HBV-Sequenz von nt 2021–2041 (5'-AAG CCT TAG AGT CTC CTG AGC-3'). Das Auftragen gleicher RNA-Mengen wurde zusätzlich durch Hybridisierung der Blots mit einer <sup>32</sup>P-markierten, *in-vitro*-transkribierten *antisense* Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)- oder *antisense* Histon-2A-Sonde kontrolliert [60]. Die Blots wurden auf Fuji-Imager-Platten entwickelt. Die Signale wurden mit dem Fujix BAS 2000 Bio-Imaging Analyzer (Fuji, Japan) quantifiziert und mit der TINA-Software analysiert.

#### **4.2.5.7 Differenzierung der WtD- und Varianten-Nukleinsäuren mittels Pyrosequenzierung**

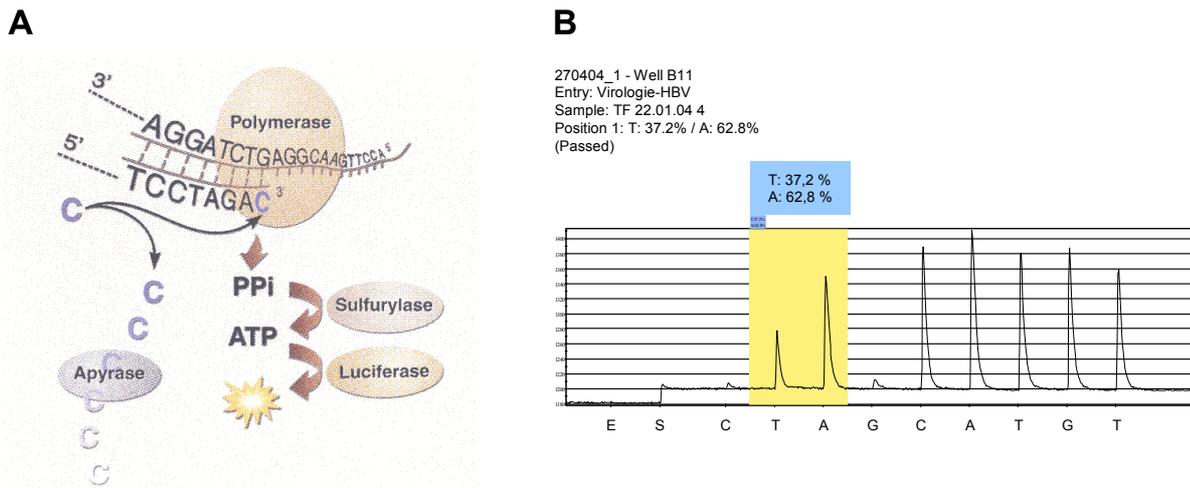
Um in den Kotransfektionsexperimenten den Anteil von WtD und Variante an den während der Replikation synthetisierten viralen Nukleinsäuren zu bestimmen, wurde eine quantitative Einzel-Nukleotid-Polymorphismus (SNP)-Analyse mittels Pyrosequenzierung etabliert. Zur Differenzierung diente ein SNP an Nukleotidposition 1850 der HBV-Sequenz, an der das WtD-Genom ein T, Genome des Genotyps A und somit auch der Varianten dagegen ein A tragen (Abb. 4.1). Die Analyse wurde mit pgRNA und replikativen Intermediaten aus zytoplasmatischen Core-Partikeln (zur Isolierung siehe Abschnitte 4.2.5.4 und 4.2.5.1), mit HBV-DNA aus extrazellulären Partikeln (Abschnitt 4.2.5.3) sowie mit DNA aus den Zellkernen (Abschnitt 4.2.5.2) durchgeführt.

Das Prinzip der Methode [211] beruht auf der Detektion von während einer Sequenzierreaktion freigesetztem Pyrophosphat (PPi), das durch eine Kaskade enzymatischer Reaktionen in einen zur Anzahl der inkorporierten Nukleotide proportionalen, messbaren Lichtblitz umgewandelt wird (Abb. 4.2). Nach Bindung des Sequenzierprimers an ein einzelsträngiges PCR-Produkt entsteht durch Einbau eines passenden Nukleotids mittels der DNA-Polymerase das PPi, welches durch die ATP-Sulfurylase im Ansatz in ATP umgewandelt wird. ATP liefert der Luciferase die nötige Energie zur Oxidierung von Luciferin zu Oxyluciferin. Das dadurch erzeugte Lichtsignal wird mit einer CCD-Kamera detektiert und als Peak im Pyrogramm dargestellt. Die Nukleotide in Form von Desoxynukleosid-Triphosphaten werden dem Reaktionsansatz nacheinander in einer durch die Sequenz bestimmten Reihenfolge zugegeben. Vor dem Zufügen des nächsten Nukleotids werden nicht eingebaute Nukleotide durch das Enzym Apyrase abgebaut, so dass das Lichtsignal tatsächlich proportional zur inkorporierten Menge eines bestimmten Nukleotids ist.



**Abbildung 4.1: Aufbau des quantitativen SNP-Assays zur Differenzierung von WtD und Varianten.**  
 A: Schematisch sind Teile des Cp- und C-Gen-Bereichs des HBV-Genoms dargestellt. Die quantitative Analyse basiert auf einem Nukleotidpolymorphismus zwischen HBV-Genomen des Genotyps D (wtD = T) und des Genotyps A (Varianten = A) bei nt 1850 (grüne Ellipse). Zunächst wird in einer PCR mit den angegebenen Vorwärts- und Rückwärts-Primern ein Fragment von ca. 200 bp amplifiziert. Eine Amplifikation der zur Transfektion verwendeten linearen *Input*-HBV-DNA ist nicht möglich, da diese am *nick* (rot) in den Vektor kloniert war und dort zerschnitten wurde. Nur rezirkularisierte DNA (wie z. B. im Kern oder als replikative Intermediate) kann amplifiziert werden. Das PCR-Produkt wird in die quantitative Pyrosequenzierung mit dem Sequenzierprimer (hellblau) eingesetzt, der direkt vor dem Polymorphismus bindet. B: Die Positionen der für die PCR verwendeten Primer sind nochmals an einem Ausschnitt der partiell doppelsträngigen rcDNA dargestellt. Im Gegensatz zur linearen *Input*-DNA werden neben rezirkularisierten Genomen auch replikative DNA-Intermediate trotz des *nicks* im Genom aufgrund des durchgängigen DNA-Plusstrangs amplifiziert. *Direct repeats* DR1 und DR2 und *nick* sind gekennzeichnet.

Zur quantitativen Analyse der HBV-DNA wurde 1 µl der Probe (replikative Intermediate: 1:20-Verdünnung der halben Ernte einer Zellkulturschale, pgRNA und extrazelluläre DNA: unverdünnte Probe aus einer Zellkulturschale, Kern-DNA: 1:20-Verdünnung der Ernte einer Zellkulturschale) in eine PCR mit dem Vorwärtsprimer 5'-AGCAATGTCAACGACCGAC-3' (nt 1676–1690) und dem Biotin-markierten Rückwärtsprimer 5'-Biotin-CACAGCTTGGAGGCTTGAAC-3' (nt 1862–1881) eingesetzt.



**Abbildung 4.2: Prinzip der Pyrosequenzierung (A) und resultierendes Pyrogramm (B).** A: Bei der Pyrosequenzierung führt das beim Nucleotid-Einbau freiwerdende Pyrophosphat (PPi) durch eine enzymatische Reaktionskaskade zu einem Lichtblitz, der proportional zur Anzahl der eingebauten Nucleotide ist. Die Apyrase sorgt für den schnellen Abbau nicht inkorporierter Nucleotide. Für detaillierte Erklärungen siehe Text. (aus [www.pyrosequencing.com](http://www.pyrosequencing.com)). B: Die Lichtblitze der Pyrosequenzierung werden mit einer CCD-Kamera detektiert und in einem Pyrogramm dargestellt. Gezeigt ist beispielhaft das Pyrogramm einer beliebigen Pyrosequenzierung von replikativen Intermediaten des HBV mit dem entwickelten SNP-Assay. Im Diagramm sind die Intensitäten der Lichtblitze bei aufeinanderfolgender Zugabe von Enzym (E), Substrat (S) und den Nucleotiden in der festgelegten Reihenfolge zu sehen. Aus der Höhe der beiden Peaks des T/A-SNPs (gelb unterlegt) werden von der integrierten Software die prozentualen Anteile von T (WtD) und A (Variante) in der DNA-Mischung berechnet, die über dem Diagramm angegeben sind. Die vor und nach dem T/A-SNP zugegebenen Nucleotide C und G können nicht an die DNA binden und dienen somit zur Kontrolle unspezifischer Bindungen. Die letzten 5 Nucleotide werden dagegen entsprechend der tatsächlichen Basensequenz zugegeben und fungieren als Kontrolle der gesamten Pyrosequenzierreaktion.

Diese PCR schließt eine Amplifikation der linearen HBV-Input-DNA aus, die zur Transfektion aus dem Vektor geschnitten wurde, da die Primer auf unterschiedlichen Seiten des *nicks* liegen, über den die monomeren HBV-Genome in den Vektor kloniert wurden. Nur rezirkularisierte Genome (z. B. im Kern), die von diesen transkribierte pgRNA (nach Umschreibung in cDNA) oder die replikativen Intermediate können amplifiziert werden (Abb. 4.1). Die Reaktion in 25µl-Ansätzen (0,5 U Taq, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 µM Vorwärtsprimer, 0,2 µM Rückwärtsprimer, 0,48 mM dNTPs) lief 5 min bei 95 °C, 40 Zyklen mit 15 s bei 95 °C, 30 s bei 60 °C und 30 s bei 72 °C und abschließend 5 min bei 72 °C. Der Erfolg der PCR wurde in einem 2%igen Agarosegel kontrolliert. Nur bei einer starken Bande von 205 nt und somit einer großen Menge des gewünschten PCR-Produkts wurde mit der Pyrosequenzierung fortgefahren.

Für die anschließende Pyrosequenzierung wurde der SNP Reagent Kit 5 x 96 (Biotage, Uppsala, Schweden) und entweder das Pyrosequencing PSQ<sup>TM</sup> 96 System oder das PSQ<sup>TM</sup> HS 96 System (Biotage) mit den entsprechenden Geräten verwendet, bei denen sich hauptsächlich die Art der Aufreinigung des Biotin-markierten PCR-Einzelstrangs unterschied.

Beim PSQ™ 96 System wurden, wie bei Uhlmann *et al.* [212] beschrieben, die DNA-Stränge des PCR-Produkts mit magnetischen, Streptavidin-gekoppelten Dyna-Beads (DynaL A.S., Oslo, Norwegen) getrennt. Dazu wurden die gesamten 25 µl des PCR-Produkts, 33 µl 2 x Binding-Washing-Puffer (BW-Puffer, siehe Kit) und 8 µl Dyna-Beads in den Wells einer 96er-Platte gemischt und bedeckt mit einer Thermowell-Matte 15 min bei 65°C in einem Thermomixer inkubiert. Dies diente der Anlagerung der Streptavidin-gekoppelten Dyna-Beads an den biotinylierten Primer/DNA-Strang. Mithilfe eines speziellen Magneten (PSQ 96 Sample Prep Tool) wurden die Beads und die angelagerten PCR-Produkte zum 1-minütigen Denaturieren der DNA in eine zweite Platte mit 50 µl 0,5 M NaOH transferiert. Danach wurde der an die Beads gekoppelte DNA-Einzelstrang auf gleiche Weise zum Waschen in eine Platte mit 100 µl Annealing-Puffer (AB-Puffer, siehe Kit) überführt. Schließlich erfolgte in einer weiteren Platte die Hybridisierung des biotinylierten DNA-Strangs mit 1 µl des 10 µM Sequenzierprimers (5'-CTGCCTAATCATCTCTTGT-3', nt 1831–1849) in 40 µl AB-Puffer pro Well für 2 min bei 80 °C. Der Sequenzierprimer bindet direkt vor dem zur Differenzierung verwendeten SNP bei nt 1850 an die HBV-DNA (Abb. 4.1). Nach dem Abkühlen auf RT wurde diese Platte in die Pyrosequenzierung eingesetzt.

Für das PSQ™ HS 96 System wurden die DNA-Stränge durch Kopplung an Sepharose und die Anwendung einer Vakuum-Apparatur getrennt. 15 µl PCR-Produkt wurden in einer 96-well-Platte mit 2 µl Sepharose-Beads, 40 µl 2 x BW-Puffer und 28 µl *Aqua bidest.* 5 min bei 1000 rpm geschüttelt, so dass eine Anlagerung der Proben an die Beads erfolgte. Anschließend wurden die Beads mit einer an eine Vakuumpumpe angeschlossenen Filtervorrichtung (PyroMark Vacuum Prep Tool) angesaugt und jeweils 5 s in 70%igen Ethanol, 0,2 M NaOH und Waschpuffer gehalten. Daraufhin wurde die Vakuumpumpe abgeschaltet, und die Beads mit dem biotinylierten DNA-Einzelstrang wurden in einer Platte mit 11,64 µl AB-Puffer und 0,36 µl Sequenzierprimer (10 µM) pro Well durch leicht kreisende Bewegungen abgeschüttelt. Die Hybridisierung erfolgte wie beim PSQ™ 96 System für 2 min bei 80 °C.

Für beide Systeme wurden gleichermaßen Enzym und Substrat des SNP Reagent Kits bei RT in je 620 µl Reinstwasser gelöst und mit je 200 µl der 4 Desoxynukleosid-Triphosphate in die vorgesehene Kartusche des Pyrosequenzier-Automaten gefüllt. Während des Laufs wurden der Sequenzierreaktion zunächst Enzym und Substrat und anschließend die Nukleotide in der Reihenfolge CTAGCATGT zugegeben. Im resultierenden Pyrogramm (Bsp. in Abb. 4.2) wurden aus der Höhe der entscheidenden, beiden Peaks des T/A-SNPs (fett gedruckt) von der integrierten Software die prozentualen Anteile von T (WtD) und A (Variante) in der

Mischung berechnet. Die Zugabe der übrigen Nukleotide vor und nach dem eigentlichen SNP diente zur Funktionskontrolle des Assays. Für jede Probe wurden 3 unabhängige PCR-Ansätze und Pyrosequenzierreaktionen durchgeführt, deren Mittelwerte an einer Eichgerade normalisiert wurden. Die Eichgerade wurde für jedes PSQ-System mit bekannten Mischungen der PCR-Produkte von nur WtD- und nur Variante-transfizierten Zellen erstellt.

#### **4.2.5.8 Berechnungen zur Analyse der Replikation nach Kotransfektion der Varianten und WtD**

Nach Kotransfektion von Variante und WtD wurde die Höhe der Varianten-Replikation in der Mischung der replikativen Intermediate im Vergleich zum allein transfizierten WtD (100 %) berechnet, indem die Höhe der Gesamtreplikation relativ zum WtD (Southern Blot) mit dem Anteil der Variante an den replikativen Intermediaten (Pyrosequenzierung) multipliziert wurde.

Die so ermittelte Varianten-Replikation wurde weiter verwendet, um den Level der replikativen Intermediate der Varianten in Relation zur Menge der ursprünglich transfizierten Varianten-DNA im Gemisch zu betrachten und folgendermaßen zu berechnen:

$$(\% \text{ Varianten-Replikation relativ zum WtD alleine}) / (\% \text{ transfizierte Varianten-DNA})$$

Auf die gleiche Weise wurden die Replikation des WtD im Gemisch und der Level der replikativen Intermediate des WtD im Vergleich zur transfizierten WtD-DNA bestimmt.

Die Anreicherung der replikativen Intermediate der Variante im Vergleich zum WtD wurde ermittelt, indem das Verhältnis von Variante zu WtD in replikativen Intermediaten (erhalten durch Pyrosequenzierung) mit dem transfizierten Verhältnis verglichen wurde:

$$\text{Anreicherung der Variante (x - fach)} = \frac{(\% \text{ Variante} / \% \text{ WtD}) \text{ in replikativen Intermediaten}}{(\% \text{ Variante} / \% \text{ WtD}) \text{ in transfizierter DNA}}$$

Entsprechend wurde die Anreicherung der Varianten in der verpackten pgRNA aus intrazellulären Core-Partikeln und in der DNA aus extrazellulären Viruspartikel im Zellkulturmedium berechnet. Durch Pyrosequenzierung von nukleärer DNA wurde sicher gestellt, dass die im Kern vorhandenen Anteile von WtD- und Varianten-DNA tatsächlich den transfizierten DNA-Anteilen entsprachen.

#### **4.2.5.9 Primer-Extension-Analyse der Core-Promotor-Transkripte**

Die Primer-Extension-Analysen wurden zur Differenzierung der beiden Cp-Transkripte pgRNA und präC-mRNA durchgeführt, die sich an ihrem 5'-Ende um 30 nt unterscheiden. Das Prinzip der Methode beruht darauf, einen ca. 100–200 nt vom 5'-Ende der RNA entfernt

bindenden Primer mittels Reverser Transkriptase bis zum 5'-Ende zu verlängern. Die doppelsträngigen Reaktionsprodukte, deren Größe sich je nach Position des 5'-Endes unterscheidet, werden dann in einem hochauflösenden Gel aufgetrennt und detektiert. Im vorliegenden Fall wurde das Assay für die Auftrennung und Detektion der Produkte im ALFexpress-Sequenzierer etabliert. Zehn Pikomol eines Cy5-markierten Primers (nt 1974–1950, 5'-Cy5-GGA AAG AAG TCA GAA GGC AAA AAC G-3') wurden 1 h lang mit 20 µg Gesamt-RNA von transfizierten HuH7-Zellen bei –70 °C in 0,1 Volumen Natrium-Acetat (3 M, pH 5,2) und 2,5 Volumen Ethanol kopräzipitiert und 10 min bei 14000 rpm (Eppendorf-Zentrifuge) bei 4 °C zentrifugiert. Nach Waschen des Pellets mit 70%igem Ethanol, nochmaliger Zentrifugation und sorgfältigem Entfernen des Ethanols wurde das Kopräzipitat in 8 µl TE (10/10 mM, pH 7,6) resuspendiert. Es wurden 2,2 µl KCl (1,25 M) zugegeben, und einer Denaturierung bei 85 °C für 10 min im Thermoblock folgte die Hybridisierung durch langsames Abkühlen auf 45°C (ca. 2 h). Die Primer wurden nach Zugabe von 24 µl Primer-Extension-Puffer (20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 4,8 mM dNTPs, 50 µg/ml Actinomycin D, 10 mM DTT, 0,1 U/µl RNasin (Roche, Mannheim), 6 U/µl M-MLV Reverse Transkriptase (Invitrogen, Karlsruhe) für 1 h bei 42 °C elongiert. Die Reaktionsprodukte wurden zum Verdau der einzelsträngigen RNA 10 min bei RT mit 1 µl 10 M NaOH inkubiert, mit 3,5 µl Natrium-Acetat (3 M) neutralisiert und nach Zugabe von 150 µl TE und 0,1 M NaCl mit 200 µl Phenol-Chloroform extrahiert. Dazu wurde die Lösung 30 s gevortext, 5 min bei RT und 14000 rpm zentrifugiert. Der oberen, wässrigen Phase wurden zur Fällung der Nukleinsäuren 50 µl 10 M Ammonium-Acetat und 700 µl Ethanol 1 h bei –70 °C zugegeben, gefolgt von 10 min Zentrifugation bei 4 °C bei 14000 rpm. Das Pellet wurde nach dem Waschen mit 70 % Ethanol in Ladepuffer (Stop-Lösung, ALFexpress AutoRead Sequencing Kit) gelöst, 8 min bei 95 °C denaturiert und in einem 8%igen Polyacrylamid-Gel mit 5,8 M Harnstoff (auf 60 ml: 21 g Harnstoff, 25 ml H<sub>2</sub>O, 5 ml 10 x TBE, 11,4 ml RapidGel-XL-40 % Konzentrat [USB, Cleveland, Ohio, USA]) im ALFexpress-Sequenzierer aufgetrennt. Als Längenstandard wurde ein HBV-Referenz-Genom des Genotyps A (EMBL-Nr. L13994), das nicht über die *nick*-Region, sondern über die *Eco*RI-Schnittstelle in den Vektor pUC kloniert wurde, mit denselben Primern und dem AutoRead Sequencing Kit sequenziert und aufgetragen. Die Signalintensitäten der Banden von pgRNA und präC-mRNA im Gelbild wurden mit der TINA 2.0 Software quantitativ ausgewertet.

#### 4.2.5.10 Analyse der gespleißten replikativen Intermediate aus Core-Partikeln

Zur Analyse des Verhältnisses von replikativen DNA-Intermediaten, die durch reverse Transkription von gespleißter SP1-RNA bzw. ungespleißter pgRNA entstanden, wurden Wt-

Genome, Wt-ähnliche Klone, komplexe Varianten der Patienten A und B sowie eine C/Cp-Hybridvariante in HuH7-Zellen transfiziert. Komplexe Varianten und Hybridvariante wurden mit pCore kotransfiziert. Nach 4 Tagen wurde die DNA aus zytoplasmatischen Core-Partikeln isoliert (siehe Abschnitt 4.2.5.1) und mittels PCR analysiert.

### PCR

Mit den Primern p6 (nt 2363–2386, 5'-GGCAGGTCCCCTAGAAGAAGAACT-3') und p15 (nt 716–738, 5'-ATAACTGAAAGCCAAACAGTGGG-3') wurde ein Stück der replikativen Intermediate amplifiziert, das das Intron der SP1-RNA enthielt. Die PCR lief in 50- $\mu$ l-Ansätzen (25  $\mu$ l Tempase Hot Start Mix [Biomol], jeweils 5  $\mu$ l der beiden Primer [10  $\mu$ M], 1  $\mu$ l Betain Enhancer Solution [Biomol], 9  $\mu$ l *Aqua bidest.*) mit 5  $\mu$ l verschiedener DNA-Verdünnungen (1:10 bis 1:50) 15 min bei 94 °C, 30 Zyklen mit 1 min bei 94 °C, 1 min bei 68 °C und 3 min bei 72 °C und abschließend 6 min bei 72 °C. Die PCR-Produkte wurden in einem 1%igen Agarosegel mit 0,5  $\mu$ g/ml Ethidiumbromid (Roth) aufgetrennt. Dabei wurde in allen Proben zusätzlich zu den erwarteten Banden der von ungespleißter pgRNA umgeschriebenen DNA (1596 bp) und der SP1-abgeleiteten DNA (340 bp) eine weitere Bande bei ca. 550 bp nachgewiesen. Die Bandenintensitäten wurden im digitalen Gelbild mit dem TINA-Programm ausgewertet.

### Aufreinigung, Klonierung und Sequenzierung des PCR-Produkts von ca. 550 bp

Um die Herkunft des PCR-Produkts von ca. 550 bp zu klären, wurde die Bande aufgereinigt, kloniert und sequenziert. Dazu wurden zunächst 10  $\mu$ l der PCR-Reaktion des A-L1k-C/Cp-Hybridgenoms, bei dem die Bande am stärksten war, in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt, die entsprechende Bande wurde ausgeschnitten und mit dem MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die DNA wurde in 10  $\mu$ l *Aqua bidest.* eluiert.

Dann erfolgte die Klonierung der DNA in den TOPO-Vektor mit dem TOPO-TA-Klonierungskit (Invitrogen) nach Herstellerangaben. Diese Klonierung nutzt die Tatsache, dass in einer normalen PCR die *Taq*-Polymerase an den 3'-Enden des Produkts einen Überhang eines A's produziert, zur Integration des Produkts in einen Vektor mit dem Überhang eines T's. Drei Mikroliter der gereinigten DNA wurden in einem 5- $\mu$ l-Ansatz (inklusive 1  $\mu$ l Salzlösung und 1  $\mu$ l *Aqua bidest.*) 5 min bei RT mit 1  $\mu$ l des TOPO-Vektors ligiert. Zur Transformation wurden 2  $\mu$ l des Ligationsprodukts mit 50  $\mu$ l kompetenter Top10 *E.-coli*-Zellen (Invitrogen) gemischt, 5 min auf Eis inkubiert und nach 30 s Hitzeschock bei 42 °C (Wasserbad) 2 min auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 250  $\mu$ l SOC-Medium

(Invitrogen) wurde die Mischung 1 h bei 37 °C und 225 rpm geschüttelt. 150 µl wurden auf Kanamycin-haltigem Agar ausplattiert (50 mg Kanamycin/ml) und ü. N. bei 37°C inkubiert. Plasmid-DNA aus Einzelkolonien wurde mit dem Miniprep Kit (NucleoSpin Plasmid, Macherey-Nagel) nach Herstellerangaben präpariert und in 50 µl *Aqua bidest.* aufgenommen. Zur Testung der transformierten *E.-coli*-Kolonien wurden 3 µl der Plasmidpräparation mit 5 U *EcoRI* 1 h bei 37 °C verdaut und in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt. Positive Klone zeigten 2 Fragmente von 3900 bp und 600 bp.

Die Sequenzierung des PCR-Produktes von 550 bp in positiven Klonen erfolgte in einem LICOR-DNA-Sequenzierer mit den im Vektor ansetzenden Primern „universal“ und „revers“. Für die Sequenzierreaktion wurde der Thermosequenase DYEnamic Direct Cycle Sequencing Kit (Amersham) nach Herstellerangaben mit je 2 pmol der Primer, 3 µl DMSO und 2 µl der Mini-Plasmidpräparation verwendet. Die Produkte wurden in einem 4%igen Polyacrylamid-Gel mit 5,8 M Harnstoff (auf 60 ml: 21 g Harnstoff, 25 ml H<sub>2</sub>O, 5 ml 10 x TBE, 5,7 ml RapidGel-XL-40 % Konzentrat [USB, Cleveland, Ohio, USA]) aufgetrennt. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit der Lasergene Software (DNASTAR, Inc., Madison, Wisconsin, USA).

#### 4.2.6 *Proteinnachweise*

##### 4.2.6.1 **Protein-Isolierung**

Nach zweimaligem Waschen mit eiskaltem PBS wurden die transfizierten HuH7-Zellen in 1,5 ml PBS mit einem Zellschaber von der Schale gelöst, in ein Eppendorf-Gefäß überführt und 5 min bei 3000 x g und 4 °C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 5 Volumen Suspensions-Puffer (0,1 M NaCl, 0,01 M Tris-HCl (pH 7,6), 0,001 M EDTA (pH 8), 1 µg/ml Aprotinin, 100 µg/ml Phenylmethylsulfonylfluorid [PMSF]) aufgenommen. Gleiche Proteinkonzentrationen in jeder Probe wurden mit der Bradford-Methode nachgewiesen. Die gleiche Menge 2 x SDS-Gelladepuffer (100 mM Tris-HCl (pH 6,8), 200 mM Dithiothreitol, 4 % SDS, 0,2 % Bromphenolblau, 20 % Glycerol) wurde zugegeben, die Proben 10 min gekocht und 10 min bei 14000 rpm und RT zentrifugiert. Der proteinhaltige Überstand wurde abgenommen und bei -20 °C bis zur Western-Blot-Analyse gelagert.

##### 4.2.6.2 **SDS-PAGE und Immunoblot**

Zum Nachweis der HBV-Oberflächenproteine und des Core-Proteins im Zellysat wurden 30 µl der Proteinproben in einem 15%igen Polyacrylamid-SDS-Gel aufgetrennt (8–9 cm ins Trenngel gelaufen, 175 V, ca. 4 h) und mittels Semi-Dry-Blotting auf eine Polyvinyliden-

Difluorid (PVDF)-Membran (Roche) transferiert. Dazu wurde das Gel zunächst einige Minuten in Kathodenpuffer (25 mM Tris [pH 9,4], 20 % Methanol, 150 mM Glycin) getränkt und die PVDF-Membran kurz in Methanol, anschließend 1–2 min in Wasser und schließlich einige Minuten in Anodenpuffer II (25 mM Tris [pH 10,4], 20 % Methanol) gespült. In einer ElektrobloTTing-Apparatur wurde das Gel auf 3 Lagen in Kathodenpuffer getränkter Filterpapiere positioniert, mit der PVDF-Membran, 2 Lagen in Anodenpuffer II (25 mM Tris [pH 10,4], 20 % Methanol) und 2 Lagen in Anodenpuffer I (0,3 M Tris [pH 10,4], 20 % Methanol) getränkter Filterpapiere bedeckt und nach dem Auflegen der Deckplatte mindestens 1 h bei 1 mA pro cm<sup>2</sup> geblottet. Danach wurde die Membran mindestens 2 h in 4%iger Magermilch in PBS/0,05 % Tween geschüttelt und 3 x in PBS/Tween gewaschen. Zum Nachweis der HBV-Oberflächenproteine LHBs, MHBs und SHBs und von  $\beta$ -Aktin zur Ladekontrolle folgten 4 h Inkubation auf dem Schüttler mit dem primären Antikörper in 1 % Magermilch in PBS/Tween (siehe Tab. 4.3, MA 18/7 2  $\mu$ g/ml, F6 1  $\mu$ g/ml, Anti-HBs 1  $\mu$ g/ml und Anti- $\beta$ -Aktin 1:10000), während zum Nachweis des Core-Proteins der Primär-Antikörper (Anti-CoreSN, nativ 1:2000) 2 x 1 h jeweils im Wechsel mit dem 2. Antikörper inkubiert wurde. Nach 3 x Waschen in PBS/Tween wurde die Membran 1 h mit dem Peroxidase-markierten, zweiten Antikörper inkubiert (Tab. 4.4, Verdünnungen: Anti-Maus 1:1000, Anti-Ziege 1:2000, Anti-Kaninchen 1:3000) sowie 2 x in PBS/Tween und 2 x in PBS gewaschen. Die Detektion erfolgte nach Herstellerangaben mittels des Lumi-Light<sup>PLUS</sup> Western Blotting Substrats (Roche Diagnostics) in der Diana CCD-Kamera.

#### **4.2.6.3 Immunzytochemie**

Für immunzytochemische Färbungen der intrazellulären HBV-Oberflächenproteine und des Core-Proteins wurden transfizierte HuH7-Zellen vorsichtig mit einem Zellschaber von der Zellkulturschale gelöst, durch 10-minütige Zentrifugation bei 800 rpm pelletiert und in 4 % Formalin fixiert. Das Pellet wurde in 2 % Agarose eingebettet. Es folgte eine Dehydrierung durch Inkubation in 70 %, 80 %, 96 % und absolutem Alkohol sowie in Xylol und 2 x in 60 °C warmem Paraffin. Nach Aushärtung des Paraffins bei RT wurden von dem Block 2–3  $\mu$ m dicke Schnitte angefertigt, auf SuperFrost Plus Objektträger (Menzel-Gläser, Braunschweig) aufgebracht und 2 Tage bei 40 °C im Brutschrank getrocknet. Zur Entparaffinierung wurden die Schnitte 3 x 10 min in Xylol inkubiert und nacheinander in absolutem (3 x), 96 %, 80 % und 70 % Alkohol sowie destilliertem Wasser gespült. Um die Antigene innerhalb der Zelle zu demaskieren, wurden die Schnitte 5 min in 0,01 M Citratpuffer (2 mM Citronensäure-Monohydrat, 8 mM Natriumcitrat, pH 6) im Schnellkochtopf gekocht und anschließend in TBS (7 mM Tris, 0,04 M Tris-HCl, 0,15 M

NaCl) gespült. Die Schnitte wurden mit einem Wachsstift umrandet und zur Reduzierung von unspezifischen Antikörperbindungen und Hintergrund mit Blocking Reagent (Biocare Medical, Concord, CA, USA) betropft. Nach 10 min Inkubation wurde die Blockierungslösung ohne Spülen durch Abfließen entfernt. Die Schnitte wurden mit 100 µl der in hintergrundreduzierendem Antibody Diluent (DakoCytomation) verdünnten Primärantikörper (siehe Tab. 4.3, MA 18/7 8 µg/ml, F6 20 µg/ml, Q19/10 2 µg/ml, RF18 34 µg/ml, Anti-CoreSN 1:250) 60 min bei RT inkubiert. Die Detektion basierte auf der konventionellen Methode mit markiertem Streptavidin und Biotin (4plus ALP 1000 Universal Kit, Biocare Medical). Die Schnitte wurden dazu zunächst mit Leitungswasser, TBS-Tween (0,025 % Tween20 in TBS) und gründlich mit TBS gespült. Dann folgten 20 min Inkubation mit biotinyliertem Sekundärantikörper (aus dem Kit, entsprechend Anti-Maus oder Anti-Kaninchen, Tab. 4.4) und, nach weiterem Spülen mit TBS, 20 min Inkubation mit Streptavidin-gekoppelter AP. Wieder wurden die Schnitte mit TBS gespült. Zur Darstellung wurden sie 7 min mit frisch angesetztem Fast Red (Sigma) als Chromogen inkubiert und in Leitungswasser sowie destilliertem Wasser gespült. Zur Gegenfärbung der Zellkerne wurden die Schnitte ca. 60–90 s in Hämalaun (sauer nach Meyer, Dr. K. Hollborn & Söhne, Leipzig) getaucht und ca. 5 min unter fließendem Wasser gebläut. Aus dem Wasser wurden die Schnitte schließlich mit Aquatex (Merck) eingedeckt und mit einer Olympus-Kamera in 100facher Originalvergrößerung fotografiert.

#### **4.2.6.4 Immunfluoreszenz-Doppel-Färbungen**

Für die Immunfluoreszenz-Färbungen wurden zunächst maximal 3 abgeflamte Deckgläser (18 x 18, Menzel-Gläser) nebeneinander in einer 55 cm-Zellkulturschale positioniert. 200000 HuH7 Zellen wurden darauf ausgesät (siehe Abschnitt 4.2.4.1) und am nächsten Tag wie üblich transfiziert (siehe Abschnitt 4.2.4.3). Vier Tage später wurden die bewachsenen Deckgläser in 6-well-Platten mit je 1 Deckglas pro Well umgelagert, mit 2 ml PBS vorsichtig gewaschen und mit 1 ml Methanol 15 min bei  $-20^{\circ}\text{C}$  fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden je 50 µl 5%iges Eselserum (Jackson Immuno Research, West Grove, PA, USA, Spezies des 2. Antikörpers) in PBS zum Blockieren auf den Deckgläsern verteilt, die dann 30 min in einer feuchten Kammer (mit PBS befeuchtetes Filterpapier im Deckel der 6-Well-Platte) bei RT inkubiert wurden. Es folgte ein kurzer Waschschrift und 1 h Inkubation mit 50 µl der Verdünnung des 1. Antikörpers in PBS bei  $37^{\circ}\text{C}$  in der feuchten Kammer. Die Primär-Antikörper zur Detektion der HBV-Proteine und zellulärer Kompartimente (siehe Tab. 4.3) wurden in den folgenden Verdünnungen verwendet. Maus MA 18/7 (präS1), Maus F6 (präS2), Maus RF18 (S), Kaninchen Anti-CoreSN (HBV-Core) und Maus Anti-58K

(Golgi-Kompartiment): 1:250, Maus Anti-Hsp/c 70 (Zytoplasma), Maus Anti-PDI (ER-Lumen): 1:500, Kaninchen Anti-Calnexin (ER-Membran): 1:200, Kaninchen Anti-Rab2 (Post-ER/Prä-Golgi intermediäres Kompartiment): 1:100. Nach 3 x kurzem und 3 x 10-minütigem Waschen auf dem Wiegeschüttler wurden die Deckgläser mit 50 µl der 1:1000-Verdünnung der beiden sekundären Antikörper (Tab. 4.4, Anti-Kaninchen Alexa Fluor 594 [rot] und Anti-Maus Alexa Fluor 488 [grün]) in der feuchten Kammer 1 h bei 37 °C inkubiert. Dieser und alle folgenden Schritte erfolgten möglichst lichtgeschützt. Die Deckgläser wurden 3 x kurz und 3 x 10 min gewaschen, zur Kernfärbung 15 min bei 37 °C mit 50 µl einer 1:25000 Verdünnung von DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindol-Dihydrochlorid, Molecular Probes) inkubiert und nochmals 2 x mit PBS gewaschen. Schließlich wurden die getrockneten Deckgläser mit Fluoreszenz-Eindeckmedium (DAKO) auf Objektträger eingedeckt und dunkel und kühl gelagert. Die Untersuchungen und Aufnahmen der Färbungen wurden mit einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop (Zeiss LSM 510) durchgeführt.

Zur Kofärbung der HBV-Proteine mit F-Aktin wurde das Protokoll leicht verändert. Die Fixierung der Zellen erfolgte 20 min bei 4 °C in 4 % Paraformaldehyd in PBS. Für Blockierung sowie Antikörperverdünnungen wurden 10 % BSA in PBS mit 0,05% Tween verwendet. Zur Detektion des F-Aktin wurden die Zellen zusammen mit dem 2. Antikörper zur HBV-Färbung mit einer 1:800 Verdünnung von FITC-markiertem Phalloidin (Sigma) inkubiert.

#### **4.2.6.5 HBsAg- und HBeAg-Nachweis aus dem Zellkulturüberstand**

HBsAg und HBeAg wurden mit kommerziell erhältlichen ELISA-Test-Kits (DiaSorin) im Zellkulturüberstand nachgewiesen. Zur Auswertung wurde die S/C-Ratio, d. h. die Extinktion der Probe, dividiert durch die Extinktion des Grenzwertes, herangezogen. Um im aussagekräftigen linearen Bereich der Tests zu bleiben, wurden die Proben je nach Bedarf pur, 1:10 oder 1:50 verdünnt eingesetzt.

## 5 Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde der Phänotyp von komplexen HBV-Varianten mit Mutationen im Cp bzw. X-Gen, Deletionen im C-Gen und zum Teil Deletionen im präS-Bereich untersucht, die bei Langzeit-immunsupprimierten Nierentransplantatempfängern mit schwerer Lebererkrankung akkumulierten. Von einem im Vergleich zu Wt-HBV veränderten Phänotyp wurden dabei Hinweise auf die Rolle der komplexen Varianten bei der Entwicklung der LZ erhofft. Zur funktionellen Analyse wurden aus Serum und Leber isolierte und in voller Länge klonierte HBV-Genome von 2 repräsentativen Patienten verwendet. Die klinischen Daten der Patienten und die Evolution der Viruspopulationen im Krankheitsverlauf von einer milden chronischen Hepatitis zur LZ sind in Abschnitt 3 zusammengefasst.

Zellen der humanen Hepatomazelllinie HuH7 wurden mit der HBV-Gesamtgenom-DNA transfiziert. Nur wo ausdrücklich erwähnt, wurden zusätzlich Zellen einer weiteren Hepatomazelllinie, HepG2, verwendet. Dabei wurde die Transfektionseffizienz in jedem Ansatz durch Kotransfektion mit dem SEAP-Plasmid kontrolliert (siehe Abschnitt 4.2.4.4). Nach 4–5 Tagen wurden Transkription, Proteinexpression und Replikation der komplexen Varianten im Vergleich zu Referenz-Wt-Genomen analysiert. Bei Veränderungen in jedem dieser Schritte des Replikationszyklus wären Auswirkungen auf zelluläre Prozesse und/oder zytotoxische Folgen denkbar. Als Referenz dienten ein Wt-Genom des Genotyps D (WtD), mit dem ein Großteil früherer funktioneller Analysen durchgeführt wurde und das daher gut charakterisiert war, und zusätzlich ein Wt-Genom des Genotyps A (WtA), da die Patienten mit HBV des Genotyps A infiziert waren. Um festzustellen, wie sich der Phänotyp der komplexen Varianten von dem der Genome der ursprünglichen Viruspopulation vom Stadium der asymptomatischen chronischen Hepatitis unterscheidet, wurden außerdem Wt-ähnliche Genome ohne Deletionen und Insertionen aus einer frühen Serumabnahme der Patienten funktionell charakterisiert.

### 5.1 Screening und Überblick über phänotypische Veränderungen in den HBV-Populationen

Aus früheren Untersuchungen war bekannt, dass nur ein Teil der mit der in Abschnitt 4.1.4.1 beschriebenen Methode hergestellten Gesamtgenom-Klone *in vitro* replikationsfähig ist, hauptsächlich aufgrund von während der PCR eingeführten Mutationen [151]. Daher musste zunächst die Replikationskompetenz der verfügbaren klonierten HBV-Genome der beiden Patienten überprüft werden. Für die replikationskompetenten Genome wurden anschließend

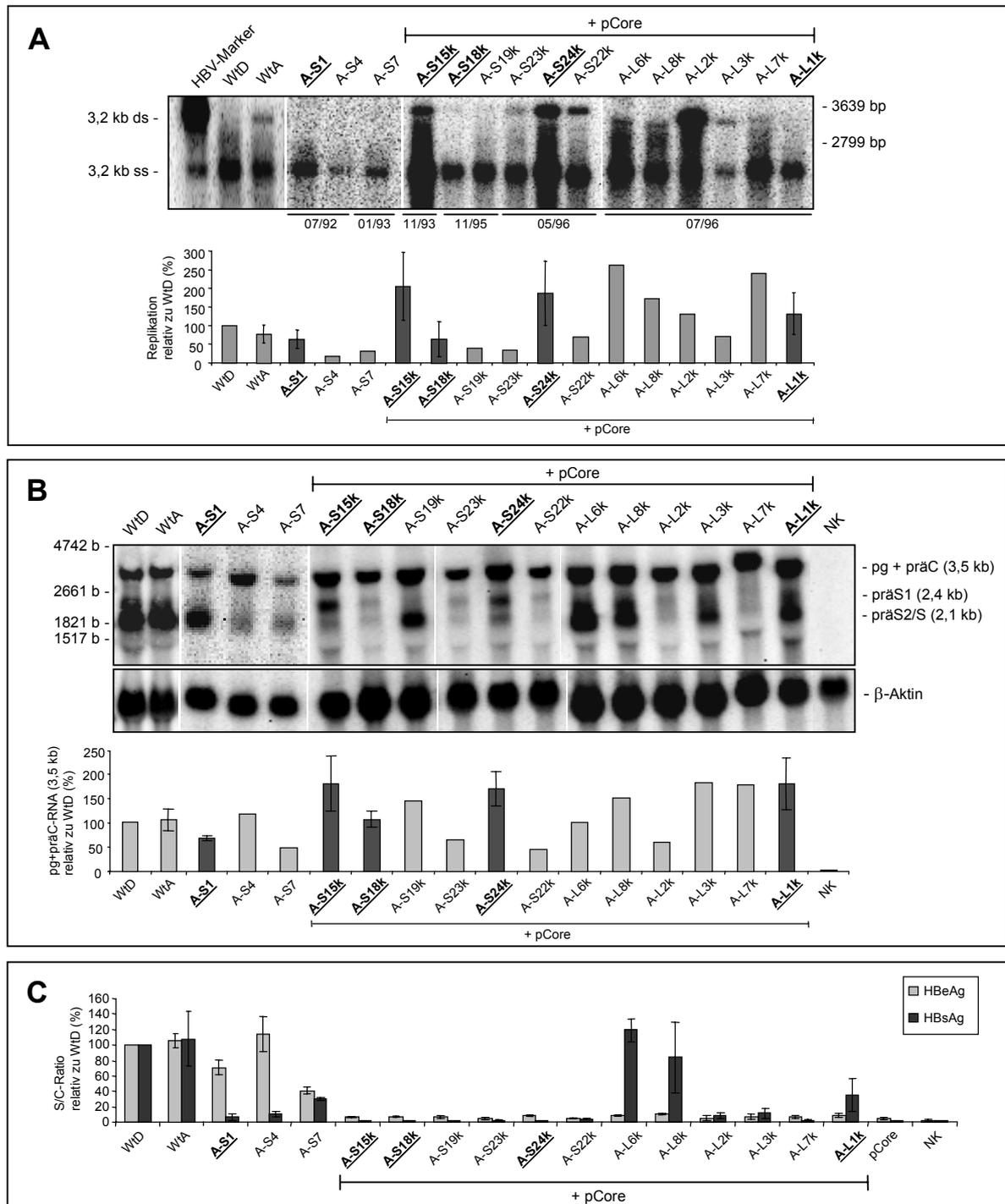
auch Transkription und Expression von HBsAg und HBeAg im Zellkulturüberstand analysiert, um einen Überblick über die phänotypischen Veränderungen in den HBV-Populationen der Patienten während des Krankheitsverlaufs zu erhalten. Die Klone wurden je nach Patient mit den Buchstaben „A“ oder „B“ sowie je nach ihrer Herkunft aus Serum oder Leber mit den Buchstaben „S“ oder „L“ und fortlaufenden Nummern bezeichnet. Außerdem erhielten komplexe Varianten zur einfacheren Identifizierung am Ende der Bezeichnung ein zusätzliches „k“ (Bsp. A-S1 und A-S15k).

### *5.1.1 Replikation*

Der Nachweis der Replikation erfolgte durch Southern Blots der aus zytoplasmatischen Core-Partikeln isolierten replikativen Intermediate. Wie aus früheren Arbeiten bekannt, benötigen HBV-Genome mit Deletionen im C-Gen zur Replikation die Komplementation mit funktionellem Wt-Core-Protein. Die entsprechenden Genome der Patienten wurden daher mit dem Core-Expressionsplasmid pCore kotransfiziert.

Bei Patient A erwiesen sich 15 von 33 untersuchten Klonen als replikationskompetent (vgl. Abb 5.1 und 5.2). Diese repräsentieren 5 häufige Variantentypen (vgl. Abschnitt 3.1.2 und Abb. 5.2) und stammen aus 5 verschiedenen Serumabnahmen und der zirrhotischen Leber. Von den 3 replikationskompetenten Klonen aus sehr frühen Serumproben ist einer Wt-ähnlich ohne Deletionen oder Insertionen (Typ A: A-S1) und 2 tragen Punktmutationen im Cp und eine kleine Deletion im präS2 (Typ B: A-S4, A-S7). Die 12 übrigen Klone aus späteren Abnahmen zeichnen sich dagegen durch komplexe Mutationsmuster mit C-Gendeletionen, Deletionen im präS-Bereich und verschiedenen Mutationen im Cp aus (Variantentypen E, F und J, Abb. 5.2).

Im Falle von Patient B replizierten 10 von 43 getesteten Klonen 4 verschiedener Variantentypen (Abschnitt 3.2.2, Abb. 5.3 und 5.4) aus 3 Serumabnahmen. Die 3 der 10 replikationskompetenten Klone, die zu einem frühen Zeitpunkt vor LZ isoliert wurden, sind Wt-ähnliche Klone ohne Deletionen/Insertionen und nur einer Punktmutation im Cp (Typ A: B-S1, B-S2, B-S3). Die 6 replizierenden komplexen Varianten mit C-Gendeletion und Deletion oder Punktmutationen im Cp (Typen D und E) stammen dagegen wiederum aus späten Serumabnahmen während der LZ. Eine Variante aus der letzten Serumprobe des Beobachtungszeitraums trägt Deletionen im präS1 und Cp, aber nicht im C-Gen (B-S9, Typ C, vgl. Abb. 5.4).



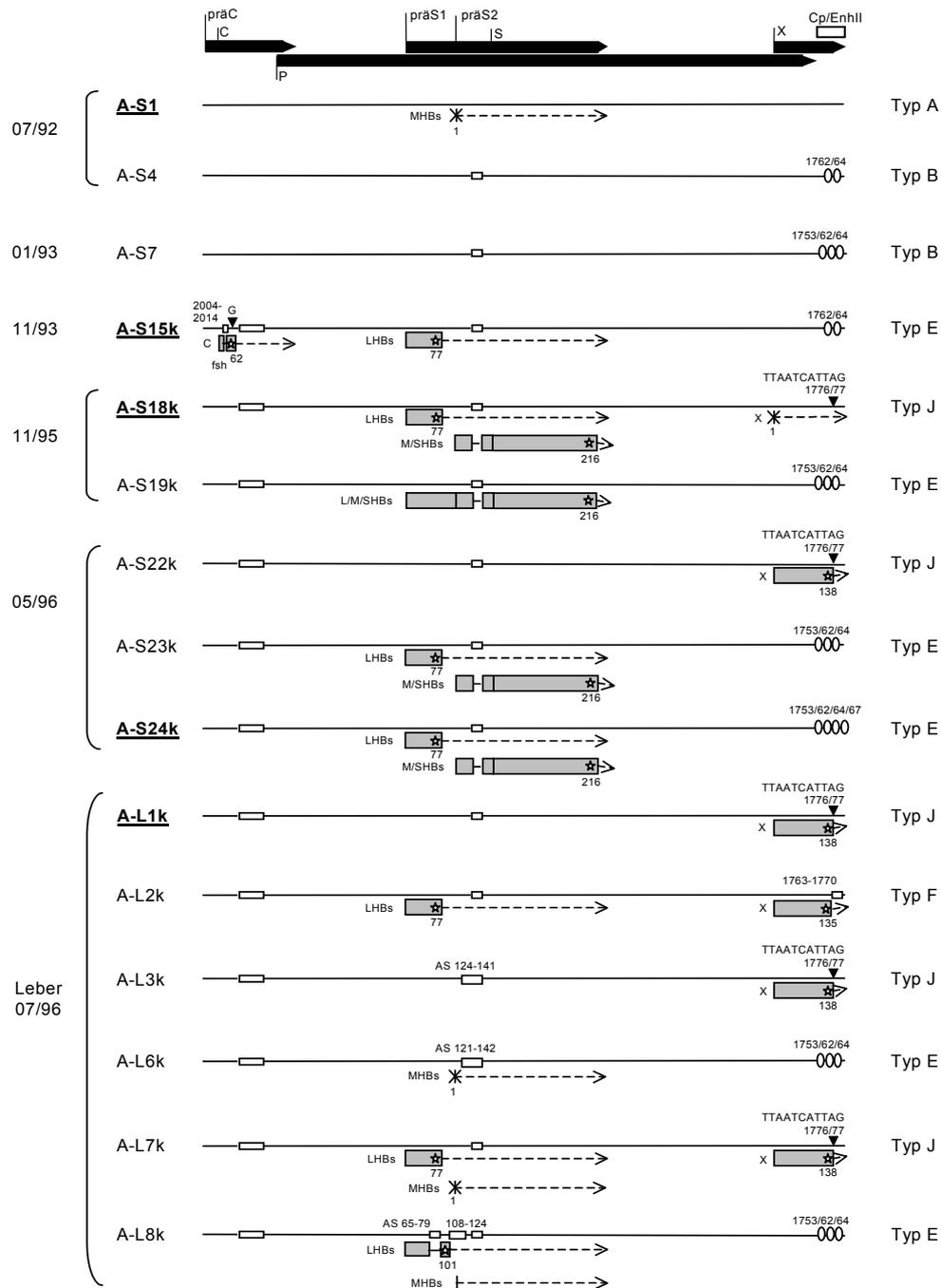
**Abbildung 5.1: Phänotypische Analyse von 15 HBV-Genomen des Patienten A im Vergleich zu den Wt-Genomen.** Für die Analysen wurden mit HBV-Gesamt-Genom-DNA transfizierte HuH7-Zellen eingesetzt. Dabei wurden Genome mit C-Gendeletion zur Wiederherstellung der Replikationskompetenz mit pCore kotransfiziert (+ pCore). Später im Detail analysierte Klone sind fett gedruckt und unterstrichen. A: Die Analyse der replikativen Intermediate aus zytoplasmatischen Core-Partikeln erfolgte im Southern Blot (oben). Als HBV-Marker diente das 1:1000 verdünnte Produkt einer asymmetrischen PCR von HBV-Gesamtgenom mit einem 3,2-kb-Doppelstrang (ds)- und einem 3,2-kb-Einzelstrang (ss)-Fragment. Rechts sind die Positionen zweier Fragmente des Dig-markierten DNA-Längenstandard VII (Roche) gezeigt. Unter dem Blot sind die Abnahmedaten der Patientenproben angegeben, aus denen die Klone jeweils isoliert wurden. Unten: Die quantitative Auswertung der HBV-Einzelstrang-Bande im Vergleich zu WtD erfolgte mit dem TINA-Programm. Für die später detailliert analysierten Genome (dunkle Balken) sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen (StA) von mindestens 6 unabhängigen Experimenten gezeigt. Für die übrigen Klone wurde nur ein Experiment durchgeführt.

B: Analyse der Transkription. Oben: Northern Blots von Gesamt-RNA wurden mit einer HBV-Gesamtgenom-Sonde hybridisiert. Die Banden der auf gleicher Höhe laufenden pgRNA und präC-mRNA, der präS1-mRNA und präS2/S-mRNA sind zu erkennen. Links sind die Positionen der Fragmente des Dig-markierten RNA-Längenstandards II (Roche) angegeben. Als Ladekontrolle wurde  $\beta$ -Aktin-RNA mit einer entsprechenden Sonde auf den verschiedenen Blots detektiert. Unten: Die quantitative Auswertung der 3,5-kb-Bande der pgRNA und präC-mRNA ist relativ zum WtD dargestellt. Für die später detailliert analysierten Genome (dunkle Balken) sind Mittelwerte  $\pm$  StA von mindestens 3 unabhängigen Experimenten gezeigt. Für die übrigen Klone wurde nur ein Experiment durchgeführt. C: Die Analyse von HBsAg und HBeAg im Zellkulturüberstand erfolgte mittels ELISA. Dargestellt sind S/C-Ratios (Probe : Grenzwert) von 1:10-Verdünnungen der Proben relativ zum WtD in Mittelwerten  $\pm$  StA von mindestens 4 Experimenten. Als Kontrolle wurde auch pCore alleine transfiziert und zeigte schwache Signale im HBeAg-ELISA. NK = Negativkontrolle, Material von nur mit leerem Vektor pZerO transfizierten Zellen.

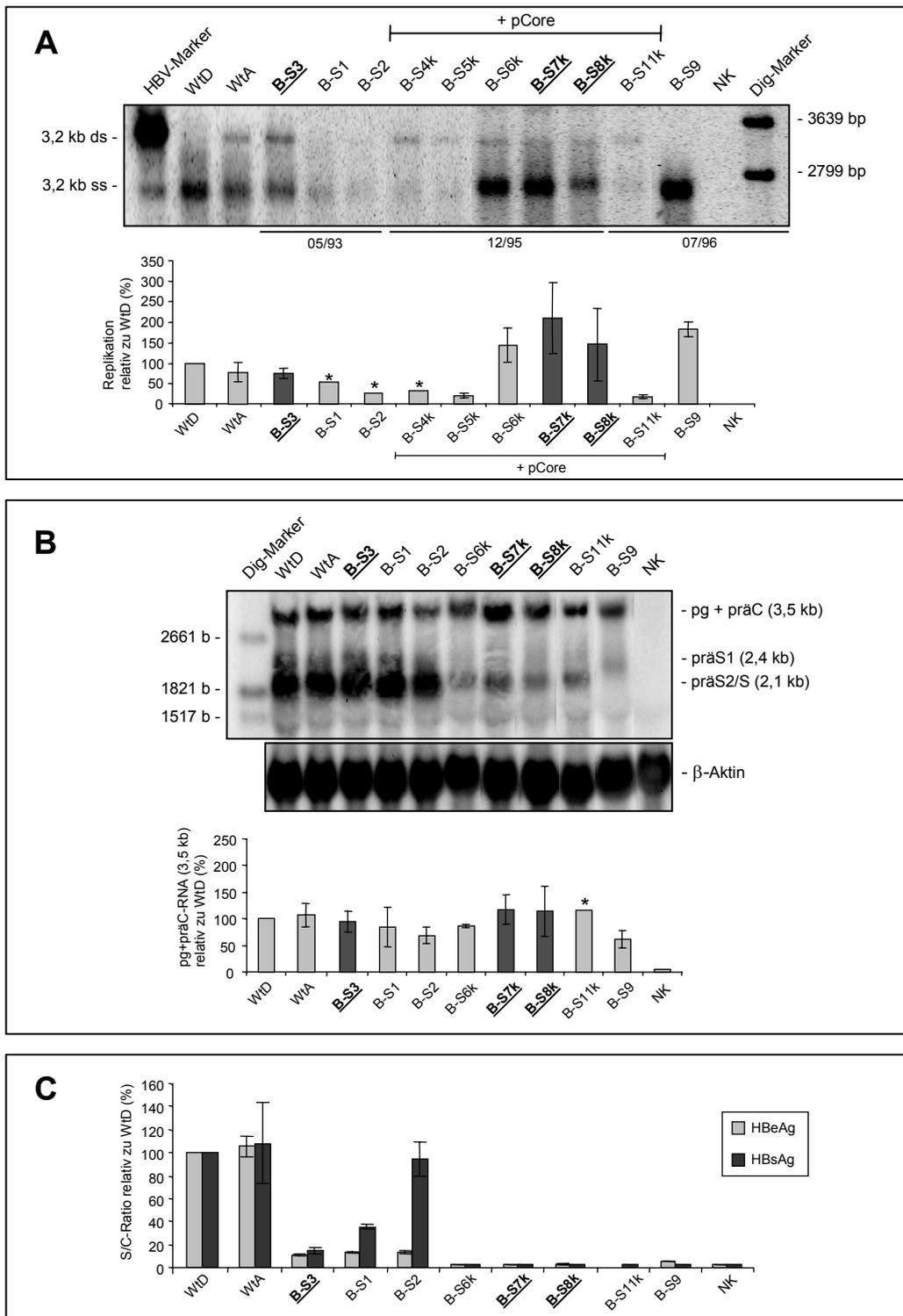
Die densitometrische Auswertung der HBV-Einzelstrangbanden im Southern Blot ergab zwischen den Klonen stark variierende Replikationslevel, von unter 20 % (z. B. A-S4, B-S11k) bis zu über 200 % (z. B. A-S15k, A-L6k, B-S7k) im Vergleich zum WtD (Abb. 5.1A und 5.3A). Die Replikation des WtA lag bei ca. 76 % des WtD. Bei Patient A zeigte die Mehrzahl der komplexen C-Gendeletionsvarianten nach Komplementation mit pCore eine höhere Replikation als WtD, WtA und die 3 Genome ohne C-Gendeletion. Bei Patient B replizierten hauptsächlich die Genome des Variantentyps D, der im Beobachtungszeitraum akkumulierte, verstärkt im Vergleich zu den beiden Wt-Genomen WtD und WtA.

### 5.1.2 Transkription

Zum Nachweis der viralen RNAs wurden Northern Blots mit der gesamten RNA der transfizierten HuH7-Zellen und einer das gesamte HBV-Genom umfassenden Sonde durchgeführt. So wurden die 3,5 kb große Bande von pgRNA und präC-mRNA sowie die beiden Banden der Oberflächen-mRNAs (präS1- und präS2/S-mRNA) detektiert (Abb. 5.1B, 5.3B). WtD und WtA unterschieden sich nicht in ihrer Transkription. Die komplexen Varianten der Patienten zeigten im Vergleich zu den Wt-Genomen und zu den Wt-ähnlichen Klonen (jeweils Typ A: A-S1 und B-S1, -S2, -S3) ein stark verändertes Transkriptionsmuster. Dabei fielen zwischen den Varianten des Patienten A auch deutliche Unterschiede im Ausmaß der Veränderungen (Abb. 5.1B) auf, während die komplexen Varianten des Patienten B ein einheitlicheres Bild zeigten (Abb. 5.3B). Häufig, insbesondere bei Patient A, präsentierten die komplexen Varianten relativ zu den Wt-Genomen eine erhöhte Expression der 3,5-kb-RNAs (pgRNA + präC-mRNA, quantitative Auswertung in Abb. 5.1B und 5.3B unten). Des Weiteren wurden für die meisten komplexen Varianten der beiden Patienten stark reduzierte Oberflächen-mRNAs gefunden. Bei vielen komplexen Varianten des Patienten A führte dies auch zu einem erhöhten Verhältnis von präS1- zu präS2/S-mRNA. Bei den Varianten des Patienten B waren jedoch meist beide Oberflächen-mRNAs gleichermaßen reduziert.



**Abbildung 5.2: Schematische Darstellung der 15 untersuchten HBV-Genome des Patienten A.** Zur Orientierung ist das HBV-Genom oben schematisch gezeigt. Auf der horizontalen Linie, die das Genom des jeweiligen Klons repräsentiert, sind die großen Mutationen, die zur Einteilung der Variantentypen dienen (Deletionen = Rechtecke, Insertionen = kleine Dreiecke), und Nukleotidaustausche im Cp (Ellipsen) eingezeichnet. Wenn nicht anders bezeichnet, handelt es sich im C-Gen bzw. Core-Protein um die Deletion der nt 2130–2219 bzw. AS 77–106 und im präS2 der nt 50–55 bzw. AS 140–141. Erwartete Veränderungen der Genexpression durch Start- oder Stoppkodonmutationen (Kreuz bzw. Stern) sind unter dem Genom dargestellt. Die mutierte AS ist darunter angegeben. Die vermutlich exprimierten Proteinsequenzen sind durch graue Rechtecke, die vermutlich nicht exprimierten Sequenzen durch gepunktete Linien dargestellt. Links sind die Abnahmedaten der Patientenproben angegeben, aus denen die Genome jeweils isoliert wurden. Rechts sind die Variantentypen der Genome angegeben. Alle Genome tragen weitere Punktmutationen im gesamten Genom (siehe Anhang, Tab. A.1). Die zur detaillierten, funktionellen Analyse verwendeten 5 Genome sind fett gedruckt und unterstrichen.



**Abbildung 5.3: Phänotypische Analyse der 10 HBV-Genome des Patienten B im Vergleich zu den Wt-Genomen.** Für die Analysen wurden mit HBV-Genomen transfizierte HuH7-Zellen eingesetzt. Später detailliert charakterisierte Klone sind fett gedruckt und unterstrichen. In mit Stern markierte Balken ging der Wert nur eines Experiments ein. A: Die replikativen Intermediate aus zytoplasmatischen Core-Partikeln wurden im Southern Blot (oben) analysiert. Genome mit C-Gendeletion wurden zur Wiederherstellung der Replikationskompetenz mit pCore kotransfiziert. HBV-Marker und Dig-markierter DNA-Längenstandard VII (Roche) sind gezeigt. Unten: Im Diagramm sind Mittelwerte  $\pm$  StA der quantitativen Auswertung der HBV-Einzelstrang-Bande im Vergleich zum WtD von 2–6 unabhängigen Experimenten aufgeführt. Die 3 detailliert analysierten Genome sind mit dunklen Balken dargestellt. B: Analyse der Transkription. Oben sind exemplarische Northern Blots von Gesamt-RNA gezeigt, die mit einer HBV-Gesamtgenom-Sonde bzw. einer  $\beta$ -Aktin-Sonde als Ladekontrolle hybridisiert wurden. Der Dig-markierte RNA-Längenstandard II (Roche) diente

als Marker. Unten sind im Diagramm Mittelwerte  $\pm$  StA der quantitativen Auswertung der 3,5-kb-Bande von pgRNA und präC-mRNA relativ zu WtD von 2–3 unabhängigen Experimenten gezeigt. Die 3 detailliert analysierten Genome sind mit dunklen Balken dargestellt. C: Die Analyse von HBsAg und HBeAg im Zellkulturüberstand erfolgte mittels ELISA. Die S/C-Ratio (Probe : Grenzwert) bei 1:50-Verdünnung der Proben ist relativ zu WtD dargestellt. Mittelwerte  $\pm$  StA von 2–5 (HBsAg) bzw. 2 (HBeAg) Experimenten sind gezeigt. Für weitere Erklärungen siehe Abb. 5.1.

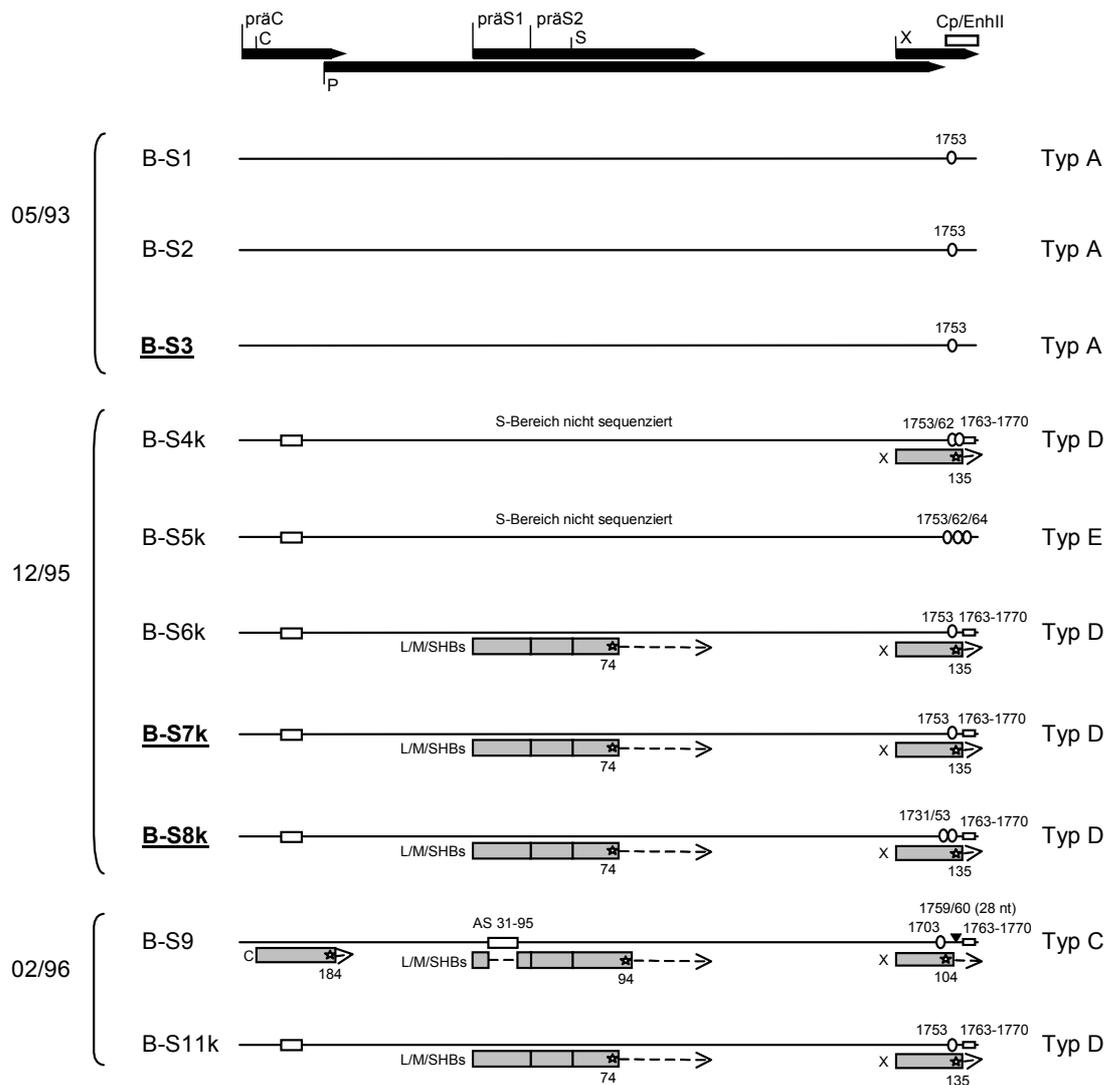
### 5.1.3 Proteinexpression

Die Level von HBeAg und HBsAg wurden im Zellkulturüberstand mittels ELISA bestimmt. WtD und WtA wiesen nahezu identische Werte auf.

Alle komplexen Varianten mit Deletion im C-Gen zeigten keine HBeAg-Expression (Abb. 5.1C und 5.3C). Für die Genome ohne C-Gendeletion wurden bei Patient A meist annähernd Wt-HBeAg-Level (A-S4, A-S1), bei Patient B überraschenderweise jedoch nur eine sehr geringe HBeAg-Expression nachgewiesen.

Auch die HBsAg-Expression aller komplexen Varianten des Patienten B und der meisten komplexen Varianten des Patienten A war komplett gestört (Abb. 5.3C und 5.1C). Lediglich einige Klone aus den frühen Serumabnahmen und einige Varianten aus der Leber von Patient A zeigten eine geringe bis normale HBsAg-Expression. Die Abwesenheit von HBsAg korrelierte meist mit Stoppkodonmutationen im S-Bereich (z. B. L216\* bei Varianten von Patient A, W74\* bei Varianten von Patient B) und/oder fehlenden Oberflächen-mRNAs (z. B. A-L7k). Eine verringerte HBsAg-Expression lag bei Genomen mit verschiedenen Kombinationen von Mutationen (inklusive der präS1-Stoppkodonmutation W77\* bei Patient A) und niedrigen mRNA-Leveln vor.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die Varianten der beiden Patienten einen im Vergleich zu den Wt-Genomen stark veränderten Phänotyp aufwiesen, der im Detail und Ausmaß insbesondere bei Patient A von Genom zu Genom deutlich variieren konnte. Insgesamt zeigten viele Varianten eine erhöhte Replikation, eine erhöhte Expression von pg/präC-RNA, eine reduzierte Expression von Oberflächen-mRNAs und einen Defekt in HBeAg und HBsAg-Expression bzw. -Sekretion. Die zu sehr frühen Zeitpunkten isolierten Wt-ähnlichen Genome (Typ A) waren dagegen bis auf Defekte in HBsAg- und HBeAg-Expression durch einen eher Wt-ähnlichen Phänotyp charakterisiert.

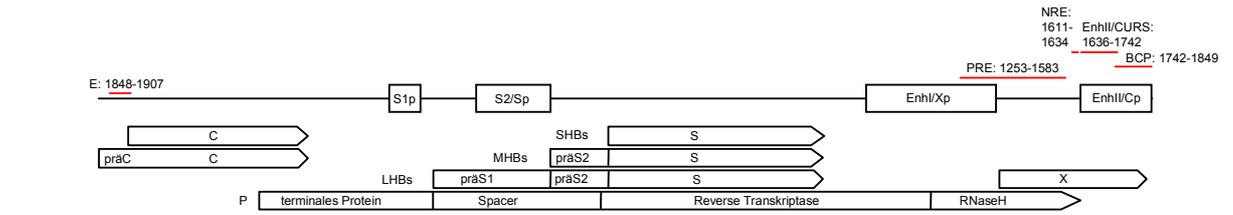


**Abbildung 5.4: Schematische Darstellung der 10 untersuchten HBV-Genome des Patienten B.** Zur Erklärung siehe Abb. 5.2. Die Deletion im C-Gen der Genome von Patient B liegt bei nt 2129–2179 (AS 77–93 des Core-Proteins). Weitere Punktmutationen im gesamten Genom aller Klone sind im Anhang in Tab. A.2 aufgeführt.

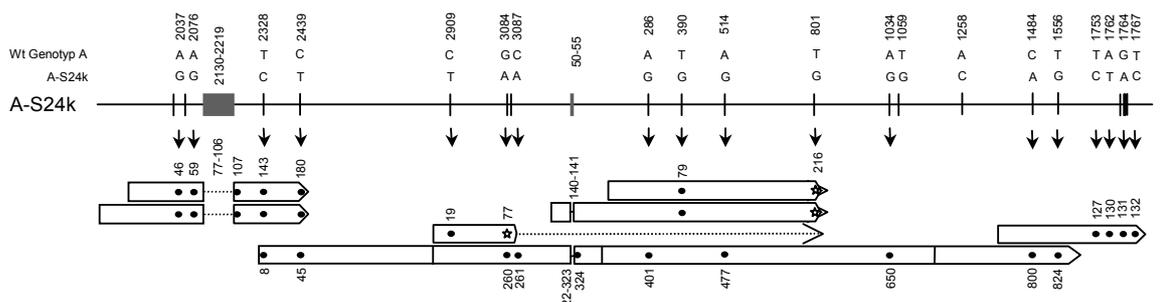
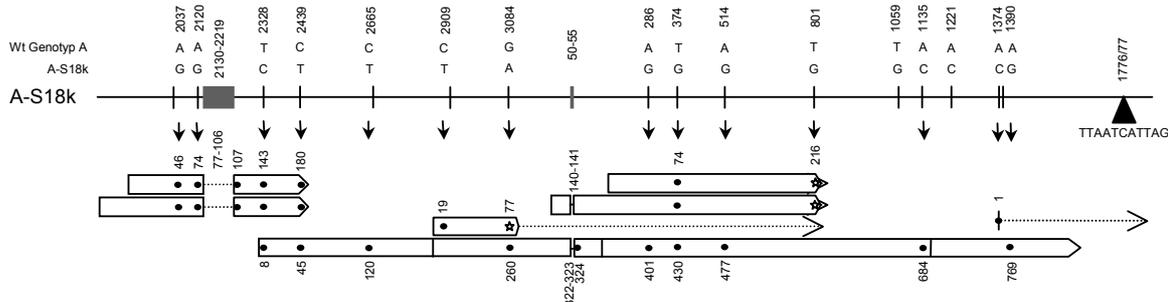
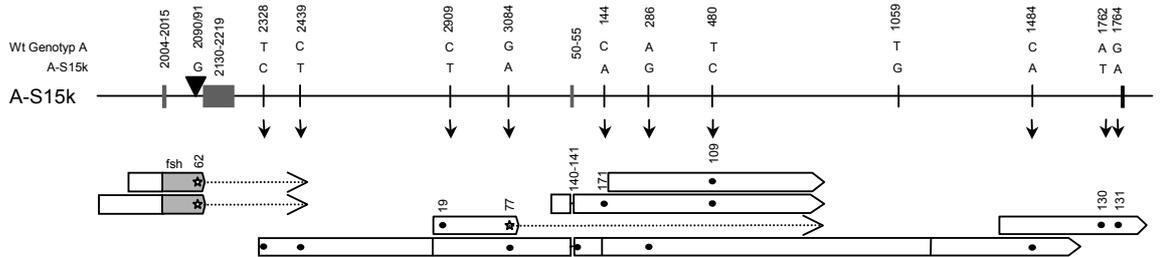
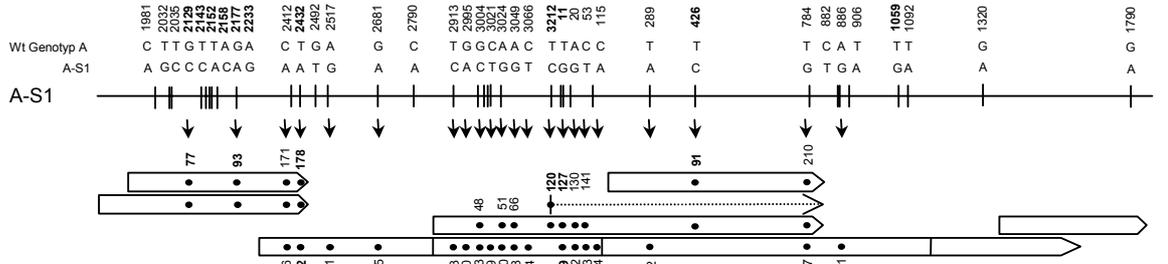
## 5.2 Analyse von komplexen Varianten

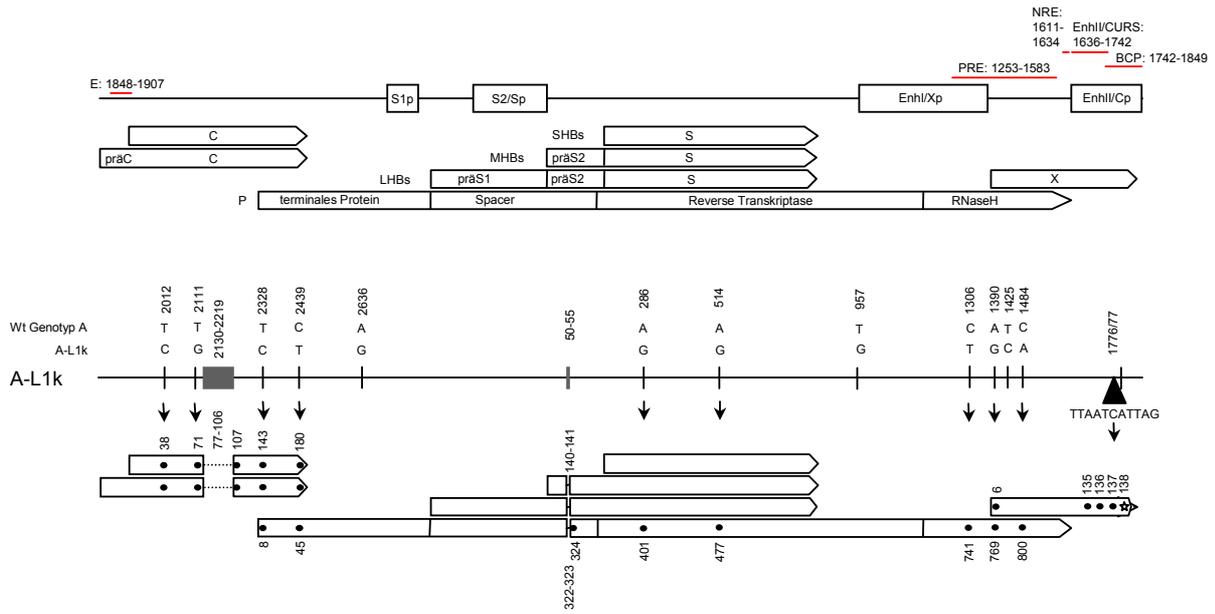
Nach Feststellung der Replikationskompetenz und dem phänotypischen Überblick über die HBV-Populationen der Patienten folgte die eigentliche detaillierte funktionelle Analyse ausgewählter Genome. Von jedem Patienten wurden repräsentative Varianten der Typen charakterisiert, die vor Verschlechterung der Leberfunktion auftraten und während der Entwicklung der LZ im jeweiligen Patienten akkumulierten.

Für den Patienten A waren dies nacheinander die Typen E im Serum und J in der Leber (Abschnitt 3.1.2, Abb. 3.1), von denen 4 Varianten zur Analyse ausgewählt wurden: A-S15k, A-S18k, A-S24k und A-L1k. Die Varianten des Typs E (A-S15k, A-S24k) sind im Cp durch

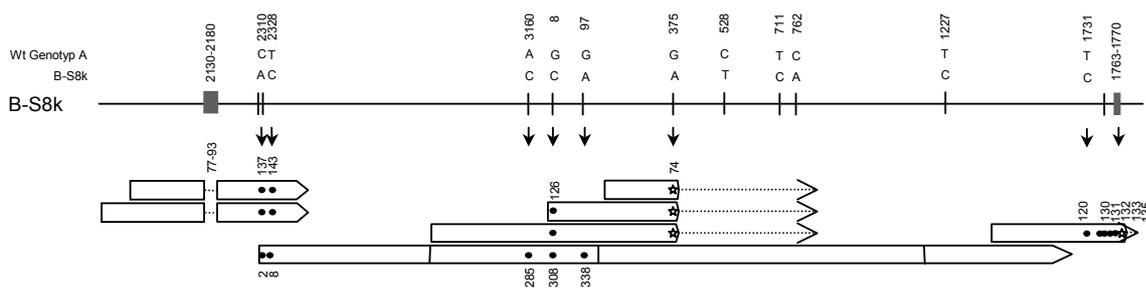
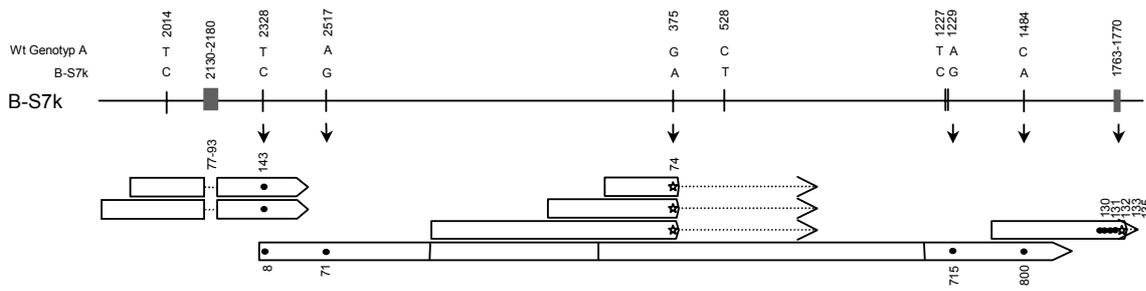
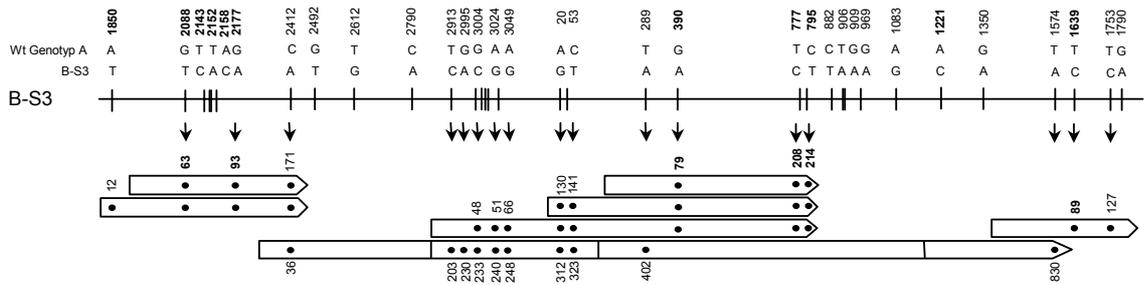


**Patient A**





**Patient B**



**Abbildung 5.5: Detaillierte schematische Darstellung der genauer analysierten Wt-ähnlichen Genome und komplexen Varianten der Patienten A und B.** Oben auf jeder Seite ist zur Orientierung das HBV-Genom mit seinen regulatorischen Sequenzen dargestellt: S1-Promotor (S1p), S2/S-Promotor (S2/Sp), Enhancer I/X-Promotor (EnhI/Xp), Enhancer II/Core-Promotor (EnhII/Cp) mit basalem Core-Promotor (BCP), Core stromaufwärts regulierender Sequenz (CURS) und dem negativ regulatorischen Element (NRE), das posttranskriptionell regulatorische Element (PRE) und das Verpackungssignal Epsilon (E). Darunter sind die HBV-Proteine mit den Unterteilungen von Präcore-Protein, Oberflächenproteinen und Polymerase in die einzelnen Regionen gezeigt. Für jeden Patienten sind beim jeweiligen Wt-ähnlichen Genom (A-S1 und B-S3) auf der horizontalen Linie alle Mutationen im Vergleich zum Referenz-Genom des Genotyps A (Valenzuela [43], GenBank-Nr. X02763) mit ihrer Position angegeben. Mit Ausnahme der fett gedruckten Austausche, die nur individuell bei A-S1 bzw. B-S3 auftraten, lagen die Mutationen bei allen Klonen des gleichen Patienten vor. Striche repräsentieren Nukleotid austausche, graue Rechtecke Deletionen und schwarze Dreiecke Insertionen. Darunter sind die Konsequenzen der Mutationen auf AS-Ebene in den verschiedenen Proteinen gezeigt. In den Oberflächenproteinen wurden die AS dabei vom Startkodon des LHBs bzw. SHBs an gezählt, im C-Gen vom Start des Core-Proteins an. In den Schemata der 4 komplexen Varianten des Patienten A und der 2 komplexen Varianten des Patienten B wurden nur die Austausche angegeben, die zusätzlich zu den bereits im jeweiligen Wt-ähnlichen Genom A-S1 oder B-S3 bzw. bei allen Varianten des Patienten vorhandenen auftraten.

Punktmutationen (nt 1762 A>T, 1764 G>A; A-S24k auch 1753 T>C und 1767 T>C) und die Varianten des Typs J (A-S18k, A-L1k) durch eine 11-nt-Insertion an Nukleotidposition 1776/1777 gekennzeichnet, die jeweils auch im X-Protein in Punktmutationen (z. B. K130M und V131I) bzw. Punktmutationen und einem verfrühten Stoppkodon (R138\*) resultieren (detaillierte Mutationsschemata in Abb. 5.5). Des Weiteren tragen all diese Varianten eine Deletion von 90 nt im C-Gen (nt 2130–2219) bzw. 30 AS im Core-Protein (AS 77–106) und eine 2-AS-Deletion im präS2-Bereich (AS 140–141, nt 50–55). Bei allen Varianten befinden sich außerdem weitere Punktmutationen überall im Genom, die u. a. zu verschiedenen Stoppkodons in den Oberflächengenen führen. Die Varianten A-S15k und A-S18k wurden vor Entwicklung der LZ zu Zeitpunkten isoliert, als die Variantentypen E und J erst jeweils ca. 20 % der Viruspopulation ausmachten. Die Varianten A-S24k und A-L1k stammen von späteren Zeitpunkten während der LZ, als die Typen E und J mit ca. 50 % nacheinander jeweils die Hauptviruspopulation bildeten (Abb. 3.1).

Im Patienten B akkumulierten Varianten des Typs D, die zum Zeitpunkt der Diagnose der LZ (12/95) bereits ca. 70 % der Viruspopulation stellten (Abb. 3.2). Die beiden ausgewählten, zu diesem Zeitpunkt isolierten, komplexen Varianten des Typs D (B-S7k, B-S8k, alle Mutationen in Abb. 5.5) tragen eine Deletion von 51 nt im C-Gen (nt 2130–2180) bzw. 17 AS im Core-Protein (AS 77–93), eine 8-nt-Deletion (nt 1763–1770) und eine Punktmutation (nt 1753 T>C) im Cp sowie eine Stoppkodonmutation bei AS 74 im S-Bereich. Die Cp-Deletion führt ebenfalls zu Punktmutationen und einem verfrühten Stoppkodon im X-Protein. Im Unterschied zu Varianten des Patienten A hat keine der Varianten von Patient B Deletionen im präS-Bereich. Außerdem befinden sich in den Varianten des Patienten B deutlich weniger zusätzliche Punktmutationen im gesamten Genom. Neben den komplexen

Varianten wurde zum Vergleich, stellvertretend für die ursprüngliche Viruspopulation während der milden chronischen Hepatitis, jeweils ein Wt-ähnliches Genom der Patienten ohne Deletionen oder Insertionen (Typ A) charakterisiert (A-S1 und B-S3, alle Punktmutationen in Abb. 5.5). Diese stammen aus sehr frühen Serumproben (Abb. 3.1A, 3.2A) des Beobachtungszeitraums.

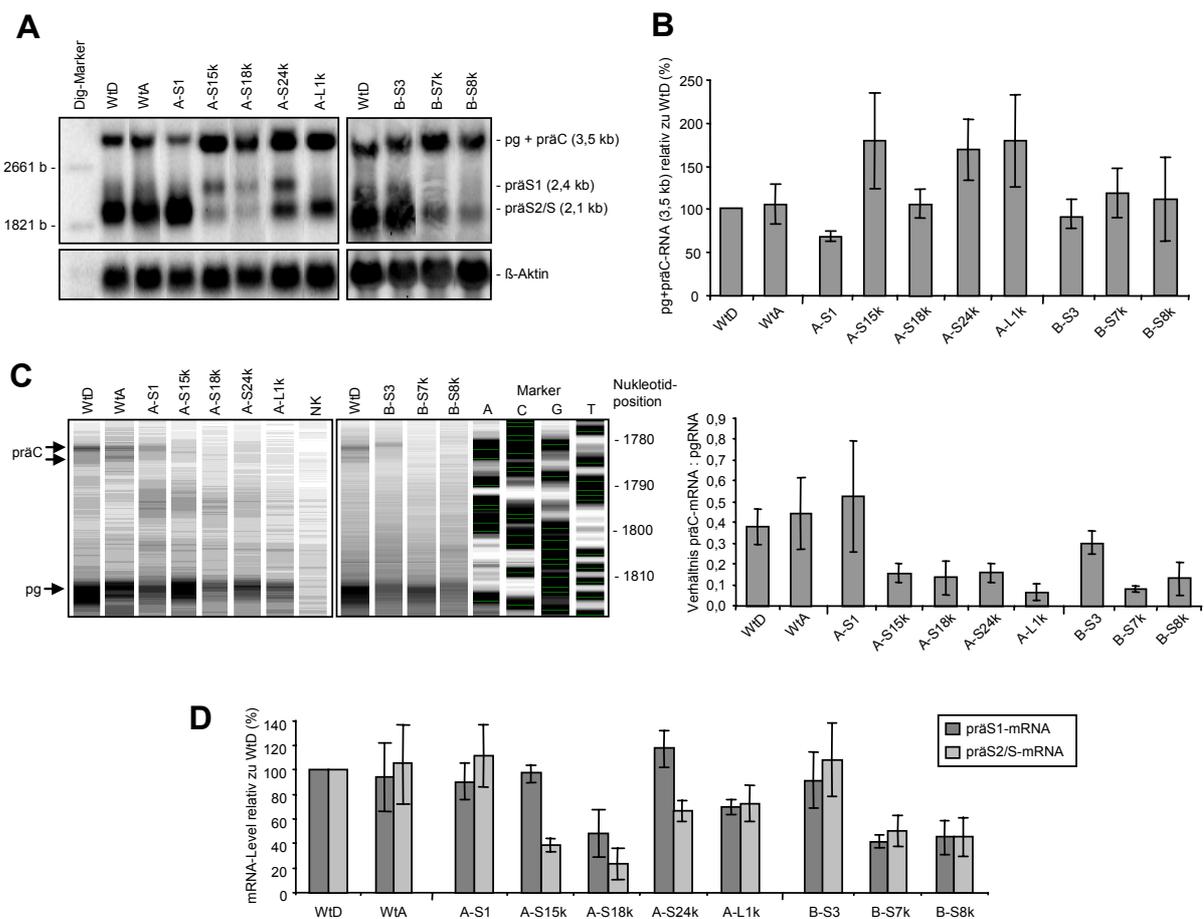
### 5.2.1 Transkription

Die Transkription der viralen RNAs, die von der cccDNA im Kern sofort nach deren Komplettierung erfolgt, wurde wieder mit Northern Blots von Gesamt-RNA und deren densitometrischer Auswertung analysiert. Alle komplexen Varianten zeigten eine verstärkte 3,5-kb-mRNA-Bande im Vergleich zu den Wt-Genomen und den Wt-ähnlichen Genomen A-S1 und B-S3 (Abb. 5.6A und B). Bei den Varianten von Patient A war dies mit über 170 % von WtD und WtA besonders deutlich. Diese Bande enthielt sowohl die pgRNA als auch die am 5'-Ende nur ca. 30 nt längere, HBeAg-kodierende präC-mRNA, die sich im Northern Blot nicht unterscheiden lassen.

Daher wurden zur Differenzierung von pgRNA und präC-mRNA zusätzliche Primer-Extension-Analysen durchgeführt (Abb. 5.6C). Mithilfe dieser Methode können RNAs mit unterschiedlichen 5'-Enden präzise in einem hochauflösenden Gel aufgetrennt werden. Das Mitführen einer Sequenzierreaktion als Marker ermöglicht außerdem die nukleotidgenaue Bestimmung der Transkriptionsstartpositionen. Wie erwartet, zeigten sich im Gel bei beiden Wt-Genomen 2 präC-mRNAs mit heterogenem Transkriptionsstart zwischen nt 1781 und 1785 und die pgRNA mit einem Transkriptionsstart bei nt 1812–1816 (Abb. 5.6C, links). Bei den Varianten waren im Vergleich zu den Wt-Genomen die präC-mRNA-Signale stark vermindert. Das aus den Bandenintensitäten ermittelte Verhältnis der präC-mRNAs zur pgRNA war für alle komplexen Varianten im Vergleich zu WtD mindestens 2,4fach, im Vergleich zu WtA mindestens 2,6fach reduziert (Abb. 5.6C, rechts). A-S1 und B-S3 dagegen zeigten ein eher WtD/WtA-ähnliches Verhältnis. Aus der Primer-Extension-Analyse folgte, dass die verstärkten 3,5-kb-Banden der komplexen Varianten im Northern Blot aus einer erhöhten Expression von pgRNA resultierten.

Im Gegensatz zu den Wt-ähnlichen Genomen A-S1 und B-S3 mit unveränderten Oberflächen-mRNAs im Vergleich zu den beiden Referenz-Wt, zeigten die Northern Blots für die komplexen Varianten größtenteils reduzierte Oberflächen-mRNAs (Abb. 5.6A und D). Nur die präS1-mRNA-Expression der Varianten A-S15k und A-S24k mit Punktmutationen im Cp war unvermindert. Die beiden Varianten A-S18k und A-L1k mit Cp-Insertion demonstrierten

eine leicht, auf 50 bzw. 70 % reduzierte präS1-mRNA. Bei A-L1k lag die präS2/S-mRNA-Expression ebenfalls bei ca. 70 % der Wt-Genome und damit auf gleichem Niveau wie die präS1-mRNA-Expression. Dagegen war bei der Mehrheit der Varianten von Patient A (A-S15k, A-S18k und A-S24k) eine Reduktion der präS2/S-mRNA auf 40–50% der präS1-mRNA zu beobachten, die folglich zu einem erhöhten Verhältnis von präS1- zu präS2/S-mRNA führte. Dies korrelierte mit dem Auftreten einer G>A Punktmutation bei nt 3084. Bei den beiden Varianten B-S7k und B-S8k des Patienten B mit Cp-Deletion war die Expression der präS1- und präS2/S-mRNA gleichermaßen auf 40–50 % der Wt-Werte reduziert.



**Abbildung 5.6: Analyse der RNA-Transkripte der komplexen Varianten.** Vier Tage nach Transfektion von HuH7-Zellen mit HBV-DNA der Varianten-, Wt-ähnlichen und Wt-Genome wurde die Gesamt-RNA der Zellen präpariert und in Northern Blots und Primer-Extension-Assays analysiert. A: Die exemplarisch dargestellten Northern Blots wurden mit einer HBV-Gesamt-Genom-Sonde und zur Ladekontrolle mit einer β-Aktin-Sonde hybridisiert (siehe auch Abb. 5.1). B: Die quantitative Auswertung der 3,5-kb-Bande von pgRNA und präC-mRNA in Northern Blots erfolgte mit dem TINA-Programm. Gezeigt sind Mittelwerte ± StA relativ zu WtD von 3 unabhängigen Experimenten. C: Primer-Extension-Analysen der 5'-Enden von präC-mRNA und pgRNA wurden zur Differenzierung der beiden RNAs durchgeführt. Links sind Gelbilder repräsentativer Experimente zu sehen. Die Positionen der 2 präC-mRNAs und der pgRNA sind angegeben. Als Marker für die nt-Positionen, und somit der Transkriptionsstarts der RNAs, diente eine Sequenzierreaktion eines HBV-Wt-Genoms (Genotyp A, EMBL-Nr. L13994). Rechts ist die quantitative Auswertung der Signale mit dem TINA-Programm aufgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte ± StA des Verhältnisses von präC-mRNAs zur pgRNA von 4–14 unabhängigen Experimenten. D: Von der quantitativen Auswertung der präS1- und präS2/S-mRNAs in Northern Blots sind Mittelwerte ± StA von 3 unabhängigen Experimenten relativ zu den Werten des WtD gezeigt. NK = Negativkontrolle, Material von nur mit leerem Vektor pZerO transfizierten Zellen.

Alles in Allem waren die komplexen Varianten der Typen, die im Verlauf akkumulierten, durch eine stark veränderte Transkription mit verminderter Expression von präC- und Oberflächen-mRNAs sowie erhöhter Expression von pgRNA gekennzeichnet, wie es sich bereits im Überblick bei der Mehrzahl der komplexen Varianten gezeigt hatte. Dagegen wurden für die beiden Wt-ähnlichen Genome A-S1 und B-S3 unveränderte präC- und Oberflächen-mRNAs und für A-S1 eine leicht erniedrigte pgRNA nachgewiesen. Ebenso hatten die anderen Wt-ähnlichen Genome des Patienten B (B-S1 und B-S2) eine normale Transkription gezeigt (Überblick, Abschnitt 5.1.2).

### 5.2.2 Proteinexpression

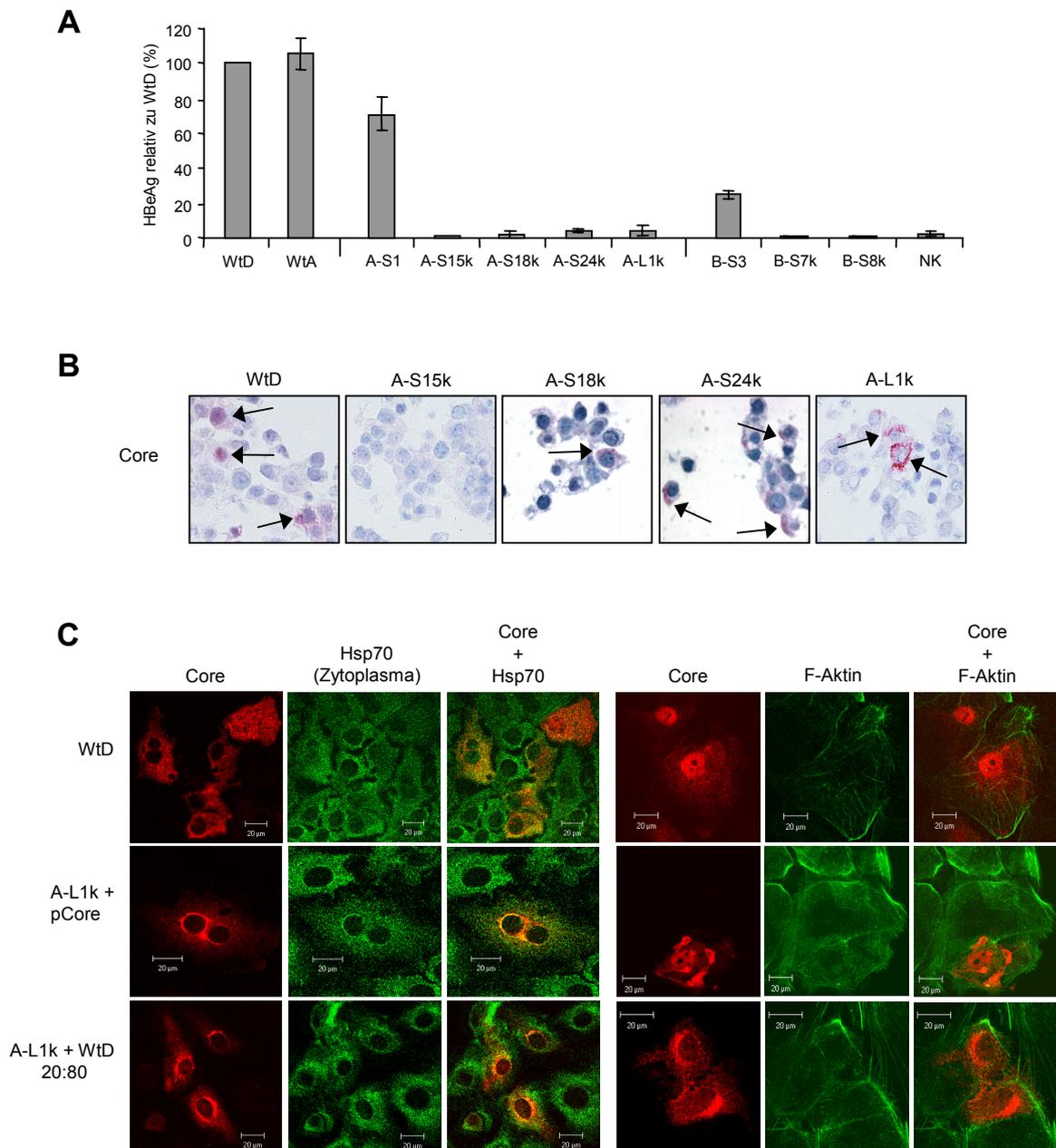
Im nächsten Schritt wurde die Expression viraler Proteine von den teilweise stark veränderten mRNAs im Vergleich zu den Wt-Genomen untersucht. Es erfolgte eine Analyse der intrazellulären Expression der für die Replikation bzw. Morphogenese wichtigen Core- und Oberflächenproteine sowie der sekretierten viralen Proteine HBeAg und HBsAg im Zellkulturüberstand.

#### 5.2.2.1 HBeAg im Zellkulturüberstand

Der Nachweis des nicht-strukturellen HBeAg im Zellkulturüberstand mittels ELISA war für alle 6 komplexen Varianten sowohl mit 30- als auch mit 17-AS-Deletion im HBeAg/HBcAg nahezu negativ (Abb. 5.7A). Dies hatte sich auch im Überblick für alle anderen C-Gendeletionsvarianten gezeigt. Die HBeAg-Werte der Wt-ähnlichen Genome A-S1 und B-S3 ohne C-Gendeletion waren auf ca. 70 bzw. 30 % der beiden Referenz-Wt reduziert. Keines der Genome der beiden Patienten trug Mutationen in der präC-Region, die z. B. als Stoppkodonmutationen häufig für HBeAg-Negativität verantwortlich sind.

#### 5.2.2.2 Core-Proteinexpression

Die intrazelluläre Core-Proteinexpression wurde in Immunfärbungen exemplarisch für den WtD und die komplexen Varianten des Patienten A untersucht. Das um 30 AS deletierte Core-Protein der Varianten A-S18k, A-S24k und A-L1k war in den HuH7-Zellen mittels immunzytochemischer Färbungen mit einem polyklonalen Anti-Core-Antikörper nachweisbar, allerdings nur in sehr geringen Mengen (Abb. 5.7B). Nur für Variante A-S15k wurde kein Core-Protein detektiert, im Einklang mit einer zusätzlichen *frameshift*-Mutation und einem verfrühten Stoppkodon bei AS 62 des Core-Proteins (vgl. Abb. 5.5). Interessanterweise wurde, im Gegensatz zur Lokalisation des WtD-Core-Proteins in



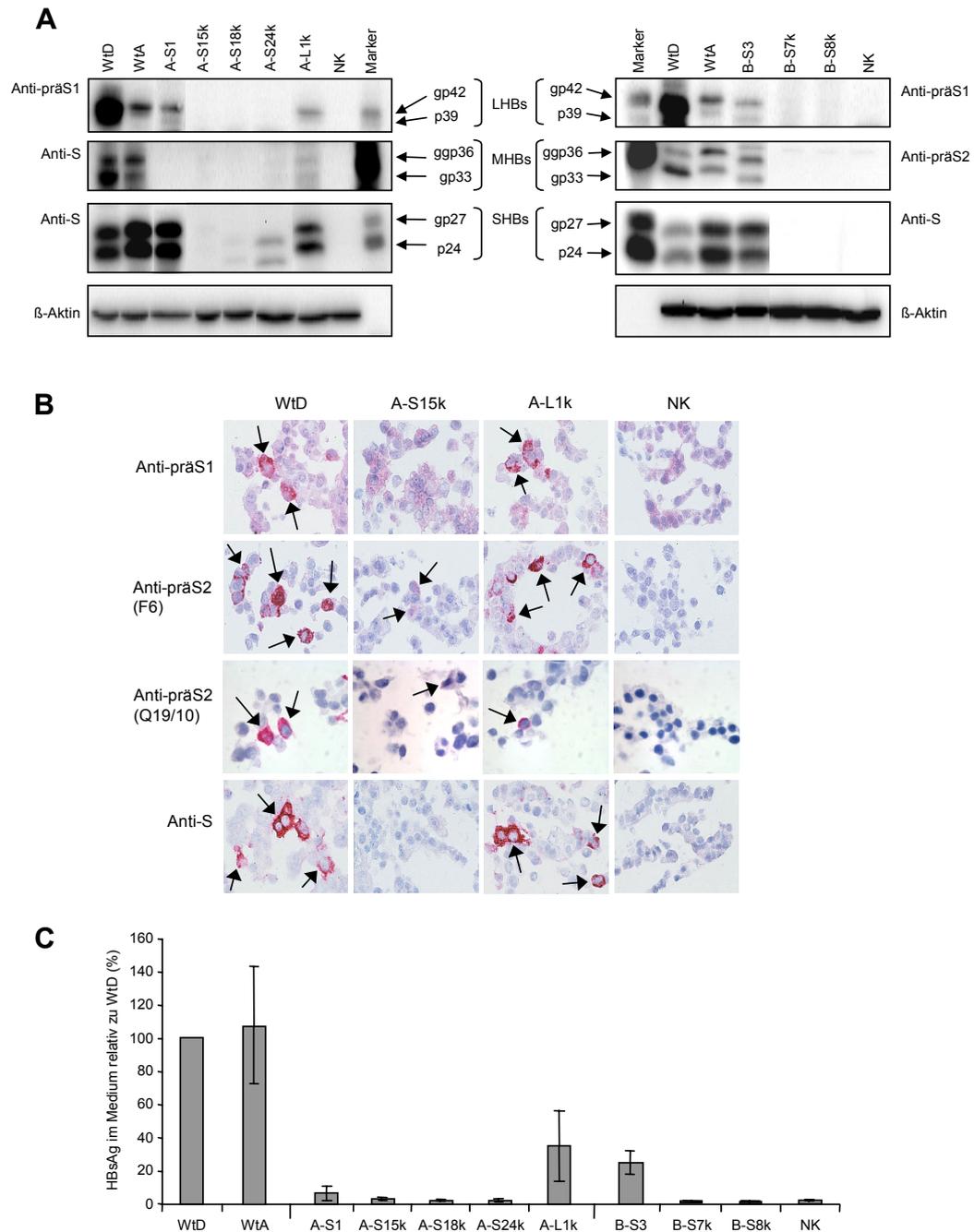
**Abbildung 5.7: Analyse des HBeAg im Zellkulturüberstand (A) und der intrazellulären Core-Proteinexpression (B, C).** Die Analysen wurden mit Huh7-Zellen, 4 Tage nach Transfektion mit HBV-DNA der Varianten- und Wt-Genome, durchgeführt. A: HBeAg im Zellkulturüberstand wurde mittels ELISA untersucht. Die S/C-Ratios der Proben in Verdünnungen von 1:10 (WtA, Patient A) bzw. 1:50 (Patient B) sind als Mittelwerte  $\pm$  SA von 3–5 unabhängigen Experimenten relativ zu WtD dargestellt. NK = Negativkontrolle, nur Plasmid pZErO transfiziert. B: In den dargestellten immunzytochemischen Färbungen wurde das Core-Protein mit dem polyklonalen Antikörper Anti-CoreSN detektiert. Die Zellen wurden mit Hämalaun gegengefärbt. Positive Signale wurden exemplarisch mit einem Pfeil gekennzeichnet. Ein zweites, unabhängiges Experiment bestätigte die Ergebnisse. Vergrößerung: 100 x. C: Doppel-Immunfluoreszenz-Färbungen des Core-Proteins mit Antikörper Anti-CoreSN (rot) und des Zytoplasmas mit Antikörper Anti-Hsp70 (grün) wurden mit einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop visualisiert. Dargestellt sind Färbungen von Zellen, die mit WtD, Variante A-L1k und pCore bzw. A-L1k und WtD im Verhältnis 20:80 transfiziert wurden. Die Färbungen wurden im jeweils rechten Bild überlagert dargestellt, so dass kolokalisierende Proteine eine gelbe Färbung zeigen. Die Ergebnisse wurden in einem weiteren, unabhängigen Experiment bestätigt.

Zytoplasma und Kern, das Core-Protein der Varianten nur im Zytoplasma gefunden (Abb. 5.7B). Zur präziseren, subzellulären Lokalisation des Varianten-Core-Proteins wurden Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen von Core-Protein und zellulären Proteinen durchgeführt. Die Färbungen wurden mit einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop visualisiert. Mit dieser Methode war das Core-Protein der Varianten jedoch nicht nachweisbar, vermutlich aufgrund einer unzureichenden Sensitivität. Das Core-Protein des WtD war meist diffus im Kern oder Zytoplasma der Zellen verteilt und kolokalisierte, wie erwartet, teilweise mit dem Zytoplasma (bzw. dem Zytoplasmaprotein Hsp70, Abb. 5.7C), jedoch nicht mit Markern für das ER-Lumen (Protein-Disulfid-Isomerase [PDI], nicht gezeigt) oder das Golgi-Kompartiment (58K-Protein, nicht gezeigt). Wurde der WtD jedoch mit der Variante A-L1k kotransfiziert (20 % Variante, 80 % WtD) oder A-L1k mit pCore, so zeigte sich überraschenderweise in der Mehrzahl der Zellen eine verstärkte perinukleäre Anordnung des Core-Proteins. Dieses perinukleäre Core-Protein kolokalisierte ebenfalls nur teilweise mit Zytoplasma, aber nicht mit ER, Golgi oder F-Aktin (Abb. 5.7C, ER und Golgi nicht gezeigt). Das F-Aktin ist Teil der Mikrofilamente des Zytoskeletts und spielt möglicherweise eine Rolle im zellulären Transport von Core-Partikeln. Auch nach Kotransfektion von WtD oder pCore mit der Variante A-S15k, die aufgrund der *frameshift*- und Stoppkodonmutationen kein Core-Protein exprimieren kann, trat in verstärktem Maße das perinukleäre Muster des Core-Proteins auf, aber seltener als bei A-L1k (nicht gezeigt).

### 5.2.2.3 Oberflächenproteinexpression

Der Nachweis der intrazellulär vorliegenden Oberflächenproteine SHBs, MHBs und LHBs erfolgte durch Western Blots aus Zelllysaten und immunzytochemische Färbungen. Das HBsAg wurde im Zellkulturüberstand mittels ELISA detektiert. In den Western Blots wies WtA im Vergleich zu WtD schwächere LHBs-, vergleichbare MHBs- und etwas stärkere SHBs-Signale auf (Abb. 5.8A). Diese Unterschiede zeigten sich jedoch nicht beim Nachweis von HBsAg im Zellkulturüberstand (Abb. 5.8C). Die immunzytochemischen Färbungen wurden exemplarisch nur mit WtD als Referenzgenom durchgeführt (Abb. 5.8B).

Für die Varianten A-S15k, B-S7k und B-S8k war keines der Oberflächenproteine im Western Blot nachweisbar (Abb. 5.8A). A-S18k und A-S24k zeigten lediglich sehr geringe Mengen von SHBs, das aufgrund der L216 Stoppkodonmutation verkürzt war (Abb. 5.8A). Auch die exemplarischen immunzytochemischen Färbungen von A-S15k-transfizierten Zellen mit spezifischen Antikörpern gegen die 3 Oberflächenproteine (Anti-präS1, 2 verschiedene Anti-präS2, Anti-S) waren negativ, mit Ausnahme eines sehr schwachen Signals für MHBs

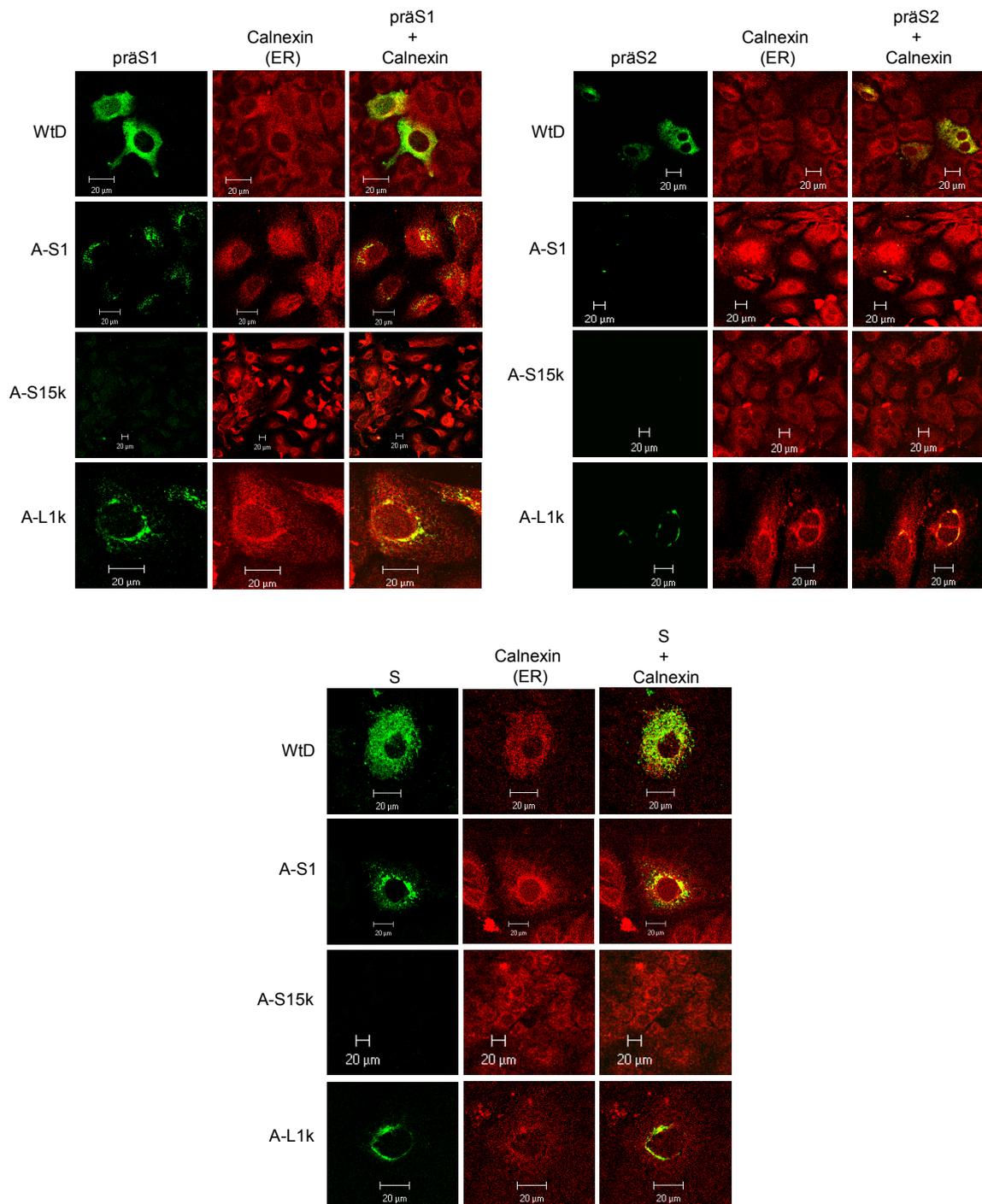


**Abbildung 5.8: Analyse von intrazellulären HBV-Oberflächenproteinen (A, B) und HBsAg im Zellkulturüberstand (C).** Die Analysen wurden mit HuH7-Zellen durchgeführt, 4 Tage nach Transfektion mit HBV-DNA der Varianten-, Wt-ähnlichen und Wt-Genome. NK = Negativkontrolle, nur Plasmid pZerO transfiziert. A: Gezeigt sind die Nachweise der intrazellulären Oberflächenproteine in Western Blots von Zelllysate mit den primären, monoklonalen Antikörpern MA 18/7 (Anti-praS1), F6 (Anti-praS2), polyklonalem Anti-HBs (Anti-S) und einem Anti-β-Aktin-Antikörper zur Ladekontrolle. Als Marker wurden 60 ng aufgereinigtes HBsAg aufgetragen. p24 und p39 sind nicht-glykosilierte Proteine, während die Proteine gp27, gp33 und gp42 einfach und ggp36 zweifach glykosiliert sind. Die Ergebnisse wurden in mindestens einem weiteren, unabhängigen Experiment bestätigt. B: In den dargestellten immunzytochemischen Färbungen wurden die Oberflächenproteine mit den Antikörpern MA 18/7 (Anti-praS1), F6 (Anti-praS2), Q19/10 (Anti-praS2, MHBs-spezifisch) und RF18 (Anti-S) detektiert. Die Zellen wurden mit Hämalaun gegengefärbt. Positive Signale wurden exemplarisch mit einem Pfeil gekennzeichnet. Die Ergebnisse wurden in einem zweiten, unabhängigen Experiment bestätigt. Vergrößerung: 100 x. C: HBsAg im Zellkulturüberstand wurde mittels ELISA untersucht. Die S/C-Ratios der Proben in Verdünnungen von 1:10 (WtA, Patient A) bzw. 1:50 (Patient B) sind als Mittelwerte  $\pm$  SA von 3–5 unabhängigen Experimenten relativ zu WtD dargestellt.

(Abb. 5.8B). Im Einklang mit den Ergebnissen für die intrazellulären Oberflächenproteine wurden für diese 5 Varianten auch kein oder nur sehr geringe Mengen an HBsAg (A-S15k, 2 % von WtD) im Zellkulturüberstand detektiert (Abb. 5.8C).

Im Vergleich zum alleinigen HBsAg-Nachweis im Überblick (Abschnitt 5.1.3) ließ die zusätzliche Analyse der intrazellulären Proteine detailliertere Aussagen über den Grund der defekten Oberflächenproteinexpression zu. Die fehlende intrazelluläre LHBs-Synthese der 5 Varianten korrelierte mit der niedrigen Expression der präS1-mRNA bei A-S18k, B-S7k und B-S8k sowie der Stoppkodonmutation W77\* im präS1 von A-S15k, A-S18k und A-S24k. Auch die fehlende bzw. sehr schwache intrazelluläre MHBs- und SHBs-Expression lässt sich durch die stark reduzierte präS2/S-mRNA all dieser Varianten erklären. Bei den Varianten des Patienten B sorgte zusätzlich die Stoppkodonmutation W74\* in der S-Region intrazellulär für die komplette Abwesenheit aller 3 Oberflächenproteine. Dagegen machte das Beispiel der Varianten A-S18k und A-S24k deutlich, dass bei Vorliegen der Stoppkodonmutation L216\* im S-Bereich eine Expression der verkürzten Form des SHBs möglich war (aufgrund der reduzierten mRNA bei A-S18k und A-S24k nur schwach), eine Sekretion des HBsAg aber ausblieb.

Im Gegensatz zu den meisten komplexen Varianten zeigten die beiden Wt-ähnlichen Genome A-S1 und B-S3 dem WtA entsprechende Level der Oberflächenproteine im Western Blot (Abb. 5.8A). Nur die MHBs-Expression von A-S1 fehlte aufgrund der präS2-Startkodonmutation (vgl. Abb. 5.5). Trotz der beträchtlichen intrazellulären Expression an Oberflächenproteinen, wiesen jedoch sowohl A-S1 als auch B-S3 im Vergleich zu den Wt-Genomen deutlich reduzierte Mengen an HBsAg im Zellkulturüberstand auf (Abb. 5.8C). Auch für die komplexe Variante A-L1k wurde intrazellulär eine sehr deutliche, nur leicht abgeschwächte Expression der 3 Oberflächenproteine in Western Blots und immunzytochemischen Färbungen sichtbar (Abb. 5.8A und B). Selbst das 2-AS-deletierte MHBs von A-L1k wurde immunzytochemisch mit dem Anti-präS2-Antikörper F6 und in sehr geringen Mengen im Western Blot mit einem polyklonalen Anti-HBs-Antikörper nachgewiesen. Dass es sich auch in den immunzytochemischen Färbungen um das MHBs und nicht um Reaktionen des Anti-präS2-Antikörpers mit der präS2-Region des LHBs handelte, wurde durch die intensive Färbung einer ähnlichen Anzahl von Zellen mit dem monoklonalen Anti-präS2-Antikörper Q19/10 bestätigt, der spezifisch das N-glykosylierte MHBs bindet (Abb. 5.8B). Das sezernierte HBsAg der Variante A-L1k war mit ca. 30 % der Wt-Werte stärker reduziert, als es aufgrund der intrazellulären Expression zu erwarten war (Abb. 5.8C).



**Abbildung 5.9: Doppel-Immunfluoreszenzfärbungen von HBV-Oberflächenproteinen und dem Endoplasmatischen Retikulum.** Die Doppel-Immunfluoreszenz-Färbungen der Oberflächenproteine (grün) mit den Antikörpern MA 18/7 (Anti-präS1), F6 (Anti-präS2) und RF18 (Anti-S) und des Endoplasmatischen Retikulums (ER, rot) mit Antikörper Anti-Calnexin wurden mit einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop visualisiert. Dargestellt sind repräsentative Färbungen von Zellen, die mit WtD, A-S1, A-S15k oder A-L1k transfiziert wurden. Die Färbungen wurden im jeweils rechten Bild überlagert dargestellt, so dass kolokalisierende Proteine eine gelbe Färbung zeigen. Die Ergebnisse wurden in einem weiteren, unabhängigen Experiment bestätigt.

Um herauszufinden, ob die Diskrepanz zwischen intra- und extrazellulären Oberflächenproteinmengen bei den Wt-ähnlichen Genomen und A-L1k auf eine veränderte

Lokalisation und mögliche Retention der Proteine in der Zelle zurückzuführen ist, wurden Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen mit zellulären Proteinen des ER, des Intermediären Kompartiments und des Golgi-Kompartiments durchgeführt. Eine intrazelluläre Retention der HBV-Oberflächenproteine kann eine zytotoxische Wirkung zur Folge haben [213,214]. Exemplarisch wurden A-S1, A-S15k und A-L1k im Vergleich zu WtD untersucht. WtD zeigte eine diffuse Verteilung der 3 Oberflächenproteine im gesamten Zytoplasma, deren Färbung, wie erwartet, teilweise mit der des ER-Membran-Proteins Calnexin überlappte (Abb. 5.9). Dagegen waren die Oberflächenproteine von A-L1k sowie LHBs und SHBs von A-S1 in der perinukleären Region konzentriert und kolokalisierten mit dem ER. Diese abweichende Verteilung deutet auf eine Retention und/oder Akkumulation der Oberflächenproteine im perinukleären ER hin. Von A-S15k wurden, wie erwartet, keine Oberflächenproteine nachgewiesen.

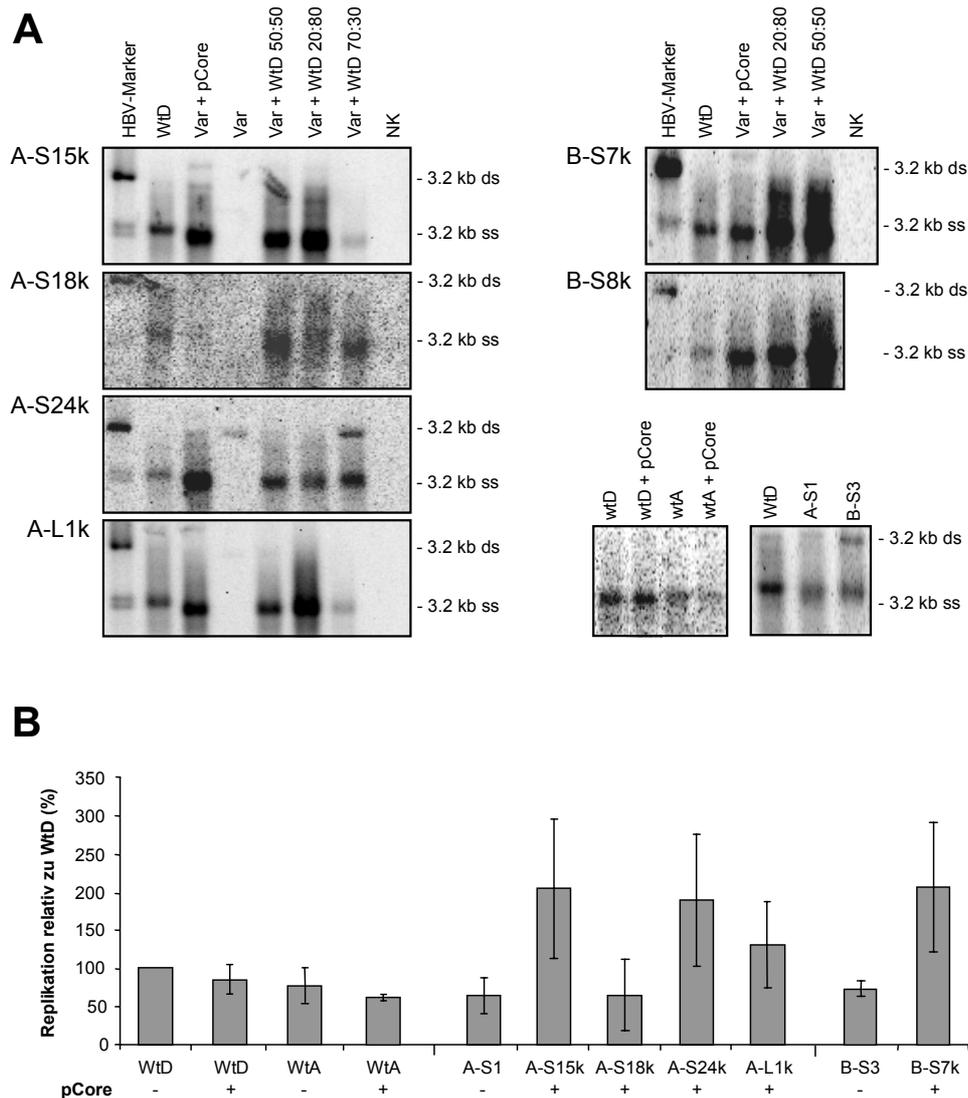
Insgesamt zeigten die komplexen Varianten also einen partiellen oder vollständigen Defekt in der Oberflächenproteinexpression und -sekretion. Wie im Überblick dargestellt, trat die fehlende HBsAg-Sekretion bei den meisten Genomen der beiden Patienten, inklusive der Wt-ähnlichen Genome, auf (Abschnitt 5.1.3). Bei den Wt-ähnlichen Genomen (zumindest bei A-S1), die zu einem sehr frühen Zeitpunkt des Beobachtungszeitraums im Stadium der milden chronischen Hepatitis isoliert wurden, erfolgte eine Retention der größtenteils normal exprimierten Oberflächenproteine im ER. Die komplexe Variante A-L1k – eine der wenigen, die überhaupt deutlich Oberflächenproteine produzierte – zeigte ebenfalls eine veränderte Lokalisation und eine leicht gehemmte Sekretion der Oberflächenproteine.

### *5.2.3 Replikation der komplexen Varianten*

#### **5.2.3.1 Replikative Intermediate in HuH7-Zellen**

Zur Analyse der Replikation wurde, wie im Screening und Überblick, der Level der replikativen DNA-Intermediate aus zytoplasmatischen Core-Partikeln mithilfe von Southern Blots und Auswertung der Bandenintensitäten bestimmt (Abb. 5.10A und B). Aufgrund der C-Gendelektion waren die komplexen Varianten allein replikationsinkompetent (Abb. 5.10A, Bahn „Var“). Durch Komplementation mit Wt-Core-Protein (Genotyp D), exprimiert vom kotransfizierten Plasmid pCore, konnte die Replikation wieder hergestellt werden (Abb. 5.10A, Bahn „Var + pCore“). Nach Kotransfektion mit pCore zeigten 5 der 6 komplexen Varianten eine erhöhte Replikation im Vergleich zu beiden Wt-Genomen und A-S1 bzw. B-S3 (Abb. 5.10B). Nur Variante A-S18k replizierte schwächer als WtD (ca. 65 %) und WtA (ca. 86 %), aber auf etwa gleichem Niveau wie das Wt-ähnliche Genom A-S1. Um einen

Einfluss von pCore auf die verstärkte Replikation auszuschließen, wurden zur Kontrolle auch die Wt-Genome WtD und WtA mit pCore kotransfiziert. Hier zeigte sich keine erhöhte, sondern eine jeweils leicht abgeschwächte Replikation (Abb. 5.10A, rechts unten, und B). Während im Überblick über alle Genome der Patienten die Replikationshöhe noch stark variiert hatte (Abschnitt 5.1.1), waren die Varianten, die akkumulierten, überwiegend durch verstärkte Replikation charakterisiert (131–208 % von WtD bzw. 172–274 % von WtA).



**Abbildung 5.10: Analyse der replikativen Intermediate im Southern Blot.** Die replikativen Intermediate aus zytoplasmatischen Core-Partikeln wurden 4 Tage nach Transfektion von HuH7-Zellen mit 2 µg Gesamtgenom-HBV-DNA im Southern Blot analysiert. A: Gezeigt sind repräsentative Southern Blots für Transfektionen mit den Wt-, Wt-ähnlichen- und Varianten (Var)-Genomen. Varianten wurden alleine, mit 1,6 µg pCore oder mit WtD in verschiedenen Verhältnissen (Variante zu WtD: 50:50, 20:80 oder 70:30, Gesamtmenge der transfizierten Gesamtgenom-HBV-DNA immer 2 µg) transfiziert. Transfektionen von 2 µg WtD bzw. WtA mit pCore dienten als Kontrolle der Auswirkungen des Core-Expressionsplasmids pCore. NK = Negativkontrolle, Material aus nur mit Plasmid pZerO transfizierten Zellen. B: Im Diagramm ist die quantitative Auswertung der Einzelstrang-Bande der replikativen Intermediate im Southern Blot von Transfektionen der Wt-ähnlichen und Wt-Genome (mit und ohne pCore) sowie der komplexen Varianten + pCore relativ zu WtD allein dargestellt. In die Mittelwerte ± StA gingen Ergebnisse von 4–13 unabhängigen Experimenten ein.

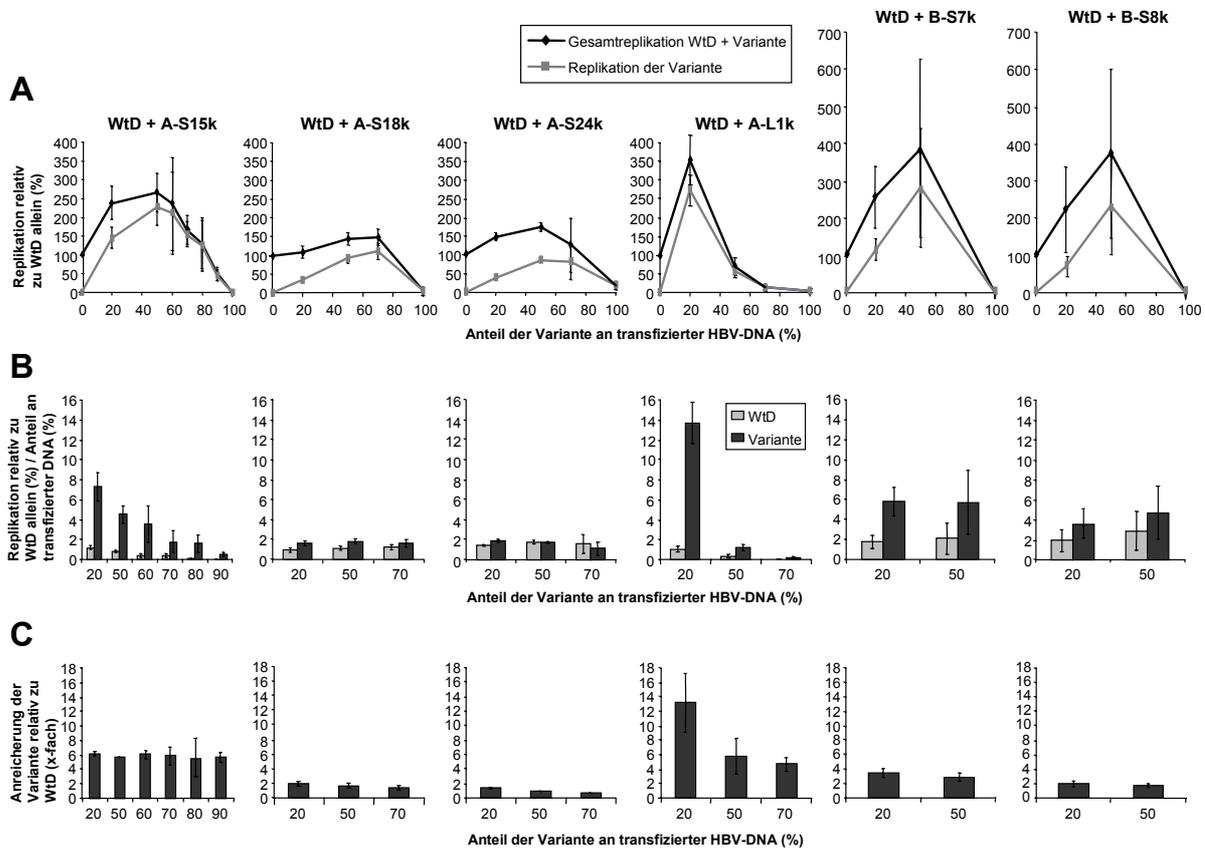
*In vivo* sind die Varianten durch die Notwendigkeit der Komplementation zur gemeinsamen Replikation mit dem Wt innerhalb einer Zelle gezwungen. Um diese kompetitiven Bedingungen zu simulieren und ihre Auswirkungen auf Wt- und Variantenreplikation zu untersuchen, wurden die Varianten mit dem WtD Referenz-Genom kotransfiziert. Der WtD wurde für die Kotransfektionen gewählt, um Vergleichbarkeit der Experimente mit den Vorarbeiten zu gewährleisten, in denen das WtD-Genom bereits erfolgreich zur Komplementation von deletiertem Core-Protein des Genotyps A eingesetzt wurde [188]. Darüber hinaus ermöglichte die Kotransfektion der Varianten-Genome des Genotyps A mit WtD die problemlose Differenzierung der Wt- und Varianten-DNA im Gemisch der replikativen Intermediate durch Pyrosequenzierung (s. u.). Die Kotransfektionen erfolgten in verschiedenen Verhältnissen mit 20, 50 und 70 % Varianten-DNA im Transfektionsgemisch, da auch in den Patienten der Anteil des Wt mit fortschreitender Krankheit immer weiter abnahm und der Anteil der Varianten zunahm (Abschnitt 3, Abb. 3.1C und 3.2C). Die insgesamt transfizierte DNA-Menge blieb dabei immer konstant. Zur Auswertung diente die Replikation des in gleicher Menge allein transfizierten WtD stets als Referenz (= 100 %).

Die Gesamtreplikation der unterschiedlichen Mischungen von Varianten und WtD im Vergleich zum allein transfizierten WtD wurde durch die Southern Blots von replikativen Intermediaten (Abb. 5.10A) und die densitometrische Auswertung der Banden ermittelt (Bsp. Abb. 5.11A, obere Linie).

Um den Beitrag von WtD und Variante zur Gesamtreplikation aufzuklären, wurde der Anteil von WtD- und Varianten-DNA in den replikativen Intermediaten durch quantitative *single nucleotide polymorphism* (SNP)-Analyse mittels Pyrosequenzierung gemessen. Hierfür wurde ein Assay entwickelt, das auf einem SNP bei nt 1850 (Genotyp A, Varianten = A; Genotyp D, WtD = T) basiert und dessen Ergebnisse nicht durch die ungewollte Analyse der transfizierten, linearen *Input*-DNA verfälscht werden. Durch Kombination der Ergebnisse aus Pyrosequenzierung zum Prozentsatz der Varianten-Intermediate und aus Southern Blot zur Gesamtreplikation konnte die Variantenreplikation in den verschiedenen transfizierten Mischungen relativ zum allein transfizierten WtD ermittelt werden (Bsp. Abb. 5.11A, untere Linie).

Außerdem wurde der Level der replikativen Intermediate der Variante im Verhältnis zur ursprünglich transfizierten Varianten-DNA-Menge bestimmt (Variantenreplikation relativ zu WtD allein [%] / Variantenanteil an transfizierter DNA [%]; Bsp. Abb. 5.11B, dunkle Balken), um zu erfahren, ob die Variante nach Kotransfektion mit dem WtD stärker repliziert als erwartet, oder nicht. Eine dem transfizierten Anteil entsprechende Replikation hat danach

den Wert 1. Gleichermaßen wurde die Replikation des WtD in Relation zur transfizierten WtD-DNA-Menge ermittelt, um eine mögliche Unterdrückung der Wt-Replikation durch die Variante nachweisen zu können (Bsp. Abb. 5.11B, helle Balken). Diese war in früheren Studien für reine C-Gendeletionsvarianten gezeigt worden [188,189].



**Abbildung 5.11: Analyse der Replikation in HuH7-Zellen nach Kotransfektion der komplexen Varianten mit WtD.** Die replikativen Intermediate aus zytoplasmatischen Core-Partikeln wurden 4 Tage nach Kotransfektion der 6 komplexen Varianten mit WtD in verschiedenen Verhältnissen (20, 50 und 70 % Varianten-DNA im Gemisch) untersucht. A: Die Gesamtreplikation von Variante und WtD wurde im Southern Blot ermittelt. In den gezeigten Diagrammen wurden die relativen Bandenintensitäten im Vergleich zur Replikation des allein transfizierten WtD (= 100 %) gegen den Anteil der Variante an der transfizierten DNA aufgetragen (obere, schwarze Linie mit Karo). Der prozentuale Anteil der Variante an den gesamten replikativen Intermediaten wurde mittels Pyrosequenzierung bestimmt. Dadurch ließ sich die Replikation der Variante im Gemisch relativ zum allein transfizierten WtD ermitteln (untere, graue Linie mit Quadrat). B: Die dargestellte Replikation von WtD (hellgrau) und Variante (dunkelgrau) im Verhältnis zur jeweils transfizierten DNA-Menge wurde durch folgende Gleichung errechnet: Replikation von Variante bzw. WtD relativ zum WtD allein (vgl. A) / jeweiligen Anteil der Variante bzw. des WtD an der transfizierten DNA. Bei einem Wert von 1 würde die Replikation also in der nach dem transfizierten Anteil erwarteten Höhe erfolgen. C: Die präsentierte Anreicherung der replikativen Intermediate der Variante gegenüber dem WtD wurde folgendermaßen bestimmt: Anreicherung (x-fach) = (% Variante / % WtD) in den replikativen Intermediaten bestimmt durch Pyrosequenzierung / (% Variante / % WtD) in der transfizierten DNA. In allen Diagrammen sind Mittelwerte  $\pm$  StA von mindestens 3 unabhängigen Experimenten gezeigt. Genauere Erklärungen zu den Berechnungen befinden sich im Abschnitt Material und Methoden 4.2.5.8.

Weiterhin wurde mithilfe der Pyrosequenzierungsdaten untersucht, ob die Variante den WtD während der Koreplikation durch ihre Anreicherung überwächst. Zur Bestimmung der

Anreicherung der Variante wurde das Verhältnis von Variante zu WtD in replikativen Intermediaten zum ursprünglich transfizierten Verhältnis in Relation gesetzt (Bsp. Abb. 5.11C). Dabei wurde durch Pyrosequenzierung der nukleären DNA sichergestellt, dass das Verhältnis von Variante und WtD im Zellkern tatsächlich dem transfizierten Verhältnis entspricht. Für genauere Erklärungen zu den Berechnungen siehe Abschnitt Material und Methoden, 4.2.5.8.

Nach Kotransfektion von HuH7-Zellen mit WtD und jeder der 6 komplexen Varianten zeigte sich eine mit dem transfizierten Varianten-WtD-Verhältnis variierende Gesamtreplication (Abb. 5.11A, obere Linien). Dabei führte bei jeder der Varianten mindestens eines der Kotransfektions-Verhältnisse zu einer erhöhten Gesamtreplication relativ zum allein transfizierten WtD. Diese basierte hauptsächlich auf einer erhöhten Variantenreplication (Abb. 5.11A, untere Linien). Außerdem ließ sich für alle Varianten eine Anreicherung der replikativen Intermediate gegenüber dem WtD nachweisen, die allerdings für Variante A-S24k mit höchstens 1,3fach nur sehr schwach war (Abb. 5.11C). Abgesehen von diesen Gemeinsamkeiten zeigten sich jedoch deutliche Unterschiede in den detaillierten Replikationsmustern der komplexen Varianten. Lediglich die der beiden Varianten des Patienten B wiesen große Ähnlichkeiten auf. Die maximale Replikation der einzelnen Varianten reichte von 2fach (A-S18k, A-S24k) bis zu über 13fach (A-L1k) höheren Werten als von der transfizierten Varianten-DNA-Menge erwartet (Abb. 5.11B). In gleichem Maße variierten auch maximale Gesamtreplication und Anreicherung zwischen den Varianten. Weiterhin fanden maximale Gesamt- und Variantenreplication je nach Variante bei unterschiedlichen Kotransfektions-Verhältnissen von Variante und WtD statt (Abb. 5.11A).

Bei 4 der 6 Varianten, die entweder eine schwach (ca. 2fach: A-S18k, A-S24k) oder mittelmäßig (ca. 4–6fach: B-S7k, B-S8k) erhöhte Replikation präsentierten, führte die Koreplikation auch bei hohem transfizierten Variantenanteil nicht zur gleichzeitigen Unterdrückung der WtD-Replikation (Abb. 5.11B). Dies zeigte sich unabhängig von der Art der Cp-Mutation und der Länge der C-Gendeletion bei Varianten beider Patienten. Die WtD-Replikation blieb relativ zur transfizierten WtD-DNA-Menge durch die Varianten unverändert (also bei einem Wert von ca. 1) oder war im Fall der Varianten A-S24k, B-S7k und B-S8k sogar 1,4- bis fast 3fach erhöht (Abb. 5.11B). Die Höhe der Replikation dieser 4 Varianten war nahezu unabhängig vom kotransfizierten Variante-zu-WtD-Verhältnis (Abb. 5.11B).

Im Gegensatz dazu war bei den Varianten A-S15k und A-L1k, die bei einem transfizierten Variantenanteil von 20 % eine extrem verstärkte Replikation zeigten, eine Unterdrückung der WtD-Replikation zu beobachten, wenn der transfizierte Variantenanteil mindestens 50 %

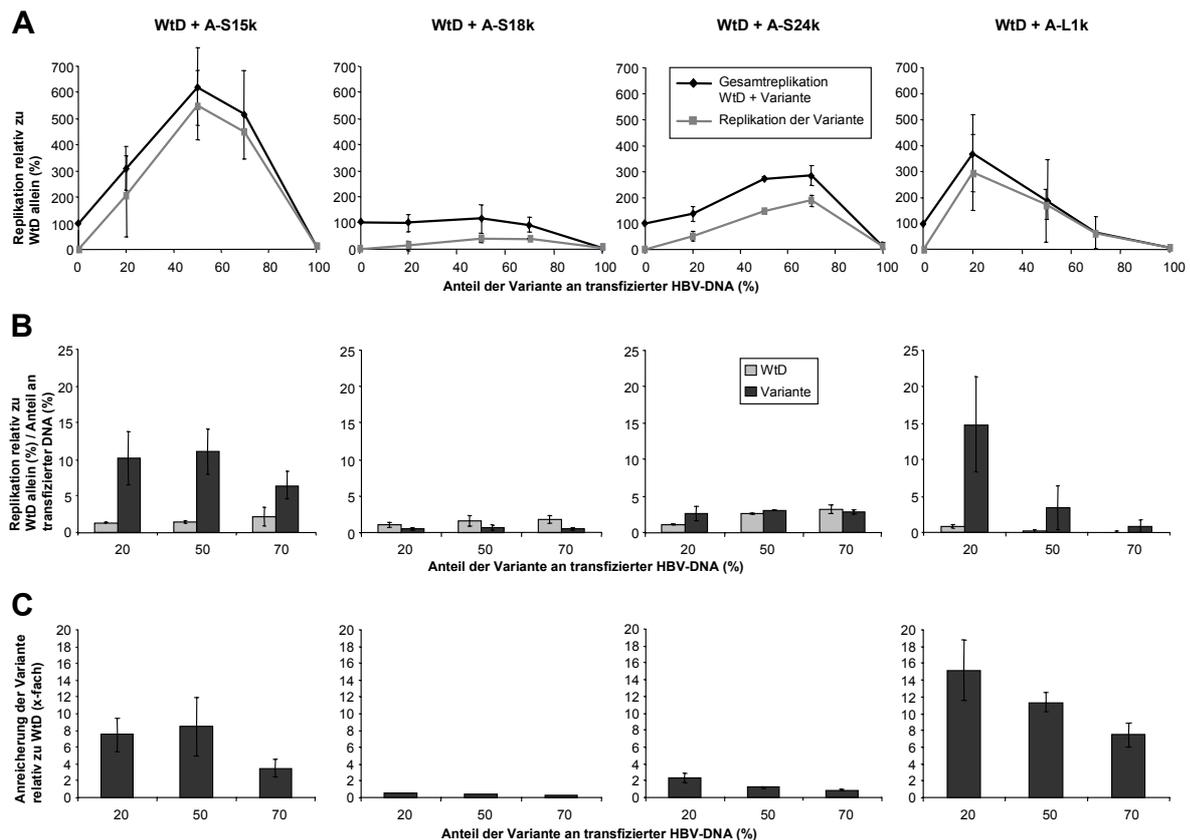
ausmachte (Abb. 5.11B). Gleichzeitig sank die Replikation der Variante, was auch zu einer abnehmenden Gesamtreplikation führte. Dieser Effekt war besonders drastisch für Variante A-L1k. Er deutet darauf hin, dass die übermäßig starke Variantenreplikation bei hohem transfizierten Variantenanteil auf Kosten des WtD stattfand und eine negative Rückwirkung auf Varianten- und Gesamtreplikation zur Folge hatte. Die Anreicherung der Varianten gegenüber dem WtD war meist unabhängig vom Variantenanteil an der transfizierten DNA (Abb. 5.11C). Sie resultierte aus der erhöhten Variantenreplikation, und nur im Falle von A-S15k und A-L1k trug die Unterdrückung der WtD-Replikation bei hohem transfizierten Variantenanteil zur Anreicherung der Varianten bei. Bei Variante A-L1k führte die überaus starke Replikation und WtD-Hemmung mit extrem reduzierter Gesamtreplikation jedoch mit steigendem transfizierten Variantenanteil auch zu einer verminderten Anreicherung der Variante.

Zusammengefasst zeigten die komplexen Varianten beider Patienten nach Kotransfektion mit dem WtD-Genom eine klar erhöhte Replikation, die zu erhöhter Gesamtreplikation und zur Anreicherung der Varianten führte. Die detaillierten Replikationseigenschaften variierten sowohl zwischen den Varianten der beiden Patienten als auch zwischen Varianten des gleichen Patienten (A). Je nach Variante wurde während der Koreplikation die WtD-Replikation nicht beeinflusst, gehemmt oder sogar gefördert.

### 5.2.3.2 Replikative Intermediate in HepG2-Zellen

Um den Einfluss der Wirtszelle auf den Replikationsvorteil der Varianten zu untersuchen, wurden Kotransfektionen von WtD und Varianten des Patienten A in verschiedenen Verhältnissen auch in einer weiteren Hepatomazelllinie, HepG2, durchgeführt. Bei der Mehrzahl der Varianten konnten in den HepG2-Zellen, wie schon in den HuH7-Zellen, eine erhöhte Gesamtreplikation im Vergleich zu WtD allein (Abb. 5.12A), eine erhöhte Variantenreplikation (Abb. 5.12A und B) und eine Anreicherung der Varianten (Abb. 5.12C) nachgewiesen werden. Das Replikationsmuster der Varianten entsprach generell dem in HuH7 beobachteten, jedoch war in HepG2-Zellen die Replikation relativ zu WtD allein meist stärker. Nur die Replikation der Variante A-S18k war in HepG2 niedrig und sogar schwächer als die des WtD, so dass die Variante vom WtD überwachsen wurde (0,5fache Anreicherung, Abb. 5.12B und C). In den Kotransfektionen aller Varianten außer A-L1k wurde die Replikation des WtD nicht gehemmt. Sie war bei 20 % Variantenanteil an der transfizierten DNA weitgehend unbeeinflusst und stieg bei höheren Variantenanteilen auf das bis zu 3fache der erwarteten Replikation an (Abb. 5.12B). Dieser Anstieg war ausgeprägter als in den

HuH7-Zellen und führte zu einer abgeschwächten Anreicherung der Varianten bei hohen transfizierten Variantenanteilen (Abb. 5.12C). Bei Variante A-S15k stand dies im Gegensatz zur Replikation in HuH7, wo sie den WtD in der Koreplikation hemmte und unabhängig vom transfizierten Verhältnis anreicherte. Nur Variante A-L1k verursachte in HepG2- wie auch in den HuH7-Zellen eine Unterdrückung der WtD-Replikation bei 50 % oder mehr Variante in der transfizierten DNA (Abb. 5.12B).



**Abbildung 5.12: Analyse der Replikation in HepG2-Zellen nach Kotransfektion der komplexen Varianten des Patienten A mit WtD.** Die replikativen Intermediate aus zytoplasmatischen Core-Partikeln wurden 5 Tage nach Kotransfektion von HepG2-Zellen mit den 4 komplexen Varianten von Patient A und WtD in verschiedenen Verhältnissen untersucht. A: Gesamtreplication und Replikation der Variante relativ zu WtD allein. B: Replikation von Variante und WtD im Verhältnis zur jeweils transfizierten DNA-Menge. C: Anreicherung der Variante gegenüber WtD. Siehe auch Abb. 5.11. Gezeigt sind jeweils Mittelwerte  $\pm$  Minimum/Maximum von 2 unabhängigen Experimenten.

Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass der Replikationsvorteil der Varianten auch in HepG2-Zellen und daher an sich unabhängig von der Wirtszelle vorlag. Die Koreplikation schien generell in HepG2-Zellen im Vergleich zu HuH7-Zellen zu stärkerer Replikation relativ zu WtD allein zu führen, sowohl bei WtD als auch bei den Varianten.

### 5.2.3.3 Anreicherung der verpackten prägenomischen RNA

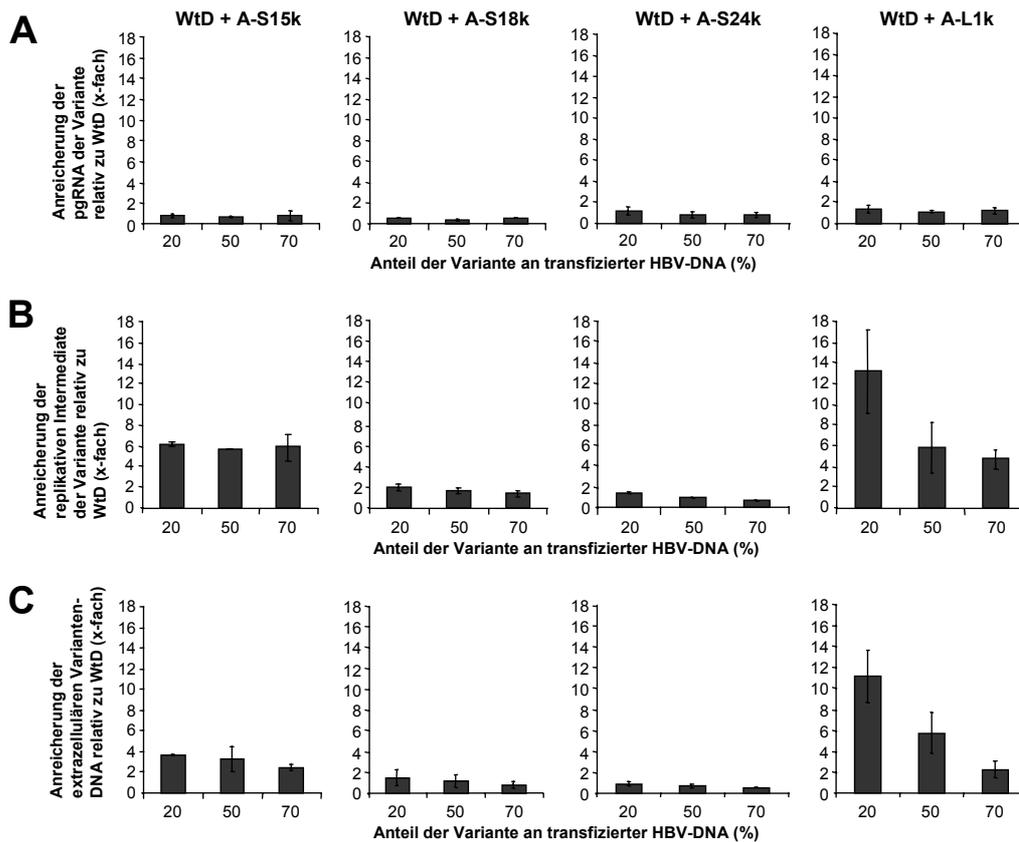
Als Ursache für den Replikationsvorteil der Varianten kommen mehrere Möglichkeiten in Betracht. Schon aufgrund der C-Gendelektion könnte eine schnellere reverse Transkription der in die Core-Partikel verpackten pgRNA zu replikativen DNA-Intermediaten eine Rolle spielen. Daneben könnte auch bereits die pgRNA der Varianten vermehrt im Core-Partikel verpackt vorliegen, worauf die erhöhten pgRNA-Werte der Varianten in der Gesamt-RNA von transfizierten Zellen (vgl. Abschnitt 5.2.1) hinweisen. Zur Klärung dieser Annahme wurde nach Kotransfektion von HuH7-Zellen mit WtD und komplexen Varianten des Patienten A die pgRNA aus intrazellulären Core-Partikeln isoliert, in cDNA umgeschrieben und in die Pyrosequenzierung eingesetzt. Aus dem ermittelten Anteil von WtD und Varianten an der pgRNA konnte analog zu den replikativen Intermediaten die Anreicherung der Variante in der verpackten pgRNA bestimmt werden (Abb. 5.13A).

Trotz der erhöhten gesamtzellulären pgRNA-Level im Vergleich zu WtD, wiesen die Varianten gegenüber WtD keine oder eine nur sehr marginale (A-S24k und A-L1k) Anreicherung der Core-Partikel-assoziierten pgRNA auf. Somit sollten die erhöhte Replikation und Anreicherung der replikativen Intermediate der Varianten (Abb. 5.11 und 5.13B) aus einem Vorteil der Varianten während der reversen Transkription resultieren. Vermehrt verpackte pgRNA der Varianten scheint keine entscheidende Rolle zu spielen.

### 5.2.3.4 Anreicherung der Varianten in extrazellulären Partikeln

Auch aus extrazellulären viralen Partikeln im Zellkulturüberstand isolierte DNA wurde pyrosequenziert und zur Bestimmung der Anreicherung der Varianten verwendet. Es zeigte sich bei 3 der 4 Varianten eine Anreicherung gegenüber WtD (Abb. 5.13C), die im Vergleich zur Anreicherung der intrazellulären replikativen Intermediate (Abb. 5.13B) leicht reduziert war. Bei Variante A-S15k betrug sie etwa die Hälfte, bei A-S18k und A-L1k meist über 80 % der intrazellulären Anreicherung. Lediglich bei Variante A-S24k, deren replikative Intermediate nur eine schwache Anreicherung zeigten, wurde keine Anreicherung im Zellkulturüberstand nachgewiesen. In der Mehrzahl der Varianten verließ jedoch nach Kotransfektion mit dem WtD ein erhöhter Anteil der Varianten die Zelle, was mit ihrer beobachteten Akkumulation *in vivo* übereinstimmt.

Neben der Pyrosequenzierung wurden auch diverse andere Methoden angewandt, um das ausgeschleuste Virus im Zellkulturüberstand nach Transfektion des WtD und/oder der Varianten zu quantifizieren und zu charakterisieren. Leider gelang es jedoch mit keinem der Ansätze, zuverlässige Ergebnisse zu erzielen. Southern Blots der aus extrazellulären viralen



**Abbildung 5.13: Anreicherung der Varianten des Patienten A gegenüber WtD in verpackter pgRNA (A), replikativen Intermediaten (B) und extrazellulären viralen Partikeln (C).** Die 4 komplexen Varianten von Patient A wurden mit WtD in verschiedenen Verhältnissen (20, 50 und 70 % Varianten-DNA im Gemisch) in HuH7-Zellen kotransfiziert. Die Anreicherung der Varianten gegenüber WtD wurde in während verschiedener Stadien des Replikationszyklus vorliegenden Nukleinsäure-Spezies bestimmt. Sie wurde folgendermaßen berechnet (vgl. auch Abb. 5.11):  $\text{Anreicherung (x-fach)} = (\% \text{ Variante} / \% \text{ WtD})$  in den verschiedenen partikelassoziierten Nukleinsäure-Spezies bestimmt durch Pyrosequenzierung /  $(\% \text{ Variante} / \% \text{ WtD})$  in der transfizierten DNA. A: Die pgRNA wurde 5 Tage nach Transfektion aus zytoplasmatischen Core-Partikeln isoliert, in cDNA umgeschrieben und pyrosequenziert. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  StA der Anreicherung der Variante in der pgRNA von mindestens 2 unabhängigen Experimenten. B: Die dargestellte Anreicherung der replikativen Intermediate der Varianten entspricht der Abb. 5.11C. C: 4 Tage nach Transfektion wurden Viruspartikel aus dem Zellkulturüberstand pelletiert, die DNA daraus isoliert und pyrosequenziert. Zur Anreicherung der Variante gegenüber WtD in der extrazellulären HBV-DNA sind Mittelwerte  $\pm$  StA von mindestens 2 unabhängigen Experimenten dargestellt.

Partikeln isolierten HBV-DNA scheiterten vermutlich an der geringen Menge der nachzuweisenden Moleküle. Es wurden verschiedene Methoden zur Aufreinigung des Virus aus dem Zellkulturüberstand getestet und optimiert (Ultrazentrifugation, PEG-Fällung, Immunpräzipitation und Kombinationen dieser Methoden), und zur Erhöhung der Virusmenge wurden die Überstände vieler Transfektionsansätze gepoolt. Dennoch waren die Ergebnisse im Southern Blot, insbesondere in der Quantifizierung, nicht reproduzierbar. Gleiches galt, wenn aus dem Medium aufgereinigte virale Partikel direkt in einer nativen Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und auf verschiedene Membranen (Nylon, Nitrocellulose, PVDF) geblottet wurden. Durch Detektion mit verschiedenen Antikörpern

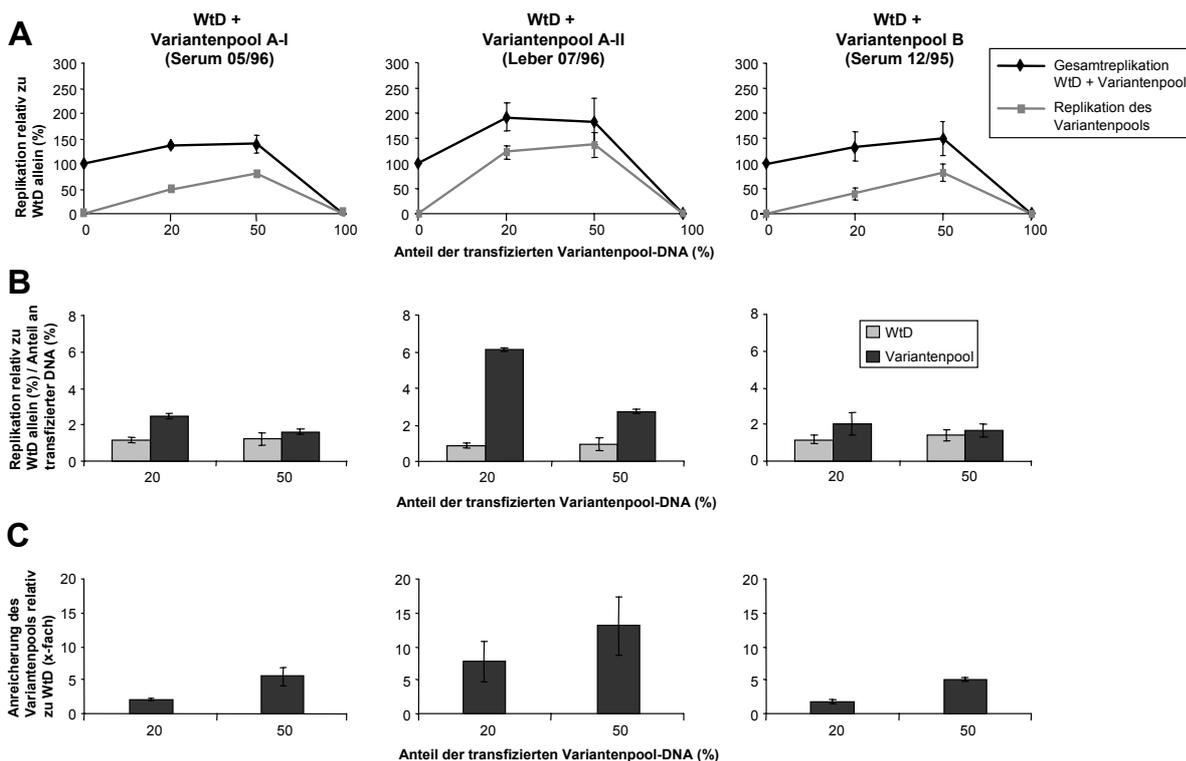
gegen HBV-Core und -Oberflächenproteine konnten zwar nach Transfektion von WtD- oder WtA-DNA umhüllte Partikel und in geringerem Maße nackte Core-Partikel nachgewiesen werden, eine reproduzierbare Quantifizierung und der wiederholte Nachweis der HBV-DNA in den auf der Membran aufgebrochenen Partikeln gelang jedoch nicht. Auch die versuchten Nachweise der extrazellulären Partikel im Elektronenmikroskop und durch quantitative PCR im LightCycler führten zu keinem reproduzierbaren Ergebnis.

Eine das C-Gen umfassende PCR von DNA aus ultrazentrifugierten oder immunpräzipitierten viralen Partikeln lieferte dann ergänzend zur Pyrosequenzierung den qualitativen Beweis dafür, dass nach Kotransfektion von WtD und Varianten des Patienten A in allen getesteten Verhältnissen sowohl Partikel mit viraler DNA der Varianten als auch des WtD die Zellen verließen. Im Agarosegel war neben der Wt-Bande auch immer die kleinere Bande des verkürzten C-Gens der Varianten zu sehen (Ergebnisse nicht gezeigt). Auch nach Transfektion der Varianten mit pCore, jedoch nicht nach deren alleiniger Transfektion, war das C-Gen der Varianten auf diese Weise nachweisbar. Dies deutet, zumindest im Fall der Varianten A-S18k und A-S24k ohne HBsAg-Expression im Medium, auf die Ausschleusung nackter Core-Partikel aus den transfizierten HuH7-Zellen hin.

### 5.3 Replikation von Variantenpools

Unklar war, ob der Replikationsvorteil der Varianten auch bei Einsatz der gesamten zu einem Zeitpunkt vorliegenden Viruspopulation bestehen würde. Um die Viruspopulationen der Patienten im späten Stadium während der LZ nachzustellen und deren Replikation zu untersuchen, wurden Pools von gleichen Teilen aller replikationskompetenten Klone einer Serum- bzw. Leberprobe zusammen mit dem WtD kotransfiziert. Es kamen Variantenpools von 3 Abnahmen der beiden Patienten zur Anwendung, die in ihrer Zusammensetzung und Häufigkeit der einzelnen Variantentypen die jeweiligen HBV-Populationen repräsentierten. Pool A-I enthielt die 3 komplexen Varianten A-S22k, A-S23k und A-S24k, isoliert aus einer späten Serumabnahme von 05/96 während der LZ des Patienten A (Abb. 5.2). Pool A-II setzte sich aus den 6 Varianten A-L1k, A-L2k, A-L3k, A-L6k, A-L7k und A-L8k aus der zirrhotischen Leber von 07/96 des Patienten A zusammen (Abb. 5.2). Pool B umfasste 4 komplexe Varianten aus der späten Serumabnahme von 12/95 des Patienten B (B-S4k, B-S5k, B-S7k und B-S8k, Abb. 5.4). Die Kotransfektion der Pools mit WtD in HuH7-Zellen erfolgte in den Verhältnissen 20:80 und 50:50. Die Analyse der replikativen Intermediate aus intrazellulären Core-Partikeln mittels Southern Blots und Pyrosequenzierung ergab für alle 3 WtD-Pool-Mischungen eine erhöhte Gesamtreplikation im Vergleich zum WtD allein

(Abb. 5.14A), eine 2–6fach erhöhte Replikation des Variantenpools relativ zur eingesetzten DNA-Menge (Abb. 5.14B) und eine 2–13fache Anreicherung der Variantenpools gegenüber dem WtD (Abb. 5.14C). Selbst Variantenpool A-I, der mit A-S24k eine Variante mit nur sehr schwach verstärkter Replikation enthielt (Abb. 5.11), zeigte einen klaren Replikationsvorteil gegenüber dem WtD. Die Replikation und Anreicherung war am höchsten bei Pool A-II, der sich aus den überwiegend auch einzeln sehr stark replizierenden Varianten der Leber von Patient A (Abb. 5.1A) zusammensetzte.



**Abbildung 5.14: Analyse der Replikation nach Kotransfektion von Variantenpools mit WtD.** HuH7-Zellen wurden mit Variantenpools und WtD in verschiedenen Verhältnissen kotransfiziert (20 oder 50 % Pool im Gemisch). Die Variantenpools bestanden zu gleichen Teilen aus den replikationskompetenten komplexen Varianten des Serums von 05/96 (Pool A-I: A-S22k, -S23k, -S24k) und der Leber 07/96 (Pool A-II: A-L1k, -L2k, -L3k, -L6k, -L7k, -L8k) von Patient A und des Serums von 12/95 (Pool B: B-S4k, -S5k, S7k, -S8k) von Patient B. Sie repräsentierten in ihrer Zusammensetzung die Viruspopulationen der jeweiligen Zeitpunkte nach Diagnose der LZ. A: Gesamtreplikation und Replikation der Variantenpools relativ zum WtD allein. B: Replikation der Variantenpools und des WtD im Verhältnis zur jeweils transfizierten DNA-Menge. C: Anreicherung der Variantenpools gegenüber WtD. Siehe auch Abb. 5.11. Gezeigt sind jeweils Mittelwerte  $\pm$  StA von 3 unabhängigen Experimenten.

Grundsätzlich war die Anreicherung der Variantenpools bei Transfektion von 50 % Variantenpool stärker als bei nur 20 %, im Gegensatz zur Anreicherung der Einzel-Varianten, die entweder gleichbleibend war oder mit höherem Variantenanteil sank (A-L1k, Abb. 5.11C). Der transfizierte WtD- und Variantenpoolanteil von 50 % lag dabei deutlich näher an dem sehr niedrigen Anteil der Genome mit Wt-C-Gen, der in den jeweiligen HBV-

Populationen zum Zeitpunkt der Isolierung der Pool-Varianten vorlag (Pool A-I: 37,5 %, Pool A-II: 8 %, Pool B: 10 %). Keiner der Variantenpools der beiden Patienten replizierte auf Kosten des WtD, dessen Replikation weitgehend den von der transfizierten WtD-DNA-Menge erwarteten Werten entsprach (Abb. 5.14B). Die Hemmung der WtD-Replikation durch einzelne komplexe Varianten, wie z. B. A-L1k (Abb. 5.11B), kam im Kontext der Variantenpools also nicht zum Tragen.

## 5.4 Analyse von Hybridgenomen

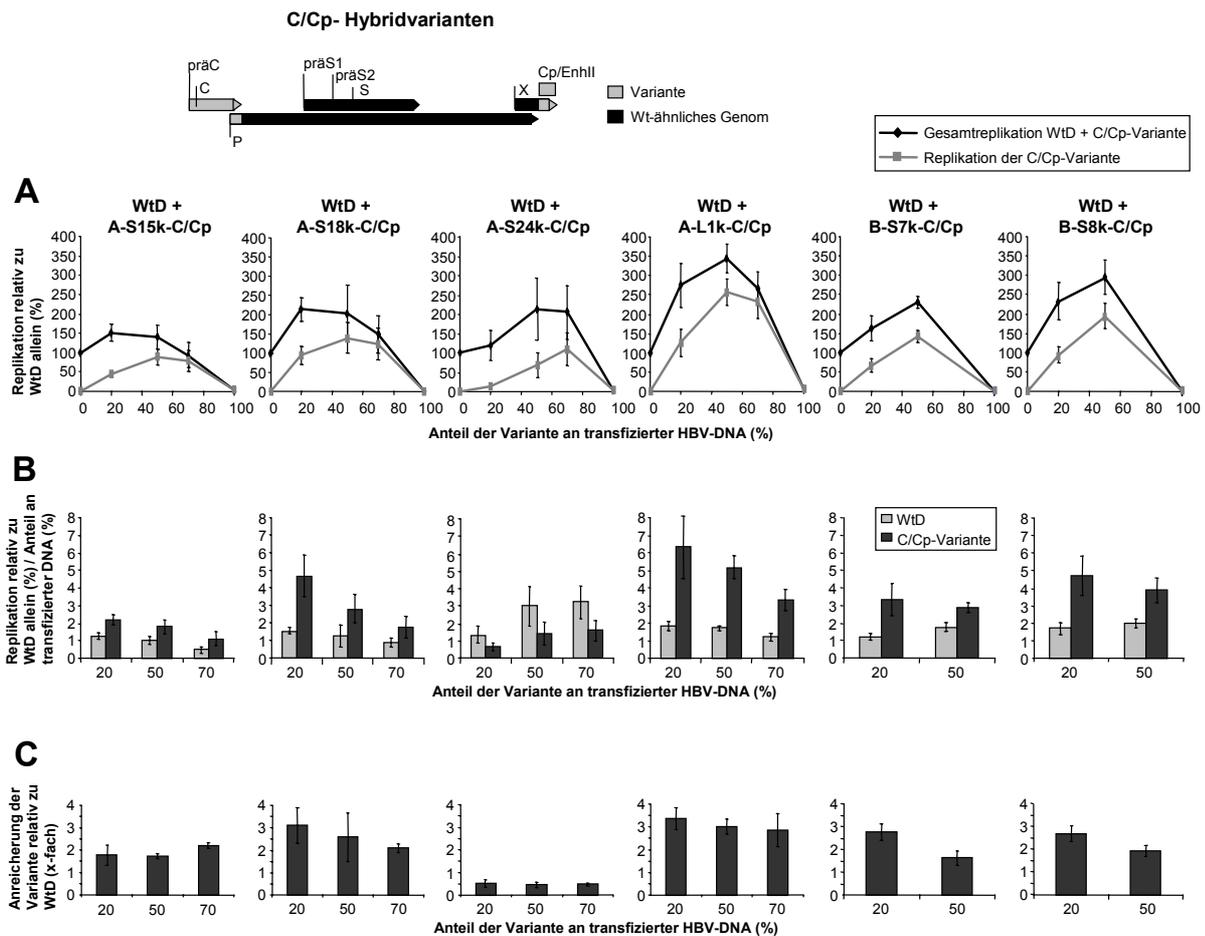
### 5.4.1 Replikation der C/Cp-Hybridvarianten

Es ist bekannt, dass Mutationen im Cp und C-Gen die HBV-Replikation stark beeinflussen können. Verschiedene Studien haben bereits eine verstärkte Replikation für Varianten mit entweder C-Gendeletionen oder Cp-Mutationen nachgewiesen, die denen der komplexen Varianten sehr ähnlich sind. Daher sollte untersucht werden, welche Rolle die Mutationen in Cp und C-Gen in ihrer Kombination für die erhöhte Replikation der komplexen Varianten spielen. Cp und C-Gen der Wt-ähnlichen Klone der Patienten (A-S1 und B-S3) wurden durch die entsprechenden Regionen der komplexen Varianten des gleichen Patienten ersetzt. So entstanden 6 sogenannte C/Cp-Varianten (Schema Abb. 5.15, oben), die analog zu den komplexen Varianten in Kotransfektionen mit dem WtD in verschiedenen Verhältnissen auf ihre Replikation hin untersucht wurden.

Die C/Cp-Varianten zeigten eine erhöhte Replikation und meist auch Anreicherung gegenüber dem WtD (Abb. 5.15A, B und C). Die WtD-Replikation wurde außer bei Variante A-S15k-C/Cp nicht gehemmt, sondern eher leicht gefördert (1,5- bis 3fach, Abb. 5.15B). Sowohl A-S18k-C/Cp und A-L1k-C/Cp als auch B-S7k-C/Cp und B-S8k-C/Cp, die jeweils gleiche Cp-Mutationen (Insertion oder Deletion) und C-Gendeletionen (90 oder 51 nt lang) tragen, wiesen jeweils ein sehr ähnliches Replikationsmuster mit ca. 3facher Anreicherung auf. Bei den ersten beiden sank die WtD-Replikation mit steigendem Variantenanteil in der transfizierten DNA (allerdings nie unter die dem transfizierten WtD-Anteil entsprechenden Werte), während sie bei den letzteren beiden leicht anstieg (Abb. 5.15B). Bei Variante A-L1k-C/Cp waren also nicht die starke Hemmung der WtD-Replikation und die daraus folgende extreme negative Rückkopplung auf Varianten- und Gesamtreplikation der komplexen Variante zu finden.

Die Hybridvarianten A-S15k-C/Cp und A-S24k-C/Cp mit Cp-Punktmutationen (z. B. nt 1762/1764) und der 90-nt-Deletion im C-Gen zeigten im Vergleich zu den 4 anderen

Hybridvarianten eine nur leicht verstärkte Replikation (maximal 2,2- und 1,6fach). Im Gegensatz zu A-S15k-C/Cp reicherte A-S24k-C/Cp aber nicht auf Kosten des WtD an, sondern wurde vom WtD überwachsen (Abb. 5.15B und C). Die beiden Hybridgenome unterscheiden sich durch zusätzliche Punktmutationen bei nt 1753 und 1767 im Cp von A-S24k-C/Cp und durch verschiedene Punktmutationen im C-Gen (u. a. der *frameshift*- und Stoppkodonmutation von A-S15k-C/Cp). Die korrespondierende komplexe Variante A-S24k wurde bei hohem transfiziertem Variantenanteil nicht vom WtD überwachsen (Abb. 5.11).



**Abbildung 5.15: Replikation der C/Cp-Hybridvarianten nach Kotransfektion mit WtD.** Die replikativen Intermediate aus zytoplasmatischen Core-Partikeln wurden 4 Tage nach Kotransfektion von HuH7-Zellen mit C/Cp-Hybridvarianten und WtD in verschiedenen Verhältnissen untersucht. Zur Konstruktion der C/Cp-Varianten wurden Cp und C-Gen der jeweiligen Wt-ähnlichen Genome (Patient A: A-S1, Patient B: B-S3) durch die entsprechenden Regionen der komplexen Varianten ersetzt. A: Gesamtreplication und Replikation der Variante relativ zu WtD allein. B: Replikation von Variante und WtD im Verhältnis zur jeweils transfizierten DNA-Menge. C: Anreicherung der Variante gegenüber WtD. Siehe auch Abb. 5.11. Gezeigt sind jeweils Mittelwerte  $\pm$  StA von 3 unabhängigen Experimenten.

Bei der Mehrzahl der C/Cp-Varianten waren, unabhängig von der Länge der C-Gendeletion, Replikation und Anreicherung schwächer als bei den entsprechenden komplexen Varianten. Nur die C/Cp-Variante von A-S18k zeigte eine viel stärkere Replikation und Anreicherung als

die komplexe Variante. Dies weist auf einen replikationshemmenden Effekt von Mutationen hin, die ausschließlich in der komplexen Variante vorhanden sind (z. B. eine X-Gen-Startkodonmutation oder verschiedene Austausche im EnhI, PRE oder der Polymerase, Abb. 5.5).

Im Gegensatz zu den Varianten des Patienten A lagen bei Patient B zwischen der Replikation der C/Cp- und der komplexen Varianten nur geringfügige Unterschiede vor. Tatsächlich unterscheidet sich das Mutationsmuster der komplexen Varianten des Patienten B auch deutlich weniger von dem ihrer C/Cp-Varianten, als dies bei den Varianten des Patienten A der Fall ist, da sie außerhalb von Cp und C-Gen nur sehr wenige zusätzliche Punktmutationen tragen, die im Wt-ähnlichen B-S3 nicht vorhanden sind (Abb. 5.5).

In der Zusammenfassung waren also die Mutationen in Cp und C-Gen der komplexen Varianten ausreichend, um eine erhöhte Replikation und meist auch Anreicherung ohne Hemmung des WtD zu bewirken. Mutationen außerhalb dieser beiden Regionen beeinflussten jedoch deutlich die Replikationsstärke der Varianten und des koreplizierenden WtD. Auf die Variantenreplikation hatten sie hauptsächlich einen positiven Effekt, im Einzelfall aber auch negative Auswirkungen (A-S18k).

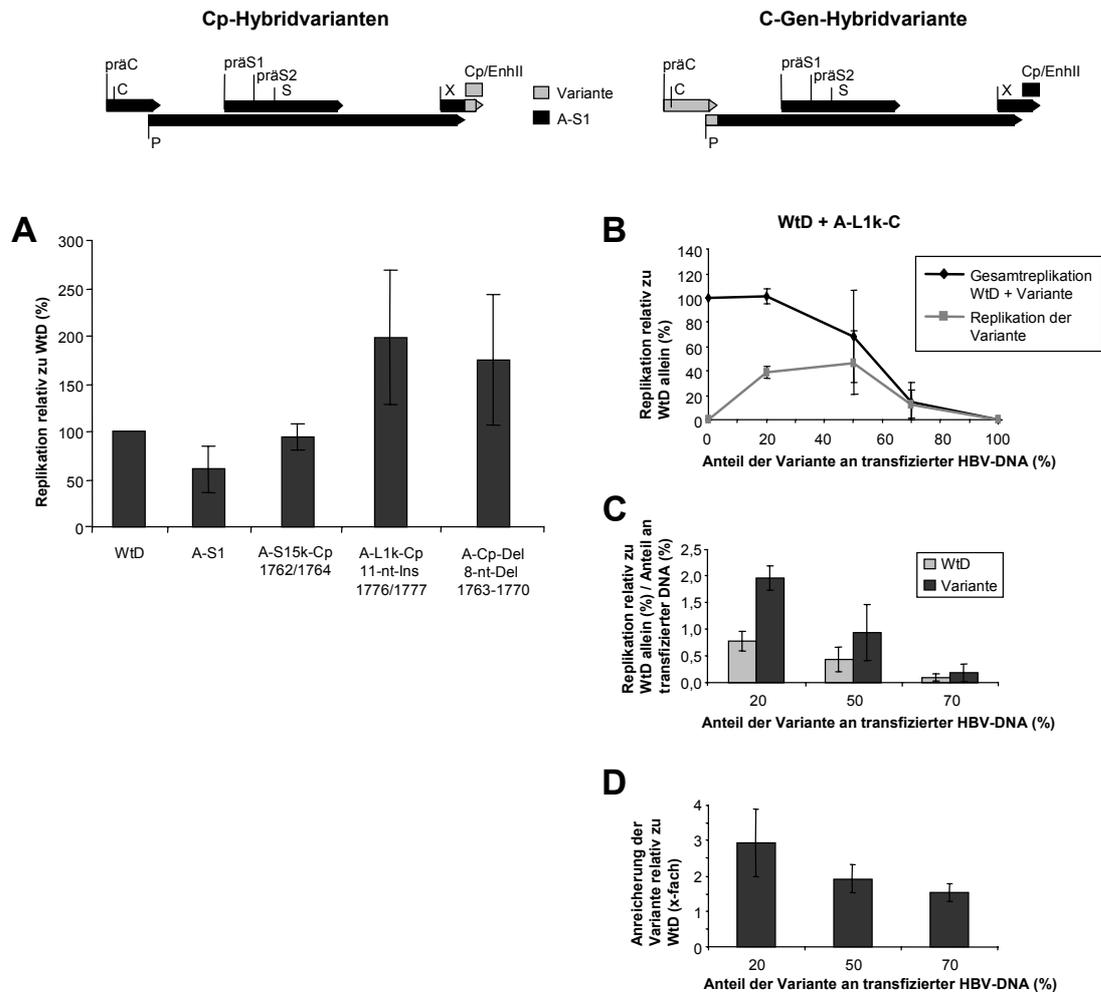
#### *5.4.2 Replikation der Cp- und C-Gen-Hybridvarianten*

Um den Beitrag der Mutationen in Cp und C-Gen zum Phänotyp der erhöhten Replikation einzeln zu untersuchen, wurden exemplarisch der Cp mit Punktmutationen bei nt 1762 und 1764 von A-S15k, ein Cp mit der 8-nt-Deletion 1763–1770, der Cp mit der 11-nt-Insertion 1776/1777 von A-L1k sowie das C-Gen mit 90-nt-Deletion von A-L1k in das Wt-ähnliche Genom A-S1 des Patienten A eingebracht.

Die replikativen Intermediate der Cp-Hybridvarianten wurden im Southern Blot im Vergleich zu WtD und zu A-S1 analysiert und densitometrisch ausgewertet (Abb. 5.16A). Hybridvariante A-S15k-Cp mit den Punktmutationen 1762/1764 replizierte etwa wie der WtD (118 % von WtA, vgl. Abb. 5.10) und mit ca. 150 % von A-S1. Die Cp-Varianten mit Insertion (A-L1k-Cp) und Deletion (A-Cp-Del) im A-S1-Kontext zeigten dagegen eine gegenüber dem WtD ca. 2fach (WtA: ca. 2,4fach) und gegenüber A-S1 ca. 3fach erhöhte Replikation.

Die C-Gen-Hybridvariante A-L1k-C wurde zur Komplementation des defekten Core-Proteins mit WtD kotransfiziert. Die Analyse der Replikation in Southern Blot und Pyrosequenzierung ergab, wie für die komplexe Variante, eine erhöhte Replikation und Anreicherung von A-L1k-C, jedoch in einem deutlich geringeren Maße (Abb. 5.16B, C und D). Die maximale

Replikation betrug das 2fache der von der transfizierten DNA-Menge erwarteten Replikation (gegenüber dem 13fachen der komplexen Variante, Abb. 5.11B) und die Anreicherung das 3fache. Dennoch wurde die WtD-Replikation bei hohem transfizierten Variantenanteil gleichermaßen wie bei der komplexen Variante gehemmt, was das Absinken der Varianten- und Gesamtreplication zur Folge hatte.



**Abbildung 5.16: Replikation der Cp-Hybridvarianten (A) und der C-Gen-Hybridvariante nach Kotransfektion mit WtD (B, C, D).** Replikative Intermediate aus zytoplasmatischen Core-Partikeln wurden 4 Tage nach Transfektion von HuH7-Zellen mit Cp-Hybridvarianten bzw. nach Kotransfektion mit der C-Gen-Hybridvariante und WtD in verschiedenen Verhältnissen untersucht. Zur Konstruktion der Cp- und der C-Gen-Varianten wurden der Cp bzw. das C-Gen des Wt-ähnlichen Genoms A-S1 durch die entsprechende Region von komplexen Varianten des Patienten A ersetzt. Dargestellt sind die Ergebnisse für 3 Cp-Varianten mit Punktmutationen bei nt 1762/64 (A-S15k-Cp), der 11-nt-Insertion (A-L1k-Cp) oder der 8-nt-Deletion (A-Cp-Del) sowie für eine C-Genvariante mit dem 90-nt-deletierten C-Gen von A-L1k im A-S1-Kontext. Für die Hybridvariante A-Cp-Del wurde der Cp einer bisher nicht erwähnten Variante (A-3/25) isoliert, der bis auf die Abwesenheit der 1753-Punktmutation mit dem deletierten Cp der Varianten des Patienten B identisch ist. A: Quantitative Auswertung der replikativen Intermediate der Cp-Varianten im Southern Blot relativ zu WtD. B: Gesamtreplication und Replikation der C-Gen-Variante relativ zu WtD allein. C: Replikation von C-Gen-Variante und WtD im Verhältnis zur jeweils transfizierten DNA-Menge. D: Anreicherung der C-Gen-Variante gegenüber WtD. Siehe auch Abb. 5.11. Gezeigt sind jeweils Mittelwerte  $\pm$  StA von mindestens 4 unabhängigen Experimenten.

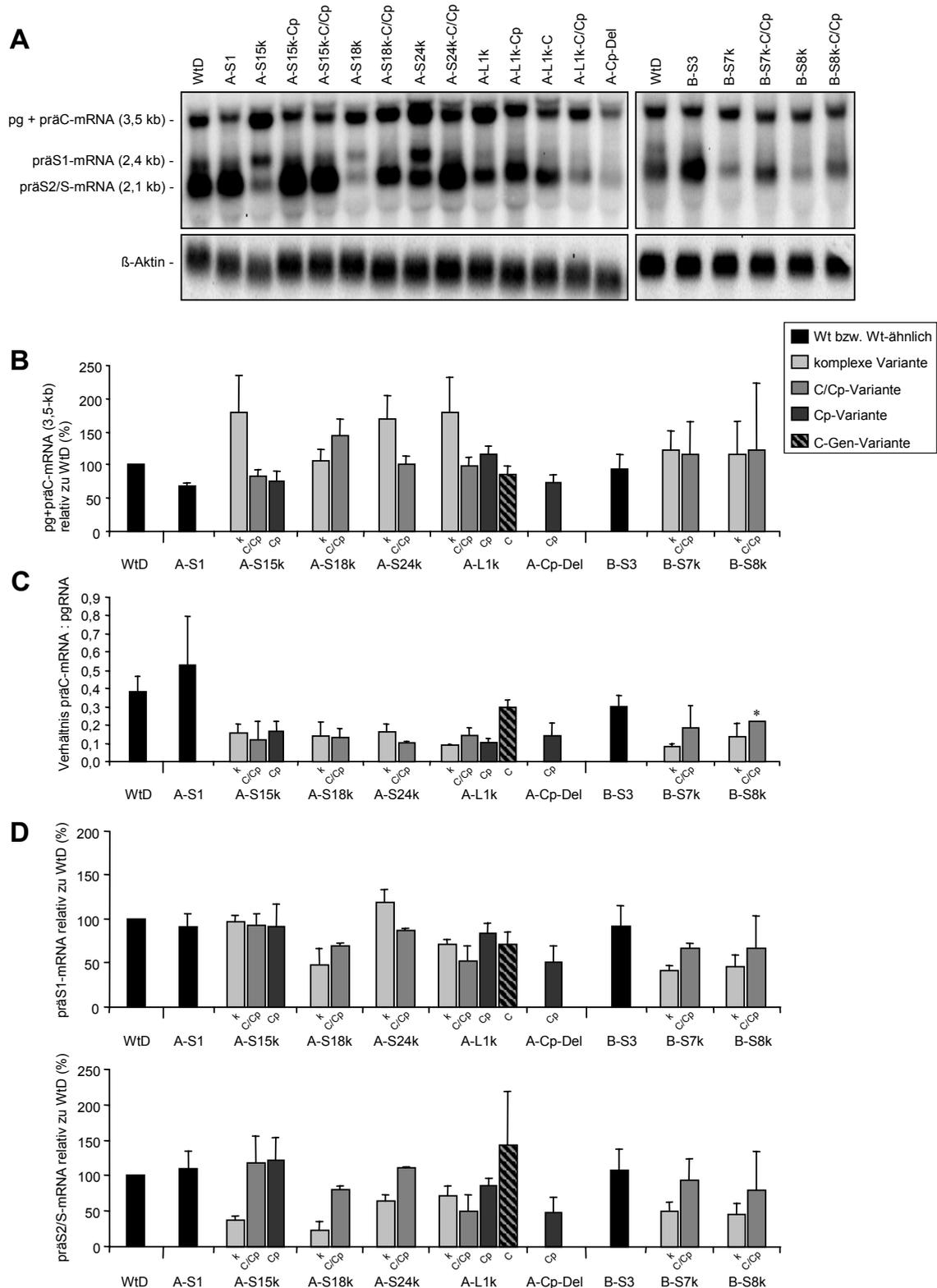
Die Cp- und C-Genmutationen der komplexen Varianten führten also auch allein in einem Wt-ähnlichen Genom-Kontext schon zur erhöhten Replikation. Allerdings zeigte sich am Beispiel der Variante A-L1k, dass die Effekte von Cp- und C-Genmutationen (je 2fache Erhöhung gegenüber WtD) in der Summe nicht das Niveau der erhöhten Replikation der C/Cp-Variante (6fache Erhöhung, Abb. 5.15B) erreichten. Die Mutationen im C-Gen vermittelten eine Hemmung der WtD-Replikation, die mit der zusätzlichen Anwesenheit einer Cp-Insertion nicht mehr vorhanden war (A-L1k-C/Cp, Abb. 5.15B). Bei der komplexen Variante A-L1k mit einer nochmals drastisch gesteigerten Replikationsfähigkeit wurde diese Hemmung des WtD jedoch wieder beobachtet (Abb. 5.11B).

### 5.4.3 Transkription

Auch die Transkription der Hybridgenome wurde nach Transfektion von HuH7-Zellen analysiert, um den Einfluss der Mutationen in Cp und/oder C-Gen auf die veränderte RNA-Expression der komplexen Varianten zu untersuchen.

Die Analyse der 3,5-kb-RNA-Bande (pgRNA + präC-mRNA) in Northern Blots von Gesamt-RNA demonstrierte, dass die bei den komplexen Varianten beobachtete verstärkte Expression dieser RNAs nur teilweise auf die Mutationen in Cp und C-Gen zurückzuführen war (Abb. 5.17A und B). Zur Differenzierung der präC-mRNA und pgRNA wurden wieder ergänzend Primer-Extension-Analysen durchgeführt (vgl. auch Abschnitt 5.2.1). Bei den C/Cp- und Cp-Hybridvarianten war das Verhältnis von präC-mRNA zu pgRNA wie bei den komplexen Varianten durch verminderte Expression der präC-mRNA stark reduziert (Abb. 5.17B). Daher bestand auch hier die 3,5-kb-Bande im Northern Blot hauptsächlich aus pgRNA, und ein verstärktes Signal dieser Bande ließ sich mit verstärkter Expression der pgRNA gleichsetzen. Bei der C-Gen-Hybridvariante A-L1k-C war das Verhältnis von präC-mRNA zu pgRNA dagegen nahezu unverändert.

Im Gegensatz zu den Cp-Punktmutationen (A-S15k-Cp), der Cp-Deletion (A-Cp-Del) und dem deletierten C-Gen (A-L1k-C), die die pgRNA-Level im Vergleich zum entsprechenden Wt-ähnlichen Genom A-S1 nicht veränderten, bewirkte die Cp-Insertion (A-L1k-Cp) eine leichte Erhöhung der pgRNA-Expression (Abb. 5.17B). Die pgRNA-Level der C/Cp-Varianten waren im Fall der Varianten A-S15k mit Cp-Punktmutationen und der Varianten des Patienten B mit Cp-Deletion nahezu unverändert oder nur marginal erhöht und entsprachen damit dem Niveau der korrespondierenden Cp-Varianten. Bei Variante A-L1k-C/Cp mit Cp-Insertion lag die pgRNA-Expression zwischen dem erhöhten Level der Cp- und dem unveränderten Level der C-Gen-Variante.



**Abbildung 5.17: Transkription der Hybridvarianten im Vergleich zu WtD, den Wt-ähnlichen Genomen und den komplexen Varianten.** Vier Tage nach Transfektion von HuH7-Zellen mit HBV-DNA der Cp-, C-Gen- und C/Cp-Hybridvarianten, der komplexen Varianten und der Wt-(ähnlichen) Genome wurde die Gesamt-RNA der Zellen präpariert und in Northern Blots und Primer-Extension-Assays analysiert. Die Auswertungen der Northern Blots sind einheitlich relativ zu WtD dargestellt. A: Die exemplarisch dargestellten Northern Blots wurden mit einer HBV-Gesamt-Genom-Sonde und zur Ladekontrolle mit einer β-Aktin-Sonde hybridisiert. B: Von der quantitativen Auswertung der 3,5-kb-Bande (pgRNA + präC-mRNA) der Northern Blots sind Mittelwerte ± StA von 3 unabhängigen Experimenten gezeigt.

C: Ergebnisse der Primer-Extension-Analysen von präC-mRNA und pgRNA. Das im Diagramm präsentierte Verhältnis der präC-mRNAs zur pgRNA wurde nach quantitativer Auswertung der Signale mit dem TINA-Programm berechnet. Für die Hybridvarianten sind Mittelwerte  $\pm$  StA von 2–3 unabhängigen Experimenten dargestellt. In den mit einem Stern gekennzeichneten Balken ging nur das Ergebnis eines Experiments ein. D: Von der quantitativen Auswertung der präS1- und präS2/S-mRNAs in Northern Blots sind Mittelwerte  $\pm$  StA von 3 unabhängigen Experimenten gezeigt. (Siehe auch Abb. 5.6.)

Wie auch die Replikation war die pgRNA-Expression bei C/Cp-Varianten des Patienten A meist weniger ausgeprägt als die der entsprechenden komplexen Varianten und bei den C/Cp-Varianten des Patienten B etwa gleich stark. Nur bei Variante A-S18k war die pgRNA-Expression der C/Cp-Variante deutlich erhöht und, wie auch die Replikation, stärker als die der komplexen Variante. Diese Ergebnisse machen deutlich, dass bei den Varianten des Patienten A auch Mutationen außerhalb von Cp und C-Gen einen deutlichen Einfluss auf die Expression der pgRNA haben.

Bei der Auswertung der Oberflächen-mRNAs im Northern Blot zeigte sich, dass die Cp-Punktmutationen allein (A-S15k-Cp) und auch in Kombination mit den C-Genmutationen (A-S15k-C/Cp, A-S24k-C/Cp) keinen Einfluss auf die Expression von präS1- und präS2/S-mRNA hatten (Abb. 5.17C). Die 11-nt-Insertion im Cp (A-L1k-Cp) verursachte allein nur eine schwache Senkung der präS2/S-mRNA, in Kombination mit zusätzlichen Mutationen im C-Gen (A-L1k-C/Cp, A-S18k-C/Cp) aber eine geringe Erniedrigung beider Oberflächen-mRNAs. Die Mutationen im C-Gen allein bewirkten bei Hybridvariante A-L1k-C eine leichte Reduktion der präS1-mRNA, jedoch nicht der präS2/S-mRNA.

Die Cp-Deletion senkte im Kontext des Wt-ähnlichen Genoms A-S1 die Expression der beiden Oberflächen-mRNAs auf ca. 50 % (A-Cp-Del). In Kombination mit den C-Genmutationen im Wt-ähnlichen Genom des Patienten B B-S3 (B-S7k-C/Cp, B-S8k-C/Cp) führte die Cp-Deletion ebenfalls zu einer auf ca. 65 % reduzierten präS1-mRNA, die präS2/S-mRNA war in diesem Kontext jedoch kaum betroffen. Dagegen wiesen die komplexen Varianten des Patienten B wiederum eine deutlichere, 40–50%ige Reduktion beider Oberflächen-mRNAs auf. Da die Klonierung der Cp-Deletion allein im Kontext des B-S3-Genoms nicht gelang, kann über den Grund der weniger ausgeprägten Reduktion insbesondere der präS2/S-mRNA der C/Cp-Genome von Patient B im Vergleich zu den korrespondierenden komplexen Varianten und zu Hybridvariante A-Cp-Del nur spekuliert werden. Entweder hoben Mutationen im C-Gen der C/Cp-Varianten den bei A-Cp-Del beobachteten reduzierenden Effekt der Cp-Deletion teilweise auf oder er kam im genomischen Kontext des Patienten B weniger zum Tragen. Für die Reduktion bei den komplexen Varianten sind also möglicherweise Mutationen außerhalb von Cp und C-Gen

wichtig. Da die komplexen Varianten in den regulatorischen Bereichen der Oberflächen-RNA-Expression (S1p und S2/Sp) keine anderen Mutationen als B-S3 trugen (Abb. 5.5), kämen dafür nur andere Nukleotidaustausche wie z. B. 1227 T>C im EnhI in Frage. Auch die meisten komplexen Varianten des Patienten A zeigten eine viel stärker reduzierte Expression der präS2/S-mRNA als die Hybridvarianten. Hier wurde dieser Effekt vermutlich durch eine Punktmutation bei nt 3084 G>A im S2/S-Promotor verursacht (vgl. Abschnitt 5.2.1 und Abb. 5.5).

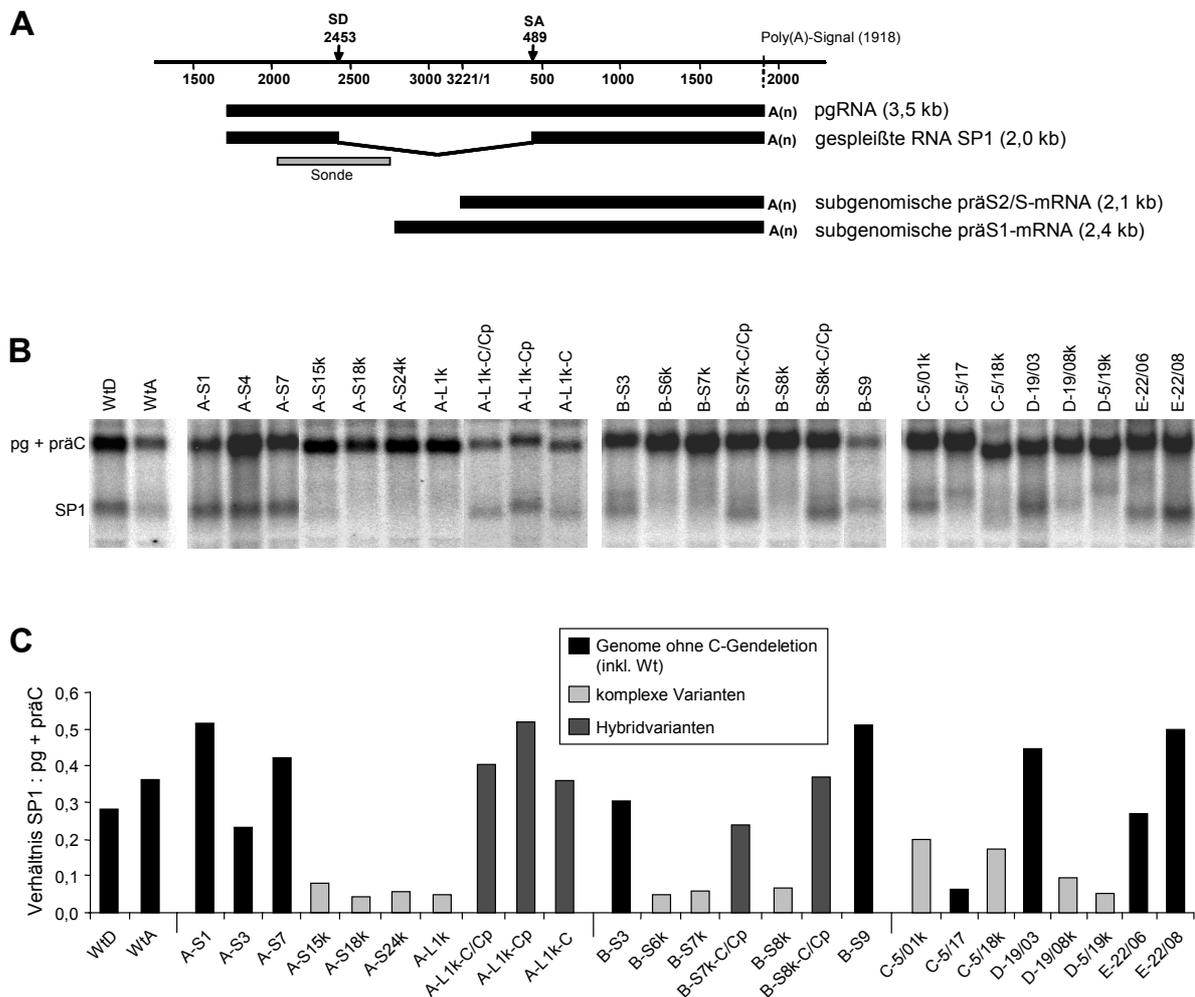
Zusammengefasst macht die Analyse der Transkription der Hybridvarianten deutlich, dass die veränderte RNA-Expression der komplexen Varianten nur teilweise auf die Mutationen in Cp und C-Gen zurückzuführen ist. Die Mutationen im Cp waren verantwortlich für die verringerte präC-mRNA-Expression. Dagegen hatten die Cp- und C-Gen-Mutationen (mit Ausnahme der Cp-Deletion) keinen oder im Fall der Cp-Insertion nur einen geringen Einfluss auf die Oberflächen-mRNAs. Erstaunlich ist jedoch, dass auch die erhöhte pgRNA-Expression bei Varianten des Patienten A teilweise auf Mutationen in anderen Bereichen beruht. Unklar ist, welche dies sein könnten.

## **5.5 Auswirkungen auf das Spleißen der pg/präC-RNAs**

Während der HBV-Replikation findet partielles Spleißen der 3,5-kb-pg/präC-RNAs statt, das vermutlich eine zur Zeit noch unklare Rolle im Replikationszyklus spielt. In Zellkulturexperimenten enthalten bis zu 80 % der intrazellulären Core-Partikel und 20 % der extrazellulären Viruspartikel verkürzte Genome, die von gespleißter pgRNA abstammen [215]. Die vorherrschende gespleißte pgRNA ist die SP1-RNA mit einem Spleißdonor bei nt 2453/2454 (Genotyp D: nt 2447/2448) und einem Spleißakzeptor bei nt 488/489 (Abb. 5.18A). Sie macht neben 10 anderen bekannten gespleißten RNAs ca. 60 % aller Spleißprodukte aus [15,215]. Um die Auswirkungen der komplexen Mutationsmuster der Varianten auf das Spleißen zu analysieren, wurde die SP1-RNA im Verhältnis zur ungespleißten 3,5-kb-pg/präC-RNA untersucht. Dazu wurden Northern Blots von Gesamt-RNA der transfizierten Zellen mit einer Sonde hybridisiert, die ausschließlich die pg + präC-RNAs und die SP1-RNA, jedoch nicht die subgenomischen Oberflächen-mRNAs bindet (Abb. 5.18A). In Northern Blots mit Sonden, die das gesamte Genom umspannen (wie z. B. in Abschnitt 5.2.1), wird die ca. 2 kb große SP1-RNA im Allgemeinen von den deutlich stärker exprimierten Oberflächen-mRNAs überdeckt.

### 5.5.1 Gespleißte SP1-RNA der HBV-Genome der Patienten A und B

Zunächst wurden Genome der beiden Patienten A und B hinsichtlich der gespleißten SP1-RNA untersucht. Die Wt-Genome WtD und WtA sowie diejenigen Klone der beiden Patienten, die ein C-Gen ohne Deletion tragen und meist vom Beginn des Beobachtungszeitraums vor LZ stammen (A-S1, A-S4, A-S7, B-S3, B-S9), zeigten eine klare SP1-Bande im Northern Blot (Abb. 5.18B). Dagegen war die SP1-Bande bei den komplexen Varianten kaum noch oder gar nicht mehr zu erkennen. Das aus der Intensität der Banden



**Abbildung 5.18: Analyse der häufigsten gespleißten RNA SP1.** Zur Analyse der gespleißten RNA SP1 wurden HuH7-Zellen mit den Wt-Genomen, verschiedenen HBV-Genomen von 5 Patienten (A-E) und Hybridvarianten transfiziert. Nach 4 Tagen wurde die Gesamt-RNA aus den Zellen aufgereinigt und im Northern Blot untersucht. A: Schematische Darstellung der ungespleißten pgRNA, der gespleißten RNA SP1 mit dem Spleißdonor (SD) bei nt 2453 (Genotyp A; Genotyp D: nt 2447) und dem Spleißakzeptor (SA) bei nt 489 sowie der subgenomischen Oberflächen-RNAs. Die Position der verwendeten Northern-Blot-Sonde (nt 2021–2755) ist angegeben. B: Gezeigt sind Northern Blots mit der Sonde, die SP1 und pg+präC-RNAs detektiert, jedoch nicht an die subgenomischen RNAs bindet (vgl. A). C: Nach quantitativer Auswertung der Northern-Blot-Banden wurde das Verhältnis der SP1-RNA zur pg+präC-RNA berechnet und im Diagramm aufgetragen. Der deutliche Nachweis von SP1-RNA bei den C/Cp-Varianten und C-Gen-Hybridvariante A-L1k-C zeigt, dass die Bindung der Sonde durch die C-Gen-Deletionen nicht behindert wurde. Die Ergebnisse wurden exemplarisch für einige Genome der Patienten A und B in 3 unabhängigen Experimenten bestätigt.

berechnete Verhältnis von SP1 zu ungespleißten pg + präC-RNAs der komplexen Varianten beider Patienten war im Vergleich zu den Wt-Genomen und den anderen Klonen erheblich reduziert (Abb. 5.18C), obwohl keine der komplexen Varianten an den Spleißorten mutiert ist (vgl. Abb. 5.5).

Um die für die drastische Reduktion des Spleißprodukts SP1 verantwortlichen Genomveränderungen einzugrenzen, wurden einige der Hybridgenome mit Cp, C-Gen und Cp + C-Gen der Varianten im Kontext der Wt-ähnlichen Genome auf ihr Spleißen getestet. Alle Hybridgenome zeigten hohe SP1-RNA-Level (Abb. 5.18B und C). Daher sind also weder die Cp- oder C-Gen-Mutationen einzeln noch ihre Kombination für das Phänomen der reduzierten SP1-RNA allein verantwortlich.

### 5.5.2 Gespleißte SP1-RNA der HBV-Genome weiterer Patienten

Um sicher zu gehen, dass es sich bei dem verminderten Spleißen zur SP1-RNA tatsächlich um eine allgemeine Eigenschaft der komplexen mit LZ assoziierten Varianten handelte, wurden HBV-Genome aus 3 weiteren Nierentransplantatempfängern mit chronischer Hepatitis B untersucht. Die Patienten C und D hatten wie auch Patient A und B nach Auftauchen und Akkumulation der komplexen HBV-Varianten eine LZ entwickelt (beschrieben als Patienten 13 und 10 in Preikschat *et al.* [134]). Patient E gehörte dagegen zur Vergleichsgruppe und hatte weder komplexe Varianten noch LZ.

Beide Klone des Patienten E, die lediglich wenige Punktmutationen tragen, zeigten ähnlich hohe SP1-RNA-Level wie die Referenz-Wt-Genome und die Wt-ähnlichen Klone der Patienten A und B (Abb. 5.18B und C). Bei den 3 Varianten des Patienten D fand sich das gleiche Bild wie bei den ersten beiden Patienten: Der Klon D-19/03 ohne C-Gendeletion wies normale SP1-RNA-Level auf, während bei den komplexen Varianten D-19/08k und D-5/19k die SP1-RNA stark reduziert war. Die beiden komplexen Varianten gehören zu dem Variantentyp, der während der Entwicklung der LZ in diesem Patienten die Hauptpopulation bildete. Lediglich bei Patient C fanden sich eine Variante ohne C-Gendeletion (C-5/17), die kaum SP1-RNA zeigte, und 2 komplexe Varianten (C-5/01k und C-5/18k), die im Vergleich zu den Wt-Genomen nur schwach reduzierte SP1-RNA-Level aufwiesen (Abb. 5.18B und C). Klon C-5/01k hat jedoch nur eine sehr kleine C-Gendeletion, die deutlich weiter C-terminal liegt als die der anderen komplexen Varianten (nt 2394–2420, siehe Anhang Abb. A.1), während die C-Gendeletion des Klons C-5/18k um einiges größer ist als die der anderen Genome (nt 2068–2304, 237 nt).

Insgesamt, mit Ausnahme des Patienten C, bestätigte sich eine Korrelation zwischen komplexem Mutationsmuster mit C-Gendeletion und drastisch verminderter SP1-RNA. Neun von 10 Genomen mit reduziertem Spleißprodukt SP1 tragen eine C-Gendeletion und 9 von 11 Genomen mit normalen SP1-RNA-Leveln haben keine C-Gendeletion. Da jedoch die Analyse der Hybridgenome demonstrierte, dass C-Gendeletionen alleine und auch zusammen mit Cp-Mutationen die SP1-RNA nicht herunterregulieren, sind zusätzlich weitere Mutationen außerhalb dieser Bereiche in das Phänomen involviert.

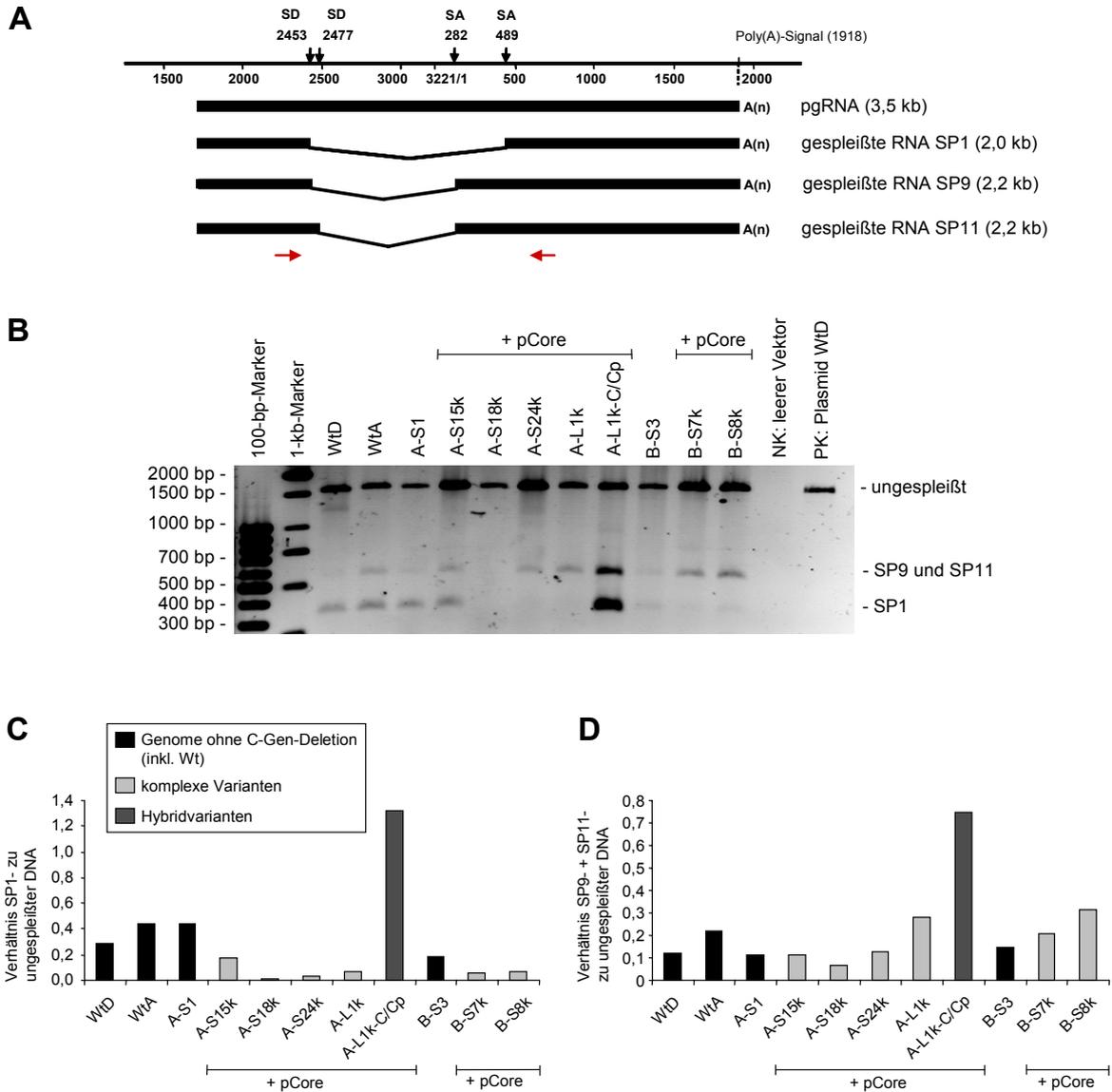
### 5.5.3 Gespleißte replikative Intermediate in Core-Partikeln

Alle 11 bekannten Spleißprodukte der pgRNA des HBV werden in Core-Partikel verpackt, revers transkribiert und sind in viralen Partikeln im Serum von Patienten zu finden [15]. Um auszuschließen, dass der Level der SP1-RNA bei den komplexen Varianten aufgrund einer verstärkten Umschreibung in DNA reduziert war, wurde das Verhältnis der SP1-abgeleiteten und ungespleißten replikativen Intermediate im Vergleich zu den Wt-Genomen bestimmt. Dazu wurde nach Transfektion der Referenz-Wt-Genome, der Wt-ähnlichen Genome der Patienten A und B, der komplexen Varianten + pCore und des C/Cp-Hybridgenoms A-L1k-C/Cp + pCore ein Fragment der replikativen Intermediate aus zytoplasmatischen Core-Partikeln mittels einer PCR amplifiziert, die das in der SP1-RNA entfernte Intron einschloss (schematische Darstellung der Primer-Positionen in Abb. 5.19A). Für die von ungespleißter pgRNA umgeschriebene DNA war somit eine Bande von 1596 bp und für die SP1-abgeleitete DNA eine Bande von 340 bp im Agarosegel sichtbar (Abb. 5.19B). Bei der zur Kontrolle amplifizierten DNA des WtD-Plasmids war, wie erwartet, nur die Bande des ungespleißten Produkts zu finden.

Die quantitative Auswertung der Banden zeigte, dass auch die von der SP1-RNA revers transkribierte DNA bei den komplexen Varianten relativ zur ungespleißten DNA stark reduziert war im Vergleich zu WtD, WtA und den Wt-ähnlichen Genomen (Abb. 5.19C). Bei A-S15k war das Verhältnis im Einklang mit der auch im Northern Blot etwas stärkeren Bande der SP1-RNA etwa doppelt so hoch wie das der übrigen komplexen Varianten, aber immer noch deutlich niedriger als das der Wt-Genome und des korrespondierenden Wt-ähnlichen Genoms A-S1. Erstaunlicherweise war das Verhältnis der SP1-abgeleiteten zur ungespleißten DNA bei Hybridvariante A-L1k-C/Cp im Vergleich zum Wt extrem erhöht und auch wesentlich stärker als das auf RNA-Ebene beobachtete Verhältnis.

Im Agarosegel war zusätzlich eine weitere Bande auf der Höhe von ca. 550 bp zu sehen. Um ihre Herkunft zu klären, wurde die DNA der Bande aus dem Gel ausgeschnitten, aufgereinigt,

kloniert und sequenziert. Sie stammte von replikativen Intermediaten, die durch Umschreibung der seltenen Spleißprodukte SP9 und SP11 entstanden waren. Bei diesen beiden gespleißten pgRNAs wird im Unterschied zur SP1-RNA ein anderer Spleißakzeptor



**Abbildung 5.19: Analyse gespleißter und ungespleißter replikativer Intermediate.** HuH7-Zellen wurden mit den Wt-Genomen, den Wt-ähnlichen Genomen, den komplexen Varianten und einer Hybridvariante der Patienten A und B transfiziert. Komplexe Variantengenome wurden mit pCore kotransfiziert. Nach 4 Tagen wurden die replikativen Intermediate aus zytoplasmatischen Core-Partikeln aufgereinigt. Von ungespleißter oder gespleißter pgRNA revers transkribierte DNA-Intermediate wurden mittels PCR detektiert. A: Schematische Darstellung der ungespleißten pgRNA sowie der gespleißten pgRNAs SP1, SP9 und SP11. Die jeweils verwendeten Spleißdonoren (SD) bei nt 2453 bzw. nt 2477 (Genotyp A; Genotyp D: nt 2447 bzw. 2471) und dem Spleißakzeptoren (SA) bei nt 282 bzw. nt 489 sind angegeben. Unter den RNAs sind die Positionen der PCR-Primer (nt 2363–2386 und nt 716–738) zur Detektion der ungespleißten und gespleißten replikativen Intermediate als Pfeile gezeigt. B: Die PCR-Produkte wurden im 1%igen Agarosegel aufgetrennt und mittels Ethidiumbromid visualisiert. Als Marker dienten die 100-bp- und 1-kb-DNA-Leitern (GeneRuler, Fermentas). Als Negativkontrolle (NK) wurde DNA aus nur mit Vektor pZerO transfizierten Zellen und als Positivkontrolle für ungespleißte DNA wurde DNA des WtD-Plasmids in die PCR eingesetzt. C: Die Banden im Gel wurden quantitativ mit dem TINA-Programm ausgewertet. Im Diagramm aufgetragen wurde das Verhältnis der SP1-abgeleiteten DNA zur ungespleißten DNA. D: Außerdem ist das Verhältnis der SP9/SP11-abgeleiteten DNA zur ungespleißten DNA im Diagramm gezeigt.

bei nt 282 verwendet. Bei der SP11-RNA kommt außerdem ein anderer Spleißdonor bei nt 2477 zum Einsatz (Abb. 5.19A). Das Verhältnis der SP9/SP11-Bande zur Bande der ungespleißten DNA entsprach bei den komplexen Varianten weitgehend dem Verhältnis der Wt-Genome und Wt-ähnlichen Klone (Abb. 5.19D). Es war außerdem unabhängig von der Produktion der SP1-RNA. Die Hybridvariante A-L1k-C/Cp zeigte, wie auch bei SP1, einen deutlich verstärkten Level der SP9/SP11-abgeleiteten DNA.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sowohl die SP1-RNA als auch die SP1-abgeleiteten replikativen Intermediate der komplexen Varianten im Vergleich zum Wt und den Wt-ähnlichen Genomen stark reduziert waren. Dagegen war der Anteil der SP9- und SP11-abgeleiteten DNA-Intermediate nicht verändert und unabhängig vom SP1-DNA-Level.



## 6 Diskussion

In dieser Arbeit wurde erstmals eine funktionelle Analyse der kompletten komplexen HBV-Varianten mit spezifischen Mutationen im Cp/X-Gen, C-Gen und z. T. in der präS-Region durchgeführt, deren Akkumulation und Persistenz mit schweren Leberschäden in Nierentransplantatempfängern assoziiert sind. Dazu wurden ausgewählte repräsentative Genome der Variantentypen, die vor und während der Entwicklung der LZ in 2 Patienten auftraten und akkumulierten, durch Transfektion von Hepatomazellen untersucht.

### 6.1 Replikationskompetenz der klonierten HBV-Genome

Wie vermutet, erwies sich im Screening nur ein Teil der aus Patientenmaterial klonierten HBV-Genome im *in-vitro*-Transfektionssystem als replikationskompetent. Grund für dieses Phänomen sind hauptsächlich während der PCR eingeführte Mutationen [151]. Es wurde gezeigt, dass nach der Amplifikation und Klonierung noch replizierende Genome im Schnitt nur 0,9 eingeführte Punktmutationen aufwiesen, während die Anzahl bei replikationsinkompetenten Klonen weit höher lag ( $>5$ ) [151]. Dies verdeutlicht, wie wenige zufällig durch PCR und Klonierung eingeführte Punktmutationen das HBV-Genom toleriert, ohne die Replikationskompetenz zu verlieren. Der Einfluss eingeführter Mutationen auf den Phänotyp der in dieser Arbeit analysierten, replikationskompetenten Genome sollte daher gering sein.

In den HuH7-Zellen waren 45 % der getesteten HBV-Genome des Patienten A und 23 % der HBV-Genome des Patienten B replikationsfähig. Während der Anteil bei Patient A somit im aus der Literatur bekannten Bereich lag (41 %) [151], war er bei Patient B deutlich niedriger. Aus unbekanntem Gründen replizierte keines der Genome, die ausschließlich die Deletion bei nt 1763–1770 im Cp, aber keine C-Gen deletion, tragen. Dieser Variantentyp (Typ B) repräsentierte 56 % aller getesteten HBV-Genome des Patienten B.

### 6.2 Phänotyp der komplexen Varianten

Die repräsentativen komplexen Varianten, die während der Entwicklung der LZ akkumulierten, zeigten im Vergleich zu Wt-HBV einen drastisch veränderten Phänotyp. Trotz einiger Unterschiede im Detail war dieser zusammenfassend gekennzeichnet durch

- (I) eine veränderte Transkription mit reduzierten präC- und Oberflächen-mRNAs und verstärkter Expression der pgRNA,
- (II) stark reduzierte Level des häufigsten Spleißprodukts der pgRNA, SP1, und der

entsprechenden replikativen Intermediate,

- (III) erhöhte Replikation und Anreicherung gegenüber Wt-HBV im Zytoplasma und Zellkulturüberstand aufgrund von verstärkter reverser Transkription,
- (IV) eine stark reduzierte oder fehlende Expression und/oder Sekretion aller Oberflächenproteine, des Core-Proteins und des HBeAg und
- (V) eine aberrante, perinukleäre Lokalisation der exprimierten Oberflächenproteine und/oder des Wt-Core-Proteins nach Kotransfektion.

Eine veränderte Transkription, erhöhte Replikation und der Defekt in HBsAg- und HBeAg-Expression fanden sich, unabhängig vom Variantentyp, auch bei vielen der übrigen, nicht detailliert charakterisierten komplexen Varianten der beiden Patienten (Abb. 5.1 und 5.3). Aus unbekanntem Gründen fielen die aus der Leber des Patienten A isolierten Varianten durch eine besonders starke Replikation (nach Kotransfektion mit pCore) und eine teilweise noch intakte Expression der Oberflächen-mRNAs und des HBsAg auf. Dies korreliert mit einer hohen Variabilität der präS-Sequenzen und der Anwesenheit von nur wenigen AS-Austauschen im S-Bereich. Die nur bei den Varianten des Patienten A vorhandene Deletion im präS2-Bereich schien den Phänotyp nicht wesentlich zu beeinflussen.

Im Gegensatz zu den komplexen Varianten zeigten die beiden Wt-ähnlichen Genome A-S1 und B-S3, wie auch die übrigen nicht-komplexen Genome der Patienten (Abb. 5.1 und 5.3), neben der zum Teil stark verminderten HBeAg- und HBsAg-Sekretion kaum weitere phänotypische Veränderungen im Vergleich zu Wt-HBV. Nur Replikation und pgRNA-Expression einiger dieser Genome, inklusive A-S1, waren leicht reduziert. Die defekte HBsAg-Sekretion ließ sich exemplarisch für A-S1 auf eine Retention der Oberflächenproteine im ER zurückführen. Somit waren in den Patienten bereits zu Beginn der Beobachtungszeit im Stadium der klinisch unauffälligen chronischen Hepatitis B keine HBV-Genome mit dem eindeutigen Phänotyp des Referenz-Wt mehr vorhanden.

### **6.3 Einfluss der Mutationen in Cp und C-Gen**

In den früheren, ersten funktionellen Analysen zum Thema der komplexen Varianten wurden zunächst die Auswirkungen ihrer charakteristischen Mutationen in Cp bzw. C-Gen im Kontext eines Wt-Genoms untersucht [157,188]. Diese und andere Studien haben gezeigt, dass die typischen Mutationen im Cp von immunsupprimierten Patienten mit LZ meist verschiedene neue HNF1-Bindungsstellen unterschiedlicher Qualität schaffen [156,157]. Während der durch die Deletion bei nt 1763–1770 entstandene HNF1-Ort eine mäßige Affinität aufweist [157], ist der durch die 11-nt-Insertion bei nt 1776/1777 gebildete deutlich

stärker [156,157]. In den vorangegangenen Arbeiten führten die meisten dieser Cp-Mutationen zu einer verminderten Expression von präC-mRNA und HBeAg sowie teilweise zu reduzierten Oberflächen-mRNAs, präS-Proteinen und HBsAg, während pgRNA, replikative Intermediate, Core-Protein und Polymerase verstärkt gebildet wurden [156,157,190]. Auch für die häufig auftretenden Punktmutationen bei nt 1762/1764 im Cp wurden die Schaffung eines schwachen HNF1-Ortes und eine daraus folgende reduzierte präC-mRNA- und HBeAg-Expression sowie in manchen, aber nicht allen Studien auch eine leicht erhöhte Replikation und pgRNA-Expression nachgewiesen [192,216,217,218,219].

Hybridgenome mit verschiedenen internen C-Gendeletionen im Kontext eines Wt-Genoms zeigten in den früheren Analysen einen Defekt in HBeAg- und Core-Protein-Expression, zum Teil auch leicht erhöhte Polymerase-Werte, aber unveränderte RNA- und Oberflächenprotein-Level [183,188]. Sie waren aufgrund des defekten Core-Proteins nicht allein replikationsfähig, wiesen jedoch bei ausreichend Komplementation mit Wt-Core-Protein eine erhöhte Replikation im Vergleich zum Wt auf [188]. Nach Kotransfektion mit Wt-HBV reicherten die Hybridgenome mit C-Gendeletion an und unterdrückten bei hohen Variantenkonzentrationen die Replikation des Wt [188,189], so dass sie als „*defective interfering particles*“ bezeichnet wurden [189].

Um einen Zusammenhang zum Phänotyp der kompletten komplexen Varianten herstellen und klare Aussagen zum Einfluss der Mutationen in diesen beiden Bereichen treffen zu können, wurden in dieser Arbeit nicht nur die Cp- und C-Genmutationen einzeln, sondern auch erstmals in Kombination in ein Wt-ähnliches Genom eingeführt und funktionell charakterisiert.

Die Ergebnisse der Cp- und C-Gen-Hybridgenomanalysen dieser Arbeit stehen größtenteils im Einklang mit den Resultaten der früheren Studien. Wie erwartet, führten die Cp- und C-Gen-Mutationen zu unterschiedlich stark erhöhter Replikation (Abb. 5.16, für weitere Ausführungen siehe Abschnitt „Replikation“ 6.8). Im Gegensatz zu den 1762/1764-Punktmutationen des Cp (A-S15k-Cp), die nur die präC-mRNA senkten, reduzierte die Cp-Deletion, in Übereinstimmung mit Referenz [157], zusätzlich zur präC-mRNA auch die beiden Oberflächen-mRNAs (Abb. 5.17). Die Cp-Insertion bewirkte, analog zu einer sehr ähnlichen Insertion [157], neben der Reduktion der präC-mRNA nur eine schwache Verminderung der präS2/S-mRNA-, aber nicht der präS1-mRNA-Expression. Im Gegensatz zu früheren Untersuchungen wurde ein verstärkender Einfluss auf die pgRNA-Synthese nur bei der Cp-Insertion (A-L1k-Cp) gefunden. Dies korreliert mit dem Befund, dass die Insertion im Vergleich zu Punktmutation und Deletion den stärksten HNF1-Bindungsort kreiert [157].

In der Kontroverse um eine erhöhte pgRNA-Synthese der Genome mit Cp-Punktmutationen bei nt 1762/1764 bestätigten sich in dieser Arbeit die Studien, die keinen Einfluss auf die pgRNA gesehen hatten [216]. Das C-Gen mit Deletion hatte, wie bereits beschrieben [188], keine relevanten Auswirkungen auf die Transkription (A-L1k-C).

Die Transkription der Hybridgenome mit kombinierten Cp- und C-Genmutationen wurde im Wesentlichen durch die phänotypischen Konsequenzen der einzelnen Cp-Mutationen bestimmt. Allerdings zeigten sich davon auch Abweichungen. So wurden eine im Vergleich zu den Auswirkungen der einzelnen Cp-Mutationen verstärkte Reduktion der Oberflächen-mRNAs bei kombinierter Cp-Insertion und C-Gendeletion (A-L1k-C/Cp), eine fast fehlende Reduktion der präS2/S-mRNA der C/Cp-Varianten des Patienten B und eine stärker erhöhte pgRNA-Expression der Variante A-S18k-C/Cp beobachtet.

Im Gegensatz zur Transkription war der Phänotyp der C/Cp-Hybridgenome auf der Ebene der replikativen Intermediate nicht vollständig aus den Effekten der einzelnen Cp- und C-Genmutationen herzuleiten. Die C/Cp-Genome zeigten eine stärkere Replikation und weniger Unterdrückung des Wt (für weitere Ausführungen siehe Abschnitt „Replikation“ 6.8).

Bei den komplexen Varianten lassen sich mehrere funktionelle Eigenschaften auf die beschriebenen Konsequenzen der Mutationen in Cp und/oder C-Gen zurückführen. Jedoch hatten zusätzlich auch die Mutationen in anderen Genombereichen einen starken Einfluss auf ihren Phänotyp, so dass dieser sich deutlich vielschichtiger präsentiert, als aufgrund der Einzelanalysen zu erwarten war. Eine detaillierte Diskussion dieser Beobachtungen und der funktionellen Bedeutung der einzelnen Mutationen für die komplexen Varianten folgt in den jeweiligen Abschnitten zu den verschiedenen Ebenen des Replikationszyklus.

## **6.4 präC-mRNA und pgRNA**

Die Primer-Extension-Analysen der verschiedenen Hybridgenome zeigten, dass die reduzierte Transkription der präC-mRNA der komplexen Varianten, wie erwartet [217,219], auf die Mutationen im Cp mit den neu geschaffenen HNF1-Bindungsstellen und parallelen Veränderungen im X-Protein zurückzuführen war (Abb. 5.17C).

Überraschenderweise war die erhöhte Expression der pgRNA der komplexen Varianten nur zum Teil eine Folge der Mutationen im Cp, wie es aufgrund der Literatur zu erwarten gewesen wäre [157,218]. Bei den komplexen Genomen des Patienten A – mit Ausnahme von A-S18k – war die pgRNA-Expression deutlich stärker als bei den Cp- oder C/Cp-Genomen (Abb. 5.17B) und scheint daher noch zusätzlich durch Mutationen außerhalb von Cp (und C-Gen) beeinflusst zu werden. Da in den Enhancern keine gemeinsamen Mutationen der

entsprechenden Varianten vorliegen, ist unklar, welche dies sein könnten.

## 6.5 HBeAg-Expression

Allein die in den komplexen Genomen vorliegenden Cp-Mutationen hätten aufgrund der reduzierten präC-mRNA schon zu erheblich verminderter HBeAg-Synthese geführt. Der vollständige Defekt in der HBeAg-Expression aller 16 komplexen Varianten beider Patienten ist aber hauptsächlich eine Konsequenz der C-Gendeletionen, wie vorangegangene Studien an Hybridgenomen mit verschiedenen C-Gendeletionen im Wt-Kontext demonstriert haben [183,188].

Die bereits bei den Wt-ähnlichen Genomen (A-S1, B-S1, B-S2, B-S3) beobachtete verminderte HBeAg-Expression ist nicht zu erklären, da zumindest für A-S1 und B-S3 keine reduzierte präC-mRNA und keine relevanten Mutationen in der präC-Region nachweisbar waren. Bei B-S3 liegt dort nur ein Nukleotidaustausch bei nt 1850 (A>T) vor, der auch im WtD-Referenz-Genom auftritt. Möglicherweise spielen die AS-Austausche G63V der 3 Wt-ähnlichen Genome des Patienten B sowie E77Q und S178T bei A-S1 im HBcAg/HBeAg eine Rolle. Die ersten beiden gehören zu den am häufigsten auftretenden Austauschen in der HBcAg/HBeAg-Sequenz und liegen im dominanten T-Zell-Epitop bzw. im HBc/e1-B-Zell-Epitop [124]. Der Effekt auf HBeAg-Stabilität oder -Immunerkenkung wurde bisher nicht funktionell getestet. Die weiteren Austausche von A-S1 und B-S3 bei AS 93 und 171 entsprechen ebenfalls der Sequenz des WtD-Referenz-Genoms.

## 6.6 Core-Proteinexpression

Wie die Replikationsanalysen dieser Arbeit und die früheren Studien von Hybridvarianten mit verschiedenen C-Gendeletionen [188] gezeigt haben, fehlt den komplexen Varianten aufgrund der Deletionen von 17 AS (Patient B, AS 77–93) oder 30 AS (Patient A, AS 77–106) funktionelles Core-Protein. Die Deletionen liegen in einem Bereich des Core-Proteins, der für Di- und Multimerisierung wichtig ist und zur immundominanten Region gehört.

Dennoch waren sehr geringe Mengen des 30-AS-deletierten Core-Proteins nachweisbar, was mit früheren Ergebnissen für eine Variante mit einer ähnlichen 30-AS-Deletion (AS 88–117) übereinstimmt [188]. Auch in *E.-coli*-Studien war eine sehr geringe Expression des Core-Proteins mit Deletion der AS 77–106 nachgewiesen worden, die unzureichend für eine Partikelbildung war [220]. Core-Protein mit der 17-AS-Deletion von AS 77-93 wurde in *E. coli* allein zwar besser exprimiert, führte aber ebenfalls nicht zur Partikelbildung. Bei Koexpression mit Wt-Core-Protein war jedoch eine deutlich verstärkte Synthese dieses

deletierten Core-Proteins und die Bildung von Mosaikpartikeln aus Homo- und Heterodimeren des Wt- und Varianten-Core-Proteins beobachtet worden [221,222]. Für das Core-Protein mit der 30-AS-Deletion liegen dazu keine Ergebnisse vor. Bei ausreichender Expression wäre durch die Bildung von Heterodimeren und Mosaikpartikeln ein direkter Einfluss des deletierten Core-Proteins auf Verpackung und Replikation denkbar. Ebenso könnte die Anwesenheit von Varianten-Core-Protein die für Wt-HBcAg beschriebene positive Regulation der Cp-Aktivität, die aus seiner Wirkung auf die DNA-Bindung von NF $\kappa$ B resultiert [223], verändern.

In immunzytochemischen Färbungen war das Core-Protein der Varianten des Patienten A ausschließlich im Zytoplasma und im Gegensatz zum Wt-Core-Protein nicht im Zellkern nachweisbar (Abb. 5.7B). Ähnliches wurde bereits nach Transfektion von HuH7- und HepG2-Zellen mit Cp-Punktmutationen (nt 1762/1764) tragenden Varianten beobachtet [224]. Auch in Hepatozyten aus Leberbiopsien war eine vorwiegend zytoplasmatische Verteilung des Core-Proteins signifikant mit dem Auftreten dieser HBV-Varianten assoziiert [224]. Zusätzlich korrelierte die zytoplasmatische HBcAg-Lokalisation in transfizierten Zellen mit der Akkumulation von Mutationen in den B-Zell-Epitopen und dem C-Terminus des Core-Proteins [225]. Mehrere Studien legten eine Verbindung zwischen zytoplasmatischer Core-Protein-Expression und einem schweren Verlauf der Lebererkrankung bzw. zwischen nukleärem HBcAg und geringerem Leberschaden nahe [224,225,226]. Folglich wäre es also denkbar, dass das mutierte, ausschließlich zytoplasmatisch lokalisierte Core-Protein der komplexen Varianten in die Pathogenese involviert ist.

Zusätzlich verursachten sowohl die Variante A-L1k als auch Variante A-S15k, bei der aufgrund zusätzlicher *frameshift*- und Stoppkodon-Mutationen keine Core-Protein-Synthese möglich ist, nach Kotransfektion mit pCore oder dem WtD-Genom anstelle der gleichmäßigen nukleären und zytoplasmatischen Verteilung eine vermehrt perinukleäre Akkumulation des Wt-Core-Proteins. Als Ursache für die veränderte Lokalisation erscheint ein direkter Einfluss des Varianten-Core-Proteins unwahrscheinlich, da sie ebenso, wenn auch in geringerem Maße, bei Variante A-S15k ohne Core-Protein-Expression auftrat. Möglicherweise ist sie auf eine Interaktion des Variantengenoms mit Wt-Core-Protein oder auf eine durch die Variante verursachte Veränderung der Wirtszellphysiologie zurückzuführen. Die genaue Lokalisation des akkumulierten Core-Proteins bleibt unklar. Aufgrund fehlender Kolo-kalisation in den Immunfluoreszenzfärbungen kommen weder das ER noch das Golgi-Kompartiment oder eine Assoziation mit dem F-Aktin des Zytoskeletts, das in den Transport der Core-Partikel involviert sein könnte [227], in Frage. Denkbar ist eine

Assoziation des akkumulierten Core-Proteins mit perinukleären Mikrotubuli. Wie das F-Aktin sind Mikrotubuli Teil des Zytoskeletts und wurden ebenfalls kürzlich mit dem zellulären Transport der Core-Partikel in Verbindung gebracht [228]. Neueste Daten zeigten die Abhängigkeit des mikrotubulären Transports der Core-Partikel von der Phosphorylierung des C-terminalen Core-Proteins und löslichen, zytosolischen Faktoren [228]. Die Varianten könnten somit durch Beeinflussung des Phosphorylierungsstatus des Wt-Core-Proteins und/oder entscheidender Wirtszellfaktoren einen veränderten zellulären Transport bewirken. Die perinukleäre Akkumulation des Core-Proteins hat, wie auch die zytoplasmatische Verteilung des Varianten-Core-Proteins, möglicherweise eine pathogenetische Wirkung auf die Zelle [229] (siehe auch Abschnitt 6.11).

## 6.7 Oberflächen-mRNAs und -Proteine

Besonders auffällig war der starke Defekt der Oberflächenproteinexpression und HBsAg-Sekretion der großen Mehrheit aller komplexen Varianten der beiden Patienten A und B. Ähnliches war auch in der HBsAg-Expression von komplexen Varianten weiterer Patienten mit LZ (C und D) zu beobachten (Ergebnisse nicht gezeigt). Folglich benötigen die meisten komplexen Varianten *in vivo* nicht nur das Core-Protein, sondern auch die Oberflächenproteine des Wt zum Überleben.

Die reduzierten Oberflächenproteine waren zum einen bei vielen Varianten auf eine bereits verminderte Expression der entsprechenden mRNAs zurückzuführen (Abb. 5.6 und 5.17D). Lediglich die Expression der präS1-mRNA der Varianten A-S15k und A-S24k (Variantentyp E) war, im Einklang mit dem nicht vorhandenem Einfluss ihrer Cp-Punktmutationen auf die Oberflächen-mRNAs, unverändert (vgl. Abschnitt 6.3). Die unterschiedlich starke Reduktion der präS1-mRNA bei den übrigen 4 Varianten sowie der präS2/S-mRNA bei allen komplexen Varianten war nur zum Teil eine Konsequenz der Insertion (Variantentyp J: A-S18k, A-L1k) und Deletion (Variantentyp D: B-S7k, B-S8k) im Cp. So wurden die präS2/S-mRNA-Level aller Varianten des Patienten A mit Ausnahme von A-L1k deutlich durch Mutationen außerhalb des Cp und C-Gens beeinflusst (bei A-S18k zusätzlich zur moderaten Hemmung durch die Cp-Insertion). Unabhängig vom Variantentyp und den Cp-Mutationen korreliert die starke Reduktion der präS2/S-mRNA, die zu einem veränderten Verhältnis der beiden Oberflächen-mRNAs zueinander führt, mit dem Vorliegen der Mutation bei nt 3084 (G>A) im S2/S-Promotor. Sie befindet sich in einer Bindungsstelle für Transkriptionsfaktor Sp1 [230]. Diese und weitere, benachbarte Punktmutationen im S2/S-Promotor, von denen bisher keine funktionelle Analyse aus der Literatur bekannt ist, waren

sehr häufig in den komplexen Varianten des Patienten A zu finden (siehe Anhang, Tab. A.1). Bei den komplexen Varianten des Patienten B waren die präS1- und präS2/S-mRNA-Expression gleichermaßen reduziert. Erstaunlicherweise war die Reduktion sowohl bei den komplexen Varianten als auch bei der Cp-Hybridvariante A-Cp-Del stärker als bei den entsprechenden C/Cp-Varianten (Abb. 5.17). Hier bleibt vorerst unklar, ob Mutationen außerhalb von Cp und C-Gen, z. B. im EnhI (nt 1227 T>C), die Expression beeinflussen haben. In den S1- und S2/S-Promotoren direkt liegen meist keine Mutationen vor. Möglicherweise kamen die Auswirkungen der Cp-Deletion auch nur in den C/Cp-Hybridgenomen nicht zum Tragen, waren aber in den komplexen Varianten der Hauptgrund für die Reduktionen.

Zusätzlich zur mRNA-Expression hatten zum anderen weitere Mutationen in den Oberflächengenomen drastischen Einfluss auf die Oberflächenproteinexpression. Diverse Stoppkodonmutationen im präS- oder S-Bereich verhinderten offensichtlich die entsprechende Proteinsynthese (W74\* im S-Bereich bei B-S7k, B-S8k oder W77\* im präS1-Bereich bei A-S15k, A-S18k, A-S24k) oder die HBsAg-Sekretion (L216\* im S-Bereich bei A-S18k, A-S24k). Bei einigen HBV-Genomen des Patienten A verhinderte auch eine präS2-Startkodonmutation die Expression des MHBs (A-S1, A-L6k, A-L8k). Insgesamt war der Defekt der Oberflächenproteinexpression der komplexen Varianten also wesentlich stärker, als die Deletionen und Insertionen in Cp, C-Gen und teilweise präS-Bereich allein bewirkt hätten. Die bei vielen Varianten zusätzlich vorhandenen AS-Austausche (siehe Anhang, Tab. A.1 und A.2) liegen außerhalb der sonst häufig mutierten immundominanten a-Determinante der S-Region (AS 120–147) und wurden bisher nicht funktionell analysiert.

Die Oberflächenproteine der Variante A-L1k und des Wt-ähnlichen Genoms A-S1 zeigten eine aberrante, perinukleäre Lokalisation, die sehr an das Bild im ER zurückgehaltener Proteine erinnert [160,231,232]. Bei A-S1 ging die Akkumulation im ER mit einer deutlichen, bei A-L1k mit einer schwachen Hemmung der HBsAg-Sekretion einher. Beide Genome tragen keine der Deletionen in der präS1-Region oder der Punktmutationen in der S-Domäne, die bekanntermaßen mit einer Retention der Oberflächenproteine im ER assoziiert sind [160,169,231,232,233].

Im Fall der komplexen Variante A-L1k könnte die 2-AS-Deletion im präS2-Bereich (AS 140–141) für die veränderte Lokalisation verantwortlich sein. Für Varianten mit größeren Deletionen in der zentralen präS-Region (AS 127–141 und 131–141) wurde bereits eine ähnliche Akkumulation der Oberflächenproteine beschrieben [234]. Auch hier wurde nur ein geringer reduzierender Effekt auf die HBsAg-Sekretion beobachtet. Als Ursache wurde anstatt der verminderten Sekretion z. B. über eine veränderte Transportroute des mutierten

MHBs spekuliert. Da die perinukleäre Akkumulation der Oberflächenproteine bei A-L1k auch nach Kotransfektion der Variante mit pCore zu beobachten war, hat sie offensichtlich nichts mit dem Fehlen von funktionellem Core-Protein oder intrazellulärer Replikation zu tun.

Der Grund für die Retention bei A-S1 ist völlig unklar. Die aufgrund der Startkodonmutation fehlende MHBs-Expression sollte dafür nicht verantwortlich sein, da in einer früheren Studie bei Abwesenheit von MHBs in HuH7-Zellen keine Veränderungen in Morphologie, Proteinsekretion, Replikation und Infektiosität der Virusvarianten festgestellt wurden [78].

Der Nachweis von teilweise stark reduzierten HBsAg-Mengen im Zellkulturüberstand für die Wt-ähnlichen Genome des Patienten B (B-S1, B-S3, Abb. 5.3) bei einer gleichzeitig normalen intrazellulären Expression aller Oberflächenproteine (inklusive MHBs, nicht gezeigt) deutet auf eine ähnliche Retention der Oberflächenproteine wie bei A-S1 hin. Auch bei weiteren Varianten des Patienten A mit reduzierten HBsAg-Werten im Zellkulturüberstand und präS2-Deletionen ohne zusätzliche Stoppkodonmutationen (A-S4, A-S7, A-L3k) ist denkbar, dass sie eine aberrante Lokalisation der Oberflächenproteine zeigen. Die möglichen Konsequenzen für die Pathogenese werden in Abschnitt 6.11 diskutiert.

## 6.8 Replikation

Die Replikationsanalysen der komplexen Varianten wurden nach Kotransfektion mit Core-Expressionsplasmid pCore oder mit dem WtD-Referenz-Genom durchgeführt. Wie bereits früher für Hybridgenome mit C-Gendeletion gezeigt [188], war das Core-Protein des Genotyps D zur Komplementation des defekten Cores der Varianten in der Lage und ermöglichte somit die Replikation der Variantengenome. Auch lieferte das WtD-Genom ausreichend Core-Protein zur gleichzeitigen Replikation von Wt und Varianten. Daher stellt die Kotransfektion von WtD und Varianten ein gutes Modell für die Koreplikation beider Genome in einer Zelle dar. Darüber hinaus gestattet sie eine leichte Unterscheidung von Wt- und Varianten-Nachkommen-DNA anhand eines Genotyp-spezifischen Nukleotidaustausches. Wie nach Kotransfektion des WtD-Genoms mit komplexen Varianten, wurde eine Anreicherung der komplexen Variante auch nach Kotransfektion des WtA-Genoms mit Variante B-S6k beobachtet, die an der analysierten Position das Genotyp-D-typische Nukleotid trägt. Verstärkte Replikation und Anreicherung der Varianten sollten daher nicht spezifisch für die Komplementation durch ein WtD-Genom sein. Die Akkumulation der komplexen Varianten *in vivo* spricht auch für die Übertragbarkeit der *in-vitro*-Ergebnisse auf das Geschehen im Patienten.

Die Differenzierung von Wt- und Varianten-DNA ist ein essentieller Teil und Voraussetzung

für die eingehende Analyse von Replikation und Wt-Varianten-Interaktion während der Koreplikation. In früheren Studien wurde diese Aufgabe durch 3-malige Hybridisierung der selben Southern-Blot-Membran mit verschiedenen spezifischen Sonden [189] oder durch ein Assay gelöst, das einen Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus zwischen Wt und Varianten nutzt [188]. Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte und verwendete SNP-Analyse mittels Pyrosequenzierung hat gegenüber diesen anderen Methoden entscheidende Vorteile. Sie liefert sehr präzise Ergebnisse mit nur sehr geringen Standardabweichungen und erlaubt die Analyse vieler Proben in nur kurzer Zeit. Außerdem war zusätzlich die Untersuchung der Anteile von Wt und Variante an der verpackten pgRNA möglich.

Alle komplexen Varianten zeigten eine gegenüber Wt-HBV verstärkte Replikation und Anreicherung der replikativen Intermediate. Es bestanden jedoch auch deutliche Unterschiede, z. B. im Ausmaß der verstärkten Replikation und Anreicherung sowie in der Unterdrückung der Wt-Replikation. Auch auf der Ebene der Replikation ist der Phänotyp der Varianten daher vielschichtiger, als die bisherigen Studien mit einzelnen mutierten Cp- oder C-Gen-Abschnitten im Wt-Kontext hätten vermuten lassen.

### *6.8.1 Rolle von Mutationen in Cp, C-Gen und im restlichen Genom*

Wie erwartet, waren die Mutationen in Cp- und C-Gen allein ausreichend für eine verstärkte Replikation und Anreicherung der jeweiligen HBV-Hybridvarianten. Das in dieser Arbeit beobachtete Replikationsverhalten der Cp- und C-Gen-Hybridgenome steht somit im Einklang mit den Ergebnissen vorangegangener Studien [156,157,188,189,192,216]. Entsprechend der Bindungskraft der neu geschaffenen HNF1-Bindungsstelle [156,157,235], war die Replikation der Cp-Variante mit Insertion am stärksten (A-L1k-Cp) und die der Cp-Variante mit den Punktmutationen bei nt 1762/1764 (A-S15k-Cp) im Vergleich zum Wt nur schwach erhöht. Auch das Ausmaß der erhöhten Replikation der C-Gen-Hybridvariante mit 30-AS-Deletion des Patienten A entsprach dem eines Hybridgenoms mit einer ähnlichen 30-AS-Deletion der Positionen 88–117 (2,5fach) [188].

Die Kombination der Mutationen auf einem Genom (C/Cp) führte ebenfalls zu erhöhter Replikation und Anreicherung. Deren Größenordnung korrelierte bei den C/Cp-Genomen mit der Art der Cp-Mutation bzw. der Replikationsstärke der entsprechenden Cp-Variante. Dennoch erreichte bei Variante A-L1k die Summe der Replikationsvorteile durch Cp-Mutation und C-Gen-Deletion allein nicht das Ausmaß der C/Cp-Variante mit den Mutationen in beiden Regionen. Auch war die maximale Replikation der C/Cp-Varianten (und der komplexen Varianten) bzw. des gesamten Gemisches mit Wt je nach Variante bei

unterschiedlichen Kotransfektionsverhältnissen zu finden. Im Gegensatz dazu fand die optimale Replikation und Anreicherung von verschiedenen C-Gendeletions-Hybridvarianten immer bei einem transfizierten Variante-Wt-Verhältnis von 20:80 statt (Referenz [188] und Abb. 5.16). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass noch andere Faktoren als die bisher für Cp- und C-Gendeletions-Varianten diskutierten am Replikationsvorteil der Varianten mit mehrfachen Mutationen beteiligt sein könnten.

Die komplexen Varianten, insbesondere des Patienten A, zeigten im Ausmaß des Replikationsvorteils, dem Verhältnis mit maximaler Replikation und der Interaktion mit dem Wt ein weiter verändertes Replikationsmuster im Vergleich zu den entsprechenden C/Cp-Varianten. Daher spielten auch Mutationen außerhalb von Cp und C-Gen eine entscheidende Rolle für die Replikation. Meist hatten sie positive (A-S15k, A-S24k, A-L1k), und nur bei A-S18k auch negative Auswirkungen. Insgesamt demonstrieren die Analysen, dass die Ergebnisse der Hybridvarianten nur eingeschränkt auf die natürlichen Varianten mit komplexen Mutationsmustern übertragbar sind.

Besonders deutlich war der Effekt der Mutationen außerhalb von Cp und C-Gen bei Variante A-L1k. Sie wies eine extrem starke Replikation jenseits aller anderen komplexen oder Hybridvarianten auf, während die Replikationskapazität der C/Cp-Variante A-L1k-C/Cp der von A-S18k-C/Cp mit identischer Cp-Mutation und C-Gendeletion entsprach. Die im Vergleich zum WtD über 13fach erhöhte Replikationseffizienz und Anreicherung von A-L1k betrug etwa das doppelte bzw. 3fache der entsprechenden C/Cp-Variante und das ca. 5fache der C-Gen-Hybridvariante. Während die Anreicherung bei den anderen komplexen Varianten und den früher analysierten C-Gen-Hybridvarianten weitgehend unabhängig vom transfizierten Variantenanteil war [188], führte die außergewöhnliche Replikationseffizienz von A-L1k sowohl in HuH7- als auch in HepG2-Zellen zu einem Abfall der Anreicherung bei einem transfizierten Variantenanteil von 50 % oder mehr. Offensichtlich war nur bei einem hohen Wt-Anteil die Wt-Proteinexpression ausreichend, um den großen Bedarf der Variante A-L1k zu decken. Der Grund für dieses Phänomen ist unklar, sollte jedoch auf Mutationen auf dem A-L1k-Genom zurückzuführen sein, die weder in der C/Cp-Variante noch in anderen komplexen Varianten vorhanden sind. Dazu gehören eine Punktmutation in der RNaseH-Domäne der Polymerase (R741W) und 3 Nukleotidaustausche (957 T>G, 1425 T>C, 2636 A>G), die nicht in AS-Austauschen resultieren und außerhalb aller bisher bekannten regulatorischen Sequenzen liegen. Des Weiteren trägt A-L1k, im Gegensatz zu allen anderen analysierten Patienten-HBV-Genomen, ein Cystein anstatt eines Tyrosins an AS-Position 6 des X-Proteins in dessen negativ regulierender Domäne [236]. Bislang wurde jedoch keine

dieser Variationen mit einer erhöhten Replikation in Verbindung gebracht.

Im Fall der Variante A-S24k waren die Mutationen außerhalb von Cp und C-Gen u. a. in der Lage, das Überwachsen der C/Cp-Variante durch den Wt zu kompensieren. Dabei könnte z. B. der Nukleotidaustausch bei nt 1034 (A>G) im modulatorischen Element des EnhI die Replikation der komplexen Variante gefördert haben (zur Struktur des EnhI siehe Referenz [5]). Der Replikationsnachteil der C/Cp-Variante hängt möglicherweise mit den im Vergleich zu A-S15k zusätzlich vorhandenen Cp-Mutationen bei nt 1753 und 1767 und/oder einzelnen AS-Austauschen im Core-Protein bei AS 46 und 59 zusammen.

Allein bei der komplexen Variante A-S18k hatten Mutationen außerhalb von Cp und C-Gen offensichtlich einen replikationshemmenden Effekt. Hier kommen Nukleotidaustausche an Position 1135 in der Core-Domäne des EnhI und an Position 1374 im PRE oder AS-Austausche in der Reversen Transkriptase (L430R) und im terminalen Protein (T120I) des Polymerase-Proteins in Frage, die jedoch bisher nicht getestet wurden. Außerdem fehlte der komplexen Variante aufgrund einer Startkodonmutation komplett die Expression des X-Proteins. Die potentiellen Auswirkungen dieses Defekts auf die Replikation werden auch im Zusammenhang mit dem Phänotyp in HepG2-Zellen in Abschnitt 6.8.3 diskutiert.

Die Varianten des Patienten B zeigten kaum Unterschiede im Replikationsverhalten zwischen den komplexen und C/Cp-Genomen, so dass die wenigen außerhalb von Cp und C-Gen liegenden Mutationen hier offensichtlich kaum eine Rolle spielten (vgl. auch Abschnitt 6.12).

Variante A-S15k ist ein Beispiel einer natürlich aufgetretenen *out-of-frame* C-Gendeletionsvariante, die das deletierte Core-Protein aufgrund der *frameshift*- und Stoppkodon-Mutation nicht exprimiert. Die Tatsache, dass sie trotzdem eine klar erhöhte Replikation, Anreicherung und Unterdrückung der WtD-Replikation zeigte, bestätigt frühere Ergebnisse mit einer künstlich generierten *out-of-frame* Hybrid-Deletionsvariante [237]. Das Core-Protein mit Deletion sollte daher nicht für Replikationsvorteil und Wt-Unterdrückung entscheidend sein.

### 6.8.2 Interaktion mit Wt-HBV

Wie bereits erwähnt, wiesen frühere funktionelle Kotransfektionsstudien von Wt und Hybridgenomen mit C-Gendeletionen und Punktmutationen im Cp bei nt 1762/1764 parallel zur Anreicherung der Variante grundsätzlich eine starke Unterdrückung der Wt-Replikation nach. Daraus schlossen die Autoren, dass sich Varianten mit internen C-Gendeletionen wie defekte interferierende Partikel verhalten [189]. Detailliertere Kotransfektionsanalysen von Hybridgenomen mit erhöhter Replikation und Anreicherung, die ausschließlich verschiedene

andere C-Gendeletionen trugen, zeigten dagegen die Unterdrückung des Wt-Genoms nur bei hohem Anteil an transfizierter Varianten-DNA [188]. Dasselbe war in der vorliegenden Arbeit bei der C-Gen-Hybridvariante A-L1k-C zu beobachten, allerdings mit einer ausgeprägteren Wt-Hemmung bei gleicher Replikationsstärke.

Interessanterweise unterdrückten jedoch nur 2 von 6 der komplexen Varianten (A-S15k und A-L1k) mit besonders starker Replikation den Wt bei hohem transfizierten Variantenanteil (in HepG2-Zellen sogar nur A-L1k). Bei den übrigen komplexen Varianten zeigten sich entweder keine Auswirkungen auf die Wt-Replikation (A-S18k) oder sogar deren Förderung (A-S24k, B-S7k, B-S8k). Daher können die Ergebnisse der C-Gen-Hybridvarianten und das Konzept der defekten interferierenden Partikel nicht ohne weiteres auf die komplexen Varianten mit zusätzlichen Deletionen/Insertionen im Cp, teilweise Deletionen im präS-Bereich und weiteren Punktmutationen im gesamten Genom übertragen werden. Außerdem legt die auch in der Koreplikation mit den verschiedenen Variantenpools fehlende Unterdrückung des Wt nahe, dass diese eher die Ausnahme als die Regel ist und im Kontext der gesamten Population nicht zum Tragen kommt.

Auch die Kotransfektion mit C/Cp-Genomen führte mit Ausnahme der Hybridvariante A-S15k-C/Cp nicht zur Hemmung des Wt. Folglich sind Anreicherung und Hemmung des Wt sowohl bei komplexen als auch bei C/Cp-Varianten keine gekoppelten Prozesse. Vielmehr scheint die zusätzliche Anwesenheit der Cp-Mutationen zu den C-Gendeletionen eine Senkung oder sogar Aufhebung der Konkurrenz zwischen Varianten- und Wt-Replikation sowie teilweise eine Förderung der Wt-Replikation bei hohen Variantenkonzentrationen zu bewirken.

Im Falle der Hybridvarianten mit C-Gendeletion wurde das Wt-Core-Protein als der limitierende Faktor der verstärkten Replikation vermutet [188]. Unterstrichen wurde die Verknüpfung von Wt-Core-Proteinmenge und Replikationsstärke der Hybridvariante durch die gute Korrelation zwischen dem Ausmaß ihrer Anreicherung gegenüber Wt-HBV und der Replikationsstärke nach Komplementation der Hybridvariante mit dem Core-Expressionsplasmid pCore. Diese Korrelation war weder für die komplexen Varianten (Abb. 5.10) noch für die C/Cp-Varianten (Ergebnisse nicht gezeigt) zu finden. Demzufolge ist hier das Wt-Core-Protein nicht der einzige limitierende und regulierende Faktor. Denkbar ist, dass weitere Wt-Proteine, wie das X-Protein oder die Oberflächenproteine mit transaktivierender Aktivität, während der Koreplikation einen Einfluss auf die Replikation und Anreicherung der Varianten haben.

Eine mögliche Ursache für die weniger kompetitive Replikation der komplexen und C/Cp-

Varianten mit Wt könnte in der veränderten Bindung von Transkriptionsfaktoren durch den mutierten Cp liegen. Die Aktivität des Cp wird auf komplizierte Weise durch verschiedenste Transkriptionsfaktoren reguliert, die mehrere Bindestellen im EnhII/Cp haben [5] (z. B. COUP-TF, HNF4, PPAR-RXR, Sp1, vgl Abschnitt 1.1.3 und Abb. 1.5). Mutationen in diesem Bereich verändern dramatisch die Reaktion des Virus auf bestimmte Transkriptionsfaktoren. Alle Cp-Mutationen der in dieser Arbeit getesteten Varianten schaffen nicht nur neue HNF1-Bindungsstellen, sondern verhindern wahrscheinlich gleichzeitig die Bindung anderer Transkriptionsfaktoren. Die Deletion der nt 1763–1770 sollte die Bindestellen diverser Kernfaktoren wie PPAR-RXR, COUP-TF und HNF4 zerstören, während die Punktmutationen bei nt 1762/1764 erwiesenermaßen die Bindung von PPARalpha-RXR, aber nicht die von HNF4 verhindern [235]. Außerdem ist anzunehmen, dass die 11-nt-Insertion bei nt 1776/1777 durch bevorzugte Bindung von HNF1 an den starken, neuen HNF1-Bindungsstelle die Bindung anderer Faktoren in der Nähe sterisch blockiert. Die im Detail variierenden Auswirkungen der einzelnen Mutationen auf die Bindungseigenschaften des Cp könnten das unterschiedliche Ausmaß der Verminderung der Wt-Hemmung bei den verschiedenen C/Cp-Varianten im Vergleich zur C-Gen-Hybridvariante erklären. So war die Hemmung bei A-S15k-C/Cp mit den Punktmutationen 1762/1764 noch am stärksten, während sie bei den C/Cp-Varianten von A-S24k, B-S7k und B-S8k gar nicht mehr vorhanden war.

Das Phänomen einer erhöhten Wt-Replikation parallel zur verstärkten Variantenreplikation bei hohem transfizierten Anteil verschiedener komplexer und C/Cp-Varianten (z. B. B-S7 und B-S8) ließe sich nachvollziehen, wenn man annimmt, dass generell auch die limitierte Verfügbarkeit bestimmter Transkriptionsfaktoren die HBV-Replikation einschränkt. In diesem Fall ließe die Bindung anderer zellulärer Faktoren durch den Varianten-Cp auch eine vermehrte Stimulation des Wt-Cp, z. B. durch PPARalpha-RXR, zu. Dies zöge eine erhöhte Expression der Wt-pgRNA, und damit auch eine erhöhte Wt-Core-Expression und Replikation nach sich. Und die vermehrte Wt-Core-Proteinexpression würde wiederum eine stärkere Variantenreplikation erlauben.

Am deutlichsten war die Förderung der Wt-Replikation bei Variante A-S24k-C/Cp, die trotz erhöhter Variantenreplikation in einer Anreicherung des Wt resultierte. Dies könnte eine Folge der beiden Nukleotidaustausche bei nt 1753 und 1767 zusätzlich zu den 1762/1764-Mutationen im Cp sein, die die Bindung der Transkriptionsfaktoren möglicherweise stärker verändern als die 1762/1764-Mutationen allein. Der Wt-Cp könnte somit besonders stark durch solche Faktoren aktiviert worden sein, die nicht mehr von der Variante gebunden

wurden. Allerdings war der drastische Effekt, wie bereits erwähnt, in der komplexen Variante A-S24k nicht mehr zu beobachten. Letztendlich bleiben die Hypothesen zu den Auswirkungen der Bindung verschiedener Transkriptionsfaktoren im Cp auf die Koreplikation von Wt- und Varianten noch zu überprüfen.

In den Patienten könnten die Varianten durch die nicht vorhandene Hemmung der Wt-Replikation und teilweise gleichzeitig verstärkte Wt- und Variantenreplikation ein Gleichgewicht mit dem Wt erreichen, das die notwendige Komplementation durch Wt-Proteine auch bei starker Variantenreplikation und hohen Variantenanteilen in der HBV-Population ermöglicht. Die *in-vitro*-Daten der dadurch auch bei hohem Variantenanteil noch starken Gesamtreplikation stehen im Einklang mit der Tatsache, dass die Viruslast in den Patienten während der Akkumulation der komplexen Varianten nur leicht abnahm [134]. Außerdem ersetzen die komplexen Varianten den Wt in den Patienten niemals komplett, obwohl ihre Anreicherung *in vitro* meist unabhängig vom transfizierten Variantenanteil war. Die Kombination von Cp-Mutationen und C-Gendeletionen ist möglicherweise eine Voraussetzung für die Persistenz der komplexen Varianten, ohne den Wt zu eliminieren. Diese Vermutung stimmt mit der Beobachtung überein, dass die komplexen Varianten mit C-Gendeletion immer erst auftraten, wenn bereits Genome mit ausschließlich Cp-Mutationen vorhanden waren [134]. Bestätigen lassen sich diese Hypothesen jedoch nur durch Experimente im *in-vivo*-System.

### 6.8.3 Unterschiede der Replikation in HuH7- und HepG2-Zellen

Das Phänomen der verstärkten Replikation und Anreicherung der komplexen Varianten wurde in 2 verschiedenen Hepatomazelllinien, HuH7 und HepG2, beobachtet. Es ist somit unabhängig von Wirtszellfaktoren, die nur für eine der beiden Zelllinien spezifisch sind. Auffällig war jedoch, dass bei der Koreplikation die Level der replikativen Intermediate von Wt und Varianten im Vergleich zum Wt alleine in HepG2-Zellen meist höher waren als in HuH7-Zellen (einzige Ausnahme: A-S18k mit extrem schwacher Replikation in den HepG2-Zellen). Dabei erfolgte überwiegend eine stärkere Anreicherung der Varianten ohne Unterdrückung des Wt. Eine analoge erhöhte Anreicherung in HepG2- im Vergleich zu HuH7-Zellen war bereits bei Hybridvarianten mit C-Gendeletionen nachgewiesen worden [189].

Für Abweichungen in den beiden Zelllinien könnten u. a. Unterschiede in den Konzentrationen bestimmter Wirtszellfaktoren eine Rolle spielen, die z. B. vom Differenzierungsgrad der Zellen abhängen [238]. Der Einfluss dieser Unterschiede auf die

Regulierung der Cp-Aktivität wurde bereits nachgewiesen [47]. Nach einer Hypothese von Suk *et al.* ist die von einem Hepatoblastom abstammende Zelllinie HepG2 noch stärker differenziert als die von einem hepatozellulären Karzinom abgeleitete HuH7-Zelllinie und weist daher höhere Konzentrationen an bestimmten, für die HBV-Replikation wichtigen Wirtszellfaktoren auf [239]. Je nach Variante könnte dies zum Replikationsvor- oder -nachteil gegenüber dem Wt werden.

Zum Beispiel scheint der Transkriptionsfaktor PPARalpha in größeren Mengen in HepG2-Zellen vorzuliegen [240]. In Kombination mit dem Faktor RXR fördert er bevorzugt die pgRNA-Synthese und somit Replikation des Wt im Vergleich zur 1762/1764-Cp-Variante [235], die kein PPARalpha-RXR binden kann [235,240]. Dagegen unterstützt der Transkriptionsfaktor HNF4 bevorzugt die Replikation dieser Variante [235]. Somit ist denkbar, dass die ebenfalls in HepG2-Zellen nachgewiesenen höheren Level an HNF4 und auch HNF1 (M. Quasdorff, U. Protzer, Universität Köln, persönliche Mitteilung) zur stärkeren Replikation und Anreicherung der komplexen Varianten beigetragen haben. Auf diese Weise und durch eine potentiell höhere Konzentration an Transkriptionsfaktoren, die sowohl für die Wt- als auch für die Variantenreplikation wichtig sind, ließen sich die verminderte Konkurrenz, die generell höhere Replikation und die erhöhte Anreicherung der Varianten erklären, die bei den meisten Wt/Variante-Kombinationen in HepG2-Zellen beobachtet wurden (vgl. auch Abschnitt 6.8.2). Auch für die Situation *in vivo* kann spekuliert werden, dass eine sich verändernde Zusammensetzung an zellulären Faktoren in der Leber der Nierentransplantierten die Selektion und Akkumulation der komplexen Varianten unterstützt.

Die in HepG2-Zellen erhöhte Replikation beider Genome und die verminderte Konkurrenz im Vergleich zu HuH7-Zellen war besonders deutlich nach Kotransfektion von WtD und der Variante A-S15k, die aufgrund der 1762/1764-Mutationen im Cp weder PPARalpha-RXR noch COUP-TF1 binden kann [235,240]. Dagegen zeigten sich bei der sehr hoch replizierenden Variante A-L1k mit starker Wt-Hemmung nur geringe Unterschiede zwischen den Zelllinien. Offensichtlich liegt diese extreme Varianten-Replikation auch in HepG2-Zellen weit über der Schwelle für eine gleichberechtigte Koreplikation mit dem Wt, so dass möglicherweise eine weitere Steigerung nicht erfolgen konnte.

Neben dem Effekt durch zelluläre Faktoren kann auch die Expression des X-Proteins Einfluss auf die Replikationsunterschiede in HepG2 und HuH7-Zellen gehabt haben. Es wurde mehrfach gezeigt, dass das HBx die HBV-Replikation in HepG2-Zellen [96,97,98], aber nicht in HuH7-Zellen [97,241] stimuliert. Für diesen Effekt ist eine funktionierende transkriptionelle Transaktivierung, u. a. durch die C-terminale Region des HBx, notwendig

[242]. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit der in HepG2-Zellen deutlich verstärkten Replikation und Anreicherung der Varianten A-S15k und A-S24k, die ein komplettes, funktionelles HBx exprimieren, und der kaum stärkeren Replikation der Variante A-L1k, die aufgrund der 11-nt-Insertion bei nt 1776/1777 ein C-terminal trunkiertes X-Protein mit einer zerstörten Transaktivierungsdomäne produziert. Außerdem legen sie nahe, dass die extrem niedrige Replikation der Variante A-S18k in HepG2-Zellen auf das vollständige Fehlen der HBx-Expression aufgrund einer X-Startkodonmutation zurückzuführen ist. Die Schlussfolgerungen setzen allerdings voraus, dass während der Koreplikation keine nennenswerte Komplementation durch das HBx des Wt erfolgt. Möglicherweise reichte die Menge des Wt-HBx dafür nicht aus, oder es ist nicht zur Stimulation des Variantengenoms in der Lage.

#### 6.8.4 Replikation von Variantenpools

Im Patienten sind phänotypische Ausprägungen einzelner Varianten nur dann entscheidend, wenn sie sich auch im Kontext der gesamten HBV-Population zeigen. Daher wurden Mischungen von Varianten zusammen mit WtD transfiziert, die in ihrer Zusammensetzung der zu einem bestimmten Zeitpunkt im Patienten vorhandenen Viruspopulation entsprechen und so die Quasispezies simulieren sollten. Trotz des teilweise sehr heterogenen Replikationsmusters der einzelnen Varianten eines Zeitpunktes war bei allen Variantenpools eine erhöhte Replikation und Anreicherung gegenüber Wt-HBV ohne Unterdrückung der Wt-Replikation zu beobachten. Die replikativen Eigenschaften der komplexen Varianten und der gesamten Variantenpools stehen daher im Einklang mit der *in vivo* beobachteten Akkumulation der komplexen Varianten.

Interessanterweise kam es, im Gegensatz zu den Einzelanalysen der Varianten, zu einer verstärkten Anreicherung der Variantenpools bei einem höheren Variantenanteil im transfizierten DNA-Gemisch. Dies deutet darauf hin, dass im Patienten auch im späten Stadium der Erkrankung bei sinkendem Wt-Anteil noch eine Anreicherung dieser Quasispezies möglich war. Diese Beobachtung unterstützt umso mehr die bereits für die Einzelvarianten aufgestellte Hypothese, dass es den komplexen Varianten gelingt, durch Aufrechterhaltung der Wt-Replikation und -Komplementation den eigenen Anteil ohne Nachteil für die Variantenreplikation möglichst weit zu steigern (Abschnitt 6.8.2). Der Grund für die besonders hohe Replikation und Anreicherung der aus der zirrhotischen Leber des Patienten A isolierten Variantenpopulation (und der Einzelvarianten) verbleibt unklar.

Über funktionelle Analysen von gesamten HBV-Populationen liegen bisher nur wenige

publizierte Daten vor [197,199,243]. Für die vermutlich einzige größere Untersuchung mit einer umfassenden funktionellen Charakterisierung wurden Gesamtgenom-PCR-Amplifikate der HBV-DNA aus Patientenserum ohne vorherige Klonierung direkt sequenziert und transfiziert [197]. Zwar ermöglichte diese Studie Aussagen über die phänotypischen Eigenschaften der HBV-Populationen, die Sequenzierung lieferte jedoch keine genauen Daten zur Anordnung von Mutationen auf einzelnen Genomen. Auch sollten unterrepräsentierte Varianten von dieser Art der Sequenzierung nicht erfasst werden. Ebenso waren ohne Klonierung parallel keine Einzelanalysen des Phänotyps bestimmter Varianten der Population mit definiertem Mutationsmuster möglich. Zur umfangreichen phänotypischen Charakterisierung von zu einem bestimmten Zeitpunkt vorliegenden Quasispezies erscheint daher der in dieser Arbeit gewählte Ansatz die klarsten Aussagen zu erlauben.

#### *6.8.5 Mechanismus der verstärkten Replikation und Anreicherung*

Obwohl die komplexen Varianten gesteigerte Level an pgRNA im Zytoplasma aufwiesen, war nach Kotransfektion mit WtD der Anteil des Varianten-Prägenoms in Core-Partikeln gegenüber dem transfizierten Anteil nicht klar erhöht. Die Anreicherung der replikativen Intermediate der Varianten resultiert also nicht aus einer bereits angereicherten verpackten pgRNA, sondern offensichtlich aus deren verstärkter reverser Transkription. Zum einen steht dies im Gegensatz zu einer einzelnen Studie, die über eine erhöhte Verpackung von pgRNA mit den 1762/1764-Punktmutationen im Cp berichtete [216]. Zum anderen stehen die Daten aber im Einklang mit einer der Hypothesen, die für eine erhöhte Replikation von Varianten mit C-Gendeletion geäußert wurde und von einer verstärkten reversen Transkription der Varianten-RNA ausgeht [188].

Da die erhöhte zytoplasmatische Expression der Varianten-pgRNA sich nicht in einem erhöhten Anteil in den Core-Partikeln niederschlug, wird die Varianten-pgRNA möglicherweise sogar schlechter verpackt als das Wt-Prägenom. Aufgrund der verstärkten reversen Transkription wird dies jedoch nicht zum Replikationsnachteil. Um jedoch mit Sicherheit eine schlechtere Verpackung festzustellen, wären ausführlichere Untersuchungen zum Anteil der Varianten-pgRNA im Kern, im Zytoplasma und in den Core-Partikeln notwendig. Möglicherweise ist der höchstens 2fache Anstieg der pgRNA-Expression im Vergleich zu den Referenz-Wt-Genomen auch nur zu gering, um sich in der verpackten RNA deutlich zu zeigen.

Als Ursache für die gesteigerte reverse Transkription der Varianten kommt die schnellere Umschreibung des durch Deletionen verkürzten Varianten-Prägenoms allein nicht in Frage,

da erhebliche Unterschiede in der Replikationsstärke von Genomen mit identischen Deletionen vorlagen. Zusätzlich könnte eine erhöhte Expression der Varianten-Polymerase dazu beitragen. Diese ist bei den komplexen Varianten zum einen aufgrund der insgesamt erhöhten pgRNA-Level und zum anderen aufgrund der C-Gendeletionen zu erwarten, die 2 stromaufwärts des Polymerase-ATGs gelegene ATGs (J-ATG und C2-ATG) eliminieren, welche die Polymerase-Translation aufgrund des Ribosomen-*Scanning*-Mechanismus hemmen [244]. Bei Hybridgenomen mit den entsprechenden Cp-Mutationen sind bereits erhöhte Polymerase-Level nachgewiesen worden [157]. Da die Polymerase vorwiegend in *cis* agiert, würden sich jegliche Veränderungen der Varianten-Polymerase spezifisch auf die Replikation der Varianten auswirken. Zwar wurde eine theoretisch bei erhöhter Polymerase-Expression mögliche vermehrte Verpackung der pgRNA komplexer Varianten nicht nachgewiesen, jedoch liegen in der Literatur Hinweise auf eine über die direkte reverse Transkription hinausgehende Funktion einer zytoplasmatischen, nicht verpackten Form der Polymerase vor [245], die eine Rolle für die erhöhte Varianten-Replikation und/oder Pathogenese spielen könnte.

Unabhängig von verstärkter Expression ist auch denkbar, dass die mutierte pgRNA durch eine veränderte Konformation während der Replikation effektivere Primertranslokationen oder Matrizenwechsel der Polymerase ermöglicht (vgl. Abschnitt 1.1.2 und Abb. 1.4). Oder die in allen Domänen des Polymerase-Proteins vorhandenen AS-Austausche der Varianten, wie z. B. F8L im terminalen Protein, I401F/V in der Reversen Transkriptase oder S800Y in der RNaseH, könnten zu dessen erhöhter Affinität oder Aktivität führen. Leider wurde keiner dieser Austausche bisher funktionell untersucht. Möglicherweise werden aber auch mit dem Prägenom und der Polymerase der Varianten für die Replikation wichtige Kofaktoren, wie z. B. Kinasen, Hsp90 oder Hsp60, in veränderter Weise verpackt, so dass diese für eine schnellere reverse Transkription sorgen.

## 6.9 Virus im Zellkulturüberstand

Die Analysen von PCR und Pyrosequenzierung mit HBV-DNA aus extrazellulären viralen Partikeln demonstrierten, dass die Variantengenome nach Kotransfektion mit WtD aus den Zellen ausgeschleust wurden und meist eine Anreicherung zeigten, die nur wenig schwächer war als in den zytoplasmatischen Core-Partikeln. Somit war auch *in vitro* die Basis für die im Patienten erfolgte Akkumulation der komplexen Varianten zu erkennen. Aufgrund ihres breiten Oberflächenproteindefekts ist davon auszugehen, dass die meisten Varianten zur Bildung infektiöser Viruspartikel nicht nur das Core-Protein, sondern auch die

Oberflächenproteine des Wt benötigen. Bei einer anderen Variante mit mutierten Oberflächenproteinen und erhöhter Replikation wurde bereits nachgewiesen, dass schon die Anwesenheit von nur wenig Wt-HBV ihren Sekretionsdefekt aufhob und ihre Anreicherung erlaubte [246].

Erstaunlicherweise wurden jedoch auch nach Kotransfektion von Varianten-DNA mit pCore bei allen Varianten Partikel-assoziierte Varianten-Genome im Medium detektiert. Da bei den Varianten A-S18k und A-S24k intrazellulär nur wenig trunkiertes SHBs und im Zellkulturüberstand gar kein HBsAg nachweisbar war, wurden die Genome hier wahrscheinlich in nackten, nicht umhüllten Core-Partikeln aus der Zelle freigesetzt. Auch der Nachweis von aus dem Medium aufgereinigten viralen Partikeln mit Antikörpern gegen Core-Protein nach Transfektion von WtD und WtA zeigte, dass eine kleine Fraktion der extrazellulären Partikel nicht umhüllt war. Das Phänomen der Ausschleusung nackter Core-Partikel aus HuH7-Zellen, unabhängig von der Art des transfizierten Genoms, wurde bereits von anderen Gruppen beschrieben [160,192]. Bei einigen Varianten (z. B. mit verschiedenen Punktmutationen im Cp oder S-Gen) mit herabgesetzter Sekretion der umhüllten Viria war der Anteil der nackten Partikel im Vergleich zum Wt stark erhöht [160,192]. *In vivo* wurden im Serum jedoch bisher keine nackten Core-Partikel gefunden [247]. Daher handelt es sich vermutlich um eine Besonderheit des *in-vitro*-Zellkultursystems bzw. der HuH7-Zelle. Dabei ist nach wie vor unklar, ob die Freisetzung durch einen spezifischen Mechanismus oder einfach durch Zelltod erfolgt.

## **6.10 Auswirkungen auf das Spleißen**

Die große Mehrheit der komplexen Varianten (82 %) einer Gruppe von 5 Patienten zeigte im Vergleich zu Wt-Genomen und den Wt-ähnlichen Klonen eine starke Reduktion der häufigsten gespleißten pgRNA, SP1. In der Folge waren auch die von der SP1-RNA revers transkribierten replikativen Intermediate extrem vermindert. Dies ist der erste Nachweis eines veränderten Spleißmusters bei natürlich auftretenden, im Patienten selektierten HBV-Varianten.

Interessanterweise lagen replikative DNA-Intermediate von 2 seltenen, alternativen Spleißprodukten, SP9 und SP11, in unverändertem Maße bei den komplexen Varianten vor.

### *6.10.1 Molekulare Ursachen*

Um den molekularen Ursachen der reduzierten SP1-RNA auf die Spur zu kommen, wurden die kompletten Sequenzen aller getesteten Genome auf auffällige Mutationen hin untersucht

(Darstellung der Mutationen im Anhang Abb. A.1). Allgemein für das Spleißen essentielle Sequenzelemente auf der RNA umfassen die 5'- und 3'-Spleißstellen (Spleißdonor und -akzeptor), den Verzweigungspunkt 20–50 nt stromaufwärts der 3'-Spleißstelle und einen Polypyrimidin-Trakt zwischen 3'-Spleißstelle und Verzweigungspunkt. Überraschenderweise ist keines der HBV-Genome mit stark dezimierter SP1-RNA an einer für die SP1-RNA essentiellen Spleißstelle (nt 2453/2454 und nt 488/489) mutiert. Auch hat nur eines der Genome, D-5/19k, einen Austausch (nt 457 A>G) am vermuteten Verzweigungspunkt (nt 452–458, Konsensus YNYYYRAY) [15]. Offensichtlich führten also Mutationen in anderen Sequenzbereichen mit möglicherweise spleiß-regulatorischen Funktionen zur Reduktion der gespleißten SP1-RNA. Die gleichzeitig unveränderten Werte der SP9- und SP11-Spleißprodukte, die beide einen anderen Spleißakzeptor bei nt 282 nutzen, deuten darauf hin, dass diese Mutationen der komplexen Varianten möglicherweise eine stark verminderte Aktivität des Spleißakzeptors bei nt 488 verursachen.

Gegenwärtig ist nur sehr wenig über die Regulation des Spleißens durch *cis*-Elemente des HBV-Genoms bekannt. Bisher wurde lediglich gezeigt, dass das posttranskriptionell regulatorische Element (PRE, nt 1253–1583) im HBV-Genom distinkte positiv und negativ Spleiß-regulatorische Elemente enthält und seine Deletion zur Reduktion des Spleißens führt [248]. In dieser Region tragen nur einzelne komplexe Varianten, aber auch nicht-komplexe Genome mit normalem Spleißmuster verschiedene Punktmutationen. Somit war kein Zusammenhang zur reduzierten SP1-RNA zu erkennen.

Auch im übrigen Genom war keine einzelne gemeinsame Mutation der Klone mit reduzierter SP1-RNA im Unterschied zu den Klonen mit normalen SP1-RNA-Leveln zu finden (vgl. Anhang Abb. A.1). Daher scheint die verminderte Produktion der SP1-RNA auf verschiedenen Einzelmutationen mit gleicher Wirkung oder auf einer Kombination von Mutationen zu beruhen. Eine verminderte SP1-RNA korrelierte zwar in den meisten Fällen mit dem Auftreten einer C-Gendeletion, diese war jedoch allein oder in Kombination mit Cp-Mutationen nicht ausreichend für die Reduktion.

Auf der Suche nach potentiell verantwortlichen Mutationsmustern waren bei den Varianten mit stark reduzierter SP1-RNA folgende gemeinsame Mutationen festzustellen, die nicht bei den Genomen mit normalen SP1-RNA-Werten vorliegen: Sie tragen eine C-Gendeletion im Bereich von ca. nt 2130–2200 und eine Punktmutation bei nt 2328 in Kombination mit verschiedenen Punktmutationen um nt 500 (Patienten A und D: nt 480 und/oder 514, Patienten B und C: nt 528), also in der Nähe des Spleißakzeptors der SP1-RNA. Die Punktmutation bei nt 480 tritt nur bei Variante A-S15k auf, die eine weniger drastische

Verminderung der SP1-RNA und der korrespondierenden replikativen Intermediate zeigte. Sie befindet sich im Gegensatz zu den Mutationen bei nt 514 und 528 im herausgeschnittenen Intron der SP1-RNA. Der Grund für die verstärkte Umschreibung der SP1-, SP9- und SP11-RNA in DNA-Intermediate bei der Hybridvariante A-L1k-C/Cp im Vergleich zum Wt bleibt unklar. Bei Klon C-5/17 mit reduzierter SP1-RNA, aber ohne C-Gendeletion könnten Punktmutationen bei nt 2142 und 2143 die Wirkung der C-Gendeletion ersetzt haben. Den beiden komplexen Varianten C-5/01k und C-5/18k, die trotz C-Gendeletion eine kaum verminderte SP1-RNA zeigten, fehlen die zusätzlichen Mutationen im Bereich des nt 500. Außerdem liegt die C-Gendeletion der komplexen Variante C-5/01k möglicherweise zu weit C-terminal (nt 2394–2420), während die der Variante C-5/18k zu groß ist (nt 2068–2304).

Die Mutationsanalyse deutet also darauf hin, dass sich in den Bereichen um nt 2100–2200 und nt 500 bisher unbekannte Sequenzelemente befinden könnten, die gemeinsam das Spleißen der pgRNA zur SP1-RNA fördern. Alternativ wäre denkbar, dass nur die Mutationen in der Nähe des Spleißakzeptors zu dessen verminderter Funktion führen, das komplexe Mutationsmuster mit C-Gendeletion aber für deren Selektion notwendig ist.

Es wurde versucht, diese mutierten Regionen mit Bindestellen für bekannte Spleißfaktoren zu korrelieren. Für den Spleißfaktor PSF (Spalt- und Polyadenylierungs-Spezifitätsfaktor) existieren 3 potentielle Bindestellen im Wt-HBV-Genom, bei nt 2231–2243, nt 200–216 und nt 1305–1323. Allerdings wurde bisher nur die letzte, im PRE liegende experimentell bestätigt (Tilman Heise, Hamburg, persönliche Mitteilung und Referenz [248]). In diesen Bereichen liegen jedoch keine gemeinsamen Mutationen der reduziert spleißenden Varianten.

Weiterhin kann die Erkennung und Auswahl von Spleißdonatoren bzw. -akzeptoren durch Bindung sogenannter SR-Proteine an regulatorische Sequenzen auf der RNA beeinflusst und somit das Spleißen reguliert werden. Dabei fördert die Bindung an „*exonic splicing enhancer*“ (ESE) das Spleißen, während Bindung an „*exonic splicing silencer*“ (ESS) das Spleißen hemmen kann. Da ESE-Sequenzen im Gegensatz zu ESS-Sequenzen relativ konserviert vorliegen, lassen sich potentielle ESE mithilfe des Computerprogramms ESEfinder [249] lokalisieren. Das Programm sagte für die Wt-HBV-Genome unzählige, über die gesamte Sequenz verteilte potentielle SR-Protein-Bindungsstellen voraus. Danach befinden sich 3 potentielle Bindungsstellen für den Spleißfaktor SC35 tatsächlich bei den in den reduziert spleißenden Varianten mutierten Positionen nt 480 (474–481), nt 514 (509–516) und in unmittelbarer Nähe von nt 528 (529–536). Zwei weitere potentielle Bindungsstellen für die Proteine SRp55 bei nt 2162–2167 und SRp40 bei nt 2188–2194 liegen im Bereich der C-Gendeletionen. Ob aber diese Bindungsstellen wirklich funktionell sind und die Mutationen in

diesen Bereichen eine Rolle in der Reduktion der SP1-RNA spielen, ist erst durch weitere Experimente zu klären.

Die Ergebnisse mit den unterschiedlichen aus Patienten isolierten Varianten demonstrieren, dass das Spleißen des HBV ein komplex regulierter Prozess ist, in den vermutlich auch dafür bisher unbekannte Bereiche des Genoms involviert sind. Die komplett sequenzierten natürlich auftretenden Varianten bieten einmalige Möglichkeiten zum weiteren Studium des Spleißens und seiner Regulation im HBV-Replikationszyklus.

### *6.10.2 Mögliche Rollen des Spleißens bzw. des Nicht-Spleißens*

Die Rolle des Spleißens an sich und speziell der vorherrschenden gespleißten SP1-RNA im HBV-Replikationszyklus ist noch ungeklärt. Über das Spleißen von HBV-Varianten gibt es bisher keine gezielten Untersuchungen. Im Gegensatz zur Situation beim DHBV, wo das Spleißen für die Infektion und die Expression des großen Oberflächenproteins notwendig ist [250], werden alle HBV-Proteine von ungespleißten RNAs translatiert und SP1-RNA scheint in transfizierten Hepatomazellen nicht essentiell für die HBV-Replikation zu sein [251]. Dennoch werden alle 11 bekannten gespleißten pgRNAs des HBV revers transkribiert und sind in viralen Partikeln im Serum von Patienten zu finden [15]. Eine Funktion *in vivo* ist daher nicht ausgeschlossen.

Es wurden verschiedene Hypothesen zur Funktion des Spleißens aufgestellt. Grundsätzlich sind Transkription, mRNA-Prozessierung, nukleärer Export und Transport gekoppelte Vorgänge [252,253,254]. Daher könnten Veränderungen im Spleißmuster alle Ebenen des Replikationszyklus betreffen. Auch wäre denkbar, dass von gespleißten RNAs translatierte Fusionsproteine, wie das sogenannte HBSP der SP1-RNA, eine Funktion haben [255]. Da von den gespleißten RNAs vermutlich große Mengen an defekten Präcore- und Core-Proteinen translatiert werden, könnten diese auch den viralen Assemblierungsprozess negativ beeinflussen und somit als Hemmer einer zu starken Virusreplikation dienen [15]. Bei allen 11 bekannten Spleißprodukten der 3,5-kb-RNA bleiben dagegen X-Gen und X-Promotor, EnhI und II sowie das Polyadenylierungssignal intakt [15]. Daher wurde postuliert, dass die gespleißten RNAs wichtig für die Expression des X-Proteins sein könnten. Tatsächlich wurde für SP1-RNA-abgeleitete Genome bereits eine erhöhte Transkription der X-mRNA festgestellt [256]. Des Weiteren könnten defekte von der SP1-RNA revers-transkribierte Genome eine Rolle in der Viruspersistenz spielen, da sie hauptsächlich bei chronischen und weniger bei akut-selbstlimitierenden Verläufen der Hepatitis B gefunden wurden [256].

Erst kürzlich wurde zum ersten Mal nachgewiesen, dass auch die präS<sub>2</sub>/S-mRNA gespleißt

wird [16]. Bei Genomen aus einem immunsupprimierten HBsAg-negativen Patienten mit Reaktivierung verhinderte eine Punktmutation bei nt 458 (G>A) im S-Gen das Spleißen der präS2/S-mRNA. Nachfolgend kam es auch zur Reduktion des ungespleißten präS2/S-Transkripts und des HBsAg, vermutlich durch eine veränderte Interaktion der RNA mit RNA-bindenden Proteinen und daraus resultierender reduzierter RNA-Stabilität oder vermindertem Kernexport [16]. Diese Ergebnisse verdeutlichen den potentiellen Einfluss des Spleißens auf grundlegende Prozesse des Replikationszyklus.

Bei den komplexen Varianten überraschte das weitgehende Fehlen der SP1-RNA, die sonst den Hauptteil (60 %) aller Spleißprodukte darstellt und somit vermutlich die wichtigste Rolle im Replikationszyklus spielt. Zwar wurden die alternativen Spleißprodukte SP9 und SP11 noch unverändert gebildet, jedoch machen nach Literaturangaben von SP9- und SP11-RNA abgeleitete Genome im Serum von Patienten zusammen nur 15 % aller gespleißten Genome aus [15]. Sollte außerdem nicht nur die Produktion der SP1-RNA sondern insgesamt die Funktion des Speißakzeptors bei nt 488 gehemmt sein, wäre die Bildung von 7 der 11 bekannten Spleißtypen beeinträchtigt, die zusammen 79 % aller Spleißprodukte darstellen [15]. In diesem Fall könnte man von einem breiten Defekt des Spleißens der pgRNA sprechen.

Über den Grund für die Selektion von Varianten mit stark reduzierter gespleißter SP1-RNA (bzw. insgesamt drastisch verminderten Spleißprodukten) in Nierentransplantierten mit LZ und die mögliche Verbindung zur Pathogenese kann nur spekuliert werden. Da die komplexen Varianten selbst defekte Genome darstellen und den Wt zur Replikation benötigen, wäre es für ihre Selektion vermutlich von Nachteil gewesen, zusätzlich noch weitere defekte, gespleißte Genome zu produzieren, mit denen sie um den Wt konkurrieren müssen. Möglicherweise ist in den Nierentransplantierten auch die starke HBx-Expression von der gespleißten RNA nicht mehr notwendig. Damit übereinstimmend ist grundsätzlich die C-terminale Transaktivierungsdomäne des HBx der komplexen Varianten durch die überlappenden Mutationen im Cp mutiert oder sogar trunkiert, so dass eine von vorn herein veränderte und möglicherweise verminderte Aktivität des Varianten-HBx zu erwarten ist. Auch Varianten mit einer X-Startkodonmutation (A-S18k) und folglich komplett fehlender HBx-Expression traten auf. Andererseits könnte in den immunsupprimierten Patienten auch der Selektionsdruck für das von der SP1-RNA translatierte HBSP oder ein unbekanntes Translationsprodukt der gespleißten RNA wegfallen. Denkbar wäre, dass ein solches Protein oder die gespleißte RNA selbst in Prozesse der Immunabwehr des Wt-Virus involviert sind.

## 6.11 Mögliche Rolle der komplexen Varianten in der Pathogenese

Die charakteristischen phänotypischen Veränderungen der komplexen Varianten, d. h. die Kombination erhöhter Replikation, reduzierter gespleißter SP1-RNA und des Defekts in Proteinexpression, -lokalisierung und -sekretion, könnten auf vielen verschiedenen Wegen Zytotoxizität verursachen oder die Wirtszellphysiologie stören und somit eine Rolle in der Pathogenese der LZ bei Nierentransplantierten spielen.

Mehrfach wurde *in vivo* und *in vitro* nachgewiesen, dass eine gestörte Oberflächenproteinexpression mit Retention und Akkumulation von HBsAg einen direkten oder immunvermittelten Zellschaden verursachen kann. In transgenen Mäusen war die relative Überexpression von LHBs im Vergleich zu SHBs aufgrund verminderter Sekretion und fortschreitender intrazellulärer Akkumulation des HBsAg direkt toxisch für die Leberzellen [213,257]. Die Zellen hatten das Erscheinungsbild von „*ground-glass*“-Hepatozyten, die große Mengen von HBV-Oberflächenproteinen in ausgedehnten Vesikeln beherbergen und häufig auch in der Leber von Patienten mit chronischer Hepatitis B zu finden sind. Zusätzlich sensibilisierte die Retention von Oberflächenproteinen die Zellen für Schädigungen durch Immunsystem und Zytokine [214]. In Hepatomazellen führte die Überexpression von LHBs zu Zellveränderungen mit großen Vakuolen und Apoptose, die stark an die Zytopathologie in Patienten mit FCH erinnern [143]. Wie beschrieben (Abschnitt 1.2.3), tritt diese aggressive Form der Hepatitis B ohne nennenswerte Entzündungsreaktionen hauptsächlich bei Immunsupprimierten auf.

Intensiv wird ein Zusammenhang der Pathogenese mit der Präsenz verschiedener Varianten mit HBsAg-Retention/Akkumulation diskutiert. So ist bei FCH-Patienten die Überexpression von LHBs vermutlich auf Varianten mit Deletionen in der präS-Region zurückzuführen [144,169]. Auch in „*ground-glass*“-Hepatozyten wurden verschiedene präS-Deletions-Varianten nachgewiesen, deren HBsAg-Retention und -Akkumulation im ER die Aktivierung einer ER-Stress-Reaktion zur Folge hatte [258,259]. In einer weiteren Studie wurde bei präS2-Deletionsvarianten eine Retention bzw. Akkumulation von HBsAg im Zytoplasma oder an der Peripherie der Hepatozyten detektiert, wie sie auch in der Leber von Patienten in der nicht-replikativen Phase der chronischen Hepatitis B (häufig mit LZ) zu beobachten ist [260].

Bei den Nierentransplantierten mit LZ trat eine intrazelluläre Akkumulation von Oberflächenproteinen bereits bei einem früh im Beobachtungszeitraum isolierten Wt-ähnlichen HBV-Genom (A-S1) auf. Wie beschrieben (Abschnitt 6.7), wiesen reduzierte HBsAg-Level bei normaler intrazellulärer Expression der Oberflächenproteine darauf hin, dass darüber hinaus vermutlich auch viele der übrigen im Screening analysierten Genome

aus frühen Serumproben beider Patienten eine solche Akkumulation verursachen. Es wäre daher denkbar, dass das vermehrte Auftreten solcher Genome vor Anreicherung der komplexen Varianten zu einer Vorschädigung und/oder Sensibilisierung der Leberzellen führen könnte.

Bei den mit LZ assoziierten komplexen Varianten scheint die Akkumulation von Oberflächenproteinen im ER jedoch eher eine Ausnahme zu sein. Meist waren hier insgesamt keine oder wenig Oberflächenproteine nachweisbar. Die Situation hat Ähnlichkeit mit der eines aufgrund von FCH verstorbenen immunsupprimierten Patienten, der mit einer präS-Variante infiziert war, in dessen Leber jedoch nahezu keine Oberflächenproteine nachgewiesen wurden [144].

Möglicherweise spielen hier andere Faktoren eine größere Rolle für die Pathogenese. Experimente mit DHBV zeigten, dass vermindertes oder defektes LHBs zu verstärkter Ansammlung von cccDNA im Zellkern und daraus resultierender Leberzellschädigung führen kann [38,261]. Und auch intrazelluläre Akkumulation von Core-Protein, wie sie nach Kotransfektion mit den komplexen Varianten auftrat, wirkte in Zellkulturexperimenten zytopathogen [229]. Der potentielle Einfluss des zytoplasmatischen Core-Proteins der Varianten wurde bereits in Abschnitt 6.5 diskutiert. Ebenso könnten sich die starke Reduktion der gespleißten SP1-RNA (siehe Abschnitt 6.10.2) oder veränderte transaktivierende Eigenschaften der mutierten X-, Core- oder Oberflächenproteine der komplexen Varianten auf die Pathogenese auswirken. Darüber hinaus legte die strukturelle und funktionelle Charakterisierung von HBV-Genomen aus chinesischen HCC-Patienten eine Verbindung zwischen hoch-replizierenden Varianten und der Pathogenese nah [196]. Letztendlich lässt der komplexe Phänotyp der Varianten vermuten, dass, eher als eine einzige Veränderung, die Kombination mehrerer Faktoren eine entscheidende Rolle in der Pathogenese spielt.

Obwohl der Phänotyp der Varianten diverse mögliche Arten der Beeinflussung und Schädigung der Wirtszelle offen legt, lassen die aktuellen Untersuchungen an Hepatomazellen leider keine endgültigen Aussagen zur tatsächlichen Zytopathogenität der Varianten zu. Für Analysen zu Auswirkungen wie Zytotoxizität oder Apoptose sind Studien mit primären Hepatozyten oder in einem Tiermodell erforderlich. Ein potentiell veränderter Einfluss der Varianten auf Komponenten des Immunsystems sowie die Frage, ob die Varianten wirklich für die Pathogenese verantwortlich sind, können nur in einem Tiermodell geklärt werden. Unter den gegenwärtigen Bedingungen sind solche Versuche jedoch schon alleine aufgrund der benötigten Mengen an infektiösem Virus kaum durchführbar.

## 6.12 Korrelation zwischen HBV-Population und Krankheitsverlauf

Im Detail betrachtet, demonstrierten die komplexen Varianten der 2 nierentransplantierten Patienten einen teilweise heterogenen Phänotyp, der jedoch immer eine erhöhte Replikation, veränderte Transkription und einen breiten Defekt der Proteinexpression beinhaltet. Dabei zeigten die Varianten des Patienten A deutlich stärkere phänotypische Variationen, z. B. im Ausmaß der Replikation und Anreicherung, der Hemmung des Wt, der RNA-Transkription oder der Oberflächenproteinexpression, als die Varianten des Patienten B, die ähnliche Eigenschaften aufwiesen. Gleichzeitig wurde der Phänotyp und insbesondere die Replikation bei Patient B hauptsächlich durch die Effekte der Mutationen in Cp und C-Gen bestimmt, während bei Patient A zusätzlich Mutationen außerhalb dieser beiden Regionen einen starken Einfluss hatten. Diese Beobachtungen korrelieren mit der Tatsache, dass bei Patient A deutlich mehr verschiedene Mutationsmuster von Deletionen/Insertionen in Cp, C-Gen und präS-Bereich in den Viruspopulationen vorlagen als bei Patient B (Referenz [134], Abschnitte 3.1.2 und 3.2.2). Auch unterscheiden sich die von Patient A isolierten HBV-Genome untereinander stärker in zusätzlichen Punktmutationen, sowohl innerhalb als auch außerhalb von Cp und C-Gen, und weichen mehr von der Sequenz des Referenzgenoms ab (Abb. 5.5). Eine hohe Sequenzheterogenität innerhalb einer HBV-Population scheint also eine gewisse Heterogenität der funktionellen Eigenschaften nach sich zu ziehen, auch wenn generell ein bestimmtes phänotypisches Bild hervorsteht.

Interessanterweise entwickelte sich die LZ in Patient B innerhalb von nur 8 Monaten nach dem ersten Nachweis und der Akkumulation der komplexen Varianten, und der Patient verstarb bereits 3 Monate später. Dagegen schritt die Erkrankung des Patienten A deutlich langsamer voran [4,134]. Die LZ wurde erst mehr als 2 Jahre nach dem Auftreten der komplexen Varianten diagnostiziert und der Patient überlebte dank einer erfolgreichen antiviralen Therapie mit 3TC und einer kombinierten Leber-Nierentransplantation.

Damit drängt sich die Hypothese auf, dass ein Zusammenhang zwischen der Komplexität der Quasispezies, der Einheitlichkeit der funktionellen Eigenschaften der vorhandenen Virusvarianten und der Schwere des Krankheitsverlaufs bestehen könnte. Die Akkumulation von komplexen Varianten mit sehr einheitlichem Mutationsmuster und Phänotyp könnte eine besonders rasante Pathogenese verursachen, indem alle Varianten die Zellen in gleicher Weise schädigen. Dagegen könnten die Varianten einer heterogeneren HBV-Population mit stärker variierendem Ausmaß bestimmter phänotypischer Eigenschaften auf unterschiedliche Weise und/oder mit unterschiedlicher Stärke zur Pathogenese beitragen, so dass die Entwicklung einer schweren Lebererkrankung langsamer verläuft.

Andererseits ist aber auch denkbar, dass die Art der Cp-Mutation und/oder C-Gendeletion bzw. ihrer Kombination, den Krankheitsverlauf beeinflusst. So war möglicherweise das Auftreten der Cp-Deletion von nt 1763–1770 und/oder der C-Gendeletion von 51 nt (17 AS) entscheidend für den schnellen, drastischen Leberschaden des Patienten B. Darüber hinaus verhinderte vielleicht lediglich mangelnde Zeit die Entstehung und Selektion weiterer Mutationen auf dem Genom, die zu einer heterogeneren Population geführt hätten. Endgültig klären lassen sich diese potentiellen Zusammenhänge nur durch Untersuchungen in einem Tiermodell.

### **6.13 Notwendigkeit und Aussagekraft der funktionellen Analysen von HBV-Gesamtgenomen**

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen die Annahme, dass die komplexen HBV-Varianten veränderte phänotypische Eigenschaften verglichen mit den zuvor analysierten Hybridgenomen zeigen könnten. Zwar waren die meisten bekannten Auswirkungen der Cp-Mutationen und C-Gendeletionen auch wiederzufinden, sie wurden jedoch im Kontext des komplexen Mutationsmusters durch weitere Effekte ergänzt und in ihrem Ausmaß stark moduliert. Ein entscheidendes Merkmal, die Hemmung der Wt-Replikation durch die C-Gendeletionen, war dagegen in den komplexen Genomen meist nicht mehr präsent. Gleichermaßen hatten bereits andere Gruppen gezeigt, dass schon die Effekte einzelner Punktmutationen, z. B. im S-Gen oder im C-Gen, sich gegenseitig beeinflussen, verstärken oder aufheben können [160,194].

Die Daten machen deutlich, dass die funktionellen Analysen einzelner Mutationen bei der Charakterisierung des Phänotyps natürlicher Varianten, und folglich auch in der Frage ihrer Pathogenität und ihres Zusammenhangs mit dem klinischen Verlauf der Hepatitis B, nur begrenzt weiterhelfen können. Besonders bei sehr heterogenen Viruspopulationen ist die Untersuchung kompletter Genome, so, wie sie vom Patienten isoliert wurden, unumgänglich. Nur bei der Suche nach den molekularen Ursachen eines Phänotyps können, insbesondere im Falle einer hohen Komplexität der Mutationsmuster wie in dieser Arbeit, ergänzend gezielte Analysen von Hybridgenomen zu den Auswirkungen einzelner Mutationen sinnvoll sein.

Auch die Analyse gesamter Viruspopulationen ist wichtig. Neueste Untersuchungen an Polioviruspopulationen untermauern Aussagen der sogenannten Quasispezies-Theorie, die davon ausgeht, dass die Selektion auf der Ebene ganzer Populationen anstelle von Einzelvarianten stattfindet und dass der Phänotyp einer Quasispezies durch intensive Interaktion und Komplementation zwischen Virusvarianten bestimmt wird [262].

Übereinstimmend damit beeinflussen auch HBV-Genome sich innerhalb einer Viruspopulation gegenseitig, so dass bestimmte Eigenschaften von Varianten (z. B. ein Defekt der Virussekretion [246]) oder des Wt aufgehoben oder möglicherweise auch verstärkt werden können. Besonders deutlich wird dies am Beispiel der komplexen Varianten, die zur Replikation auf die Komplementation durch den Wt angewiesen sind. Wünschenswert wären daher phänotypische Analysen der gesamten komplexen HBV-Populationen, die im Zusammenhang mit der LZ in Nierentransplantierten auftreten, in einem Tiermodell. Wie bereits erwähnt, sind diese unter den gegenwärtigen Bedingungen jedoch kaum durchführbar. In einem ersten Schritt erfolgten in dieser Arbeit stattdessen Kotransfektionen von Variantenpools und Wt, die zeigten, dass sich auf der Ebene der Replikation der Phänotyp der Mehrheit der komplexen Varianten (erhöhte Replikation ohne Unterdrückung des Wt) durchsetzt.



## 7 Zusammenfassung

Bei immunsupprimierten Nierentransplantatempfängern mit chronischer Hepatitis B können nach häufig langer asymptomatischer Phase schwere Verläufe der Lebererkrankung mit Leberzirrhose und Leberversagen auftreten. In diesen Fällen ist die übliche, immunvermittelte HBV-Pathogenese als Ursache für den Krankheitsverlauf eher unwahrscheinlich. Dagegen wurde gezeigt, dass die Entwicklung von Leberzirrhose in den Nierentransplantierten in engem Zusammenhang mit der Akkumulation und Persistenz von HBV-Varianten mit Mutationen im Core-Promotor/X-Gen, Deletionen im C-Gen und teilweise zusätzlichen Deletionen im präS-Bereich steht. Diese komplexen Varianten könnten eine Rolle in der Pathogenese spielen.

In Vorarbeiten wurde bereits bei Viren mit Hybridgenomen, die entweder typische Core-Promotor-Mutationen oder C-Gen deletionen der komplexen Varianten in einem Wildtypgenomkontext enthielten, ein veränderter Phänotyp gegenüber dem Wildtypvirus im *in-vitro*-Transfektionssystem festgestellt. Es war jedoch unklar, ob sich dieser Phänotyp auch bei den natürlich auftretenden Varianten mit verschiedenen komplexen Mutationskombinationen zeigen würde. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit erstmals funktionelle Analysen der vollständigen komplexen Varianten durchgeführt, um Hinweise auf ihren potentiellen Beitrag zur speziellen Pathogenese der Leberzirrhose bei Immunsupprimierten zu erlangen.

Die Analysen erfolgten durch transiente Transfektion der humanen Hepatomazelllinie HuH7 mit HBV-Gesamtgenomen, die aus 2 repräsentativen Patienten während des Krankheitsverlaufs von einer asymptomatischen Infektion hin zur Leberzirrhose isoliert und kloniert worden waren. Da den komplexen Varianten aufgrund der C-Gen deletion funktionelles Core-Protein zur Replikation fehlt, wurden sie für Analysen der Replikation mit dem Core-Expressionsplasmid pCore oder einem Wildtypgenom zur Komplementation kotransfiziert.

Zunächst wurde ein Überblick über die phänotypischen Veränderungen aller replikationskompetenten Klone aus den zu verschiedenen Zeitpunkten vorliegenden HBV-Populationen erstellt. Anschließend wurden 6 repräsentative komplexe Varianten ausgewählt, die in den beiden Patienten vor und während der Entwicklung der Leberzirrhose auftraten und akkumulierten, und im Vergleich zu Referenz-Wildtypgenomen und Wildtyp-ähnlichen Genomen der Patienten aus der frühen Infektionsphase detailliert funktionell charakterisiert.

Trotz einiger Variationen im Ausmaß der phänotypischen Veränderungen wiesen die komplexen Varianten einen gemeinsamen, drastisch vom Wildtyp abweichenden Phänotyp auf. Sie zeigten eine veränderte Transkription mit reduzierten präC- und Oberflächen-mRNAs und verstärkter Expression der prägenomischen RNA. Der Level des häufigsten Spleißprodukts der prägenomischen RNA, SP1, und die von der SP1-RNA revers transkribierten replikativen DNA-Intermediate waren stark vermindert. Weiterhin demonstrierten die Varianten eine extrem reduzierte oder fehlende Expression und/oder Sekretion aller Oberflächenproteine, des Core-Proteins und des HBeAg. Für eine komplexe Variante und ein Wildtyp-ähnliches Genom war eine anormale, perinukleäre Akkumulation der Oberflächenproteine im Endoplasmatischen Retikulum nachweisbar, die mit einem unterschiedlich stark ausgeprägten Sekretionsdefekt einher ging. Daneben führte die Kotransfektion von Varianten mit pCore oder einem Wildtypgenom zu einer veränderten, perinukleären Lokalisation des Wildtyp-Core-Proteins.

Parallel zu diesen breiten Defekten zeigten die komplexen Varianten nach Kotransfektion mit einem Wildtypgenom in verschiedenen Verhältnissen eine in ihrem Ausmaß variierende erhöhte Replikation und Anreicherung gegenüber dem Wildtyp. Diese resultierten aus einer verstärkten reversen Transkription der prägenomischen RNA der Varianten. Die erhöhte Replikation und Anreicherung konnten nach Kotransfektion mit Wildtyp auch bei Mischungen von Variantengenomen derselben Patientenprobe nachgewiesen werden, die in ihrer Zusammensetzung den Viruspopulationen der Patienten zu bestimmten Zeitpunkten nach Diagnose der Leberzirrhose entsprachen.

Durch Konstruktion und Analyse von Hybridvarianten, die den Core-Promotor, das C-Gen oder beide mutierten Bereiche der komplexen Varianten im Kontext eines (vom selben Patienten stammenden) Wildtyp-ähnlichen Genoms enthalten, konnten einige funktionelle Veränderungen der komplexen Varianten auf die Auswirkungen ihrer Mutationen in Core-Promotor und/oder C-Gen zurückgeführt werden.

Jedoch zeigte sich deutlich, dass zusätzlich Mutationen in den anderen Genomabschnitten einen starken Einfluss, z. B. auf das Ausmaß des Replikationsvorteils, hatten. Besonders auffällig war dies bei den Varianten des Patienten, der auch insgesamt eine heterogenere HBV-Population aufwies. Der Phänotyp der komplexen Varianten war folglich deutlich vielschichtiger als aufgrund der Analysen der Hybridgenome mit nur den Core-Promotor-Mutationen oder C-Gendeletionen im Wildtypkontext zu erwarten gewesen wäre. So war auch die im Einklang mit früheren Untersuchungen während der Koreplikation beobachtete Hemmung des Wildtyps durch Hybridvarianten mit lediglich C-Gendeletionen bei den

meisten komplexen Varianten und bei den Hybridvarianten mit C-Gendeletionen und Core-Promotor-Mutationen nicht mehr vorhanden. Bei den komplexen Varianten handelt es sich daher nicht um defekte interferierende Partikel, wie in der Literatur generell für HBV mit C-Gendeletionen postuliert wurde. Diese Ergebnisse machen deutlich, dass besonders bei heterogenen Viruspopulationen die funktionelle Analyse kompletter Varianten zur Klärung ihres Phänotyps, ihrer potentiellen Pathogenität und ihres Zusammenhangs zum Verlauf der Hepatitis B notwendig ist.

Die Daten legen nahe, dass die komplexen Varianten z. B. durch die aberrante intrazelluläre Lokalisation von Core- und Oberflächenproteinen, durch ihre gleichzeitig starke Replikation und Anreicherung, durch die starke Reduktion der gespleißten SP1-RNA oder durch veränderte transaktivierende Eigenschaften der mutierten X-, Core- oder Oberflächenproteine zytotoxisch wirken oder die Wirtszellphysiologie stören und damit einen Beitrag zur Pathogenese leisten.



## Literaturverzeichnis

- [1] Gust, I. D.; Burrell, C. J.; Coulepis, A. G.; Robinson, W. S. und Zuckerman, A. J. (1986): Taxonomic classification of human hepatitis B virus, *Intervirology* 25, Seite 14-29.
- [2] Heermann, K. H.; Kruse, F.; Seifer, M. und Gerlich, W. H. (1987): Immunogenicity of the gene S and Pre-S domains in hepatitis B virions and HBsAg filaments, *Intervirology* 28 [1], Seite 14-25. URL: PM:2448264
- [3] Seeger, C. und Mason, W. S. (2000): Hepatitis B Virus Biology, *Microbiol Mol Biol Rev* 64 [1], Seite 51-68.
- [4] Preikschat, P. (2000): Charakterisierung von Hepatitis B-Virus-Populationen in langzeit-immunsupprimierten Virusträgern im Verlauf der chronischen Hepatitis unter besonderer Berücksichtigung der Rolle der Core-Deletionsvarianten, Dissertation, Humboldt-Universität Berlin.
- [5] Moolla, Naazneen; Kew, Michael und Arbutnot, Patrick (2002): Regulatory elements of hepatitis B virus transcription, *J Viral Hepat* 9 [5], Seite 323-331. URL: <http://www.blackwell-synergy.com/links/doi/10.1046/j.1365-2893.2002.00381.x/abs>
- [6] Kramvis, A.; Kew, M. und Francois, G. (2005): Hepatitis B virus genotypes, *Vaccine* 23 [19], Seite 2409-2423. URL: PM:15752827
- [7] Gerlich, W. H.; Lu, X. und Heermann, K. H. (1993): Studies on the attachment and penetration of hepatitis B virus, *J Hepatol* 17 Suppl 3, Seite S10-S14.
- [8] Sominskaya, I.; Pushko, P.; Dreilina, D.; Kozlovskaya, T. und Pumpen, P. (1992): Determination of the minimal length of preS1 epitope recognized by a monoclonal antibody which inhibits attachment of hepatitis B virus to hepatocytes, *Med Microbiol Immunol Berl* 181, Seite 215-226.
- [9] Le Seyec, J.; Chouteau, P.; Cannie, I.; Guguen Guillouzo, C. und Gripon, P. (1999): Infection process of the hepatitis B virus depends on the presence of a defined sequence in the pre-S1 domain, *J Virol* 73, Seite 2052-2057.
- [10] Urban, S.; Schwarz, C.; Marx, U. C.; Zentgraf, H.; Schaller, H. und Multhaupt, G. (2000): Receptor recognition by a hepatitis B virus reveals a novel mode of high affinity virus-receptor interaction, *EMBO J* 19 [6], Seite 1217-1227.
- [11] Paran, N.; Geiger, B. und Shaul, Y. (2001): HBV infection of cell culture: evidence for multivalent and cooperative attachment, *EMBO J* 20 [16], Seite 4443-4453.
- [12] Gripon, P.; Cannie, I. und Urban, S. (2005): Efficient inhibition of hepatitis B virus infection by acylated peptides derived from the large viral surface protein, *J Virol* 79 [3], Seite 1613-1622. URL: PM:15650187
- [13] Glebe, D.; Urban, S.; Knoop, E. V.; Cag, N.; Krass, P.; Grun, S.; Bulavaite, A.; Sasnauskas, K. und Gerlich, W. H. (2005): Mapping of the hepatitis B virus attachment site by use of infection-inhibiting preS1 lipopeptides and tupaia hepatocytes, *Gastroenterology* 129 [1], Seite 234-245. URL: PM:16012950
- [14] Rabe, B.; Vlachou, A.; Pante, N.; Helenius, A. und Kann, M. (2003): Nuclear import of hepatitis B virus capsids and release of the viral genome, *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 [17], Seite 9849-9854. URL: PM:12909718
- [15] Günther, S.; Sommer, G.; Iwanska, A. und Will, H. (1997): Heterogeneity and common features of defective hepatitis B virus genomes derived from spliced pregenomic RNA, *Virology* 238, Seite 363-371.
- [16] Hass, M.; Hannoun, C.; Kalinina, T.; Sommer, G.; Manegold, C. und Gunther, S. (2005): Functional analysis of hepatitis B virus reactivating in hepatitis B surface antigen-negative individuals, *Hepatology* 42 [1], Seite 93-103. URL: PM:15962285
- [17] Hu, J.; Flores, D.; Toft, D.; Wang, X. und Nguyen, D. (2004): Requirement of heat shock protein 90 for human hepatitis B virus reverse transcriptase function, *J Virol* 78 [23], Seite 13122-13131. URL: PM:15542664
- [18] Park, S. G. und Jung, G. (2001): Human hepatitis B virus polymerase interacts with the molecular chaperonin Hsp60, *J Virol* 75 [15], Seite 6962-6968.
- [19] Junker Niepmann, M.; Bartenschlager, R. und Schaller, H. (1990): A short cis-acting sequence is required for hepatitis B virus pregenome encapsidation and sufficient for packaging of foreign RNA, *EMBO J* 9, Seite 3389-3396.
- [20] Pollack, J. R. und Ganem, D. (1994): Site-specific RNA binding by a hepatitis B virus reverse transcriptase initiates two distinct reactions: RNA packaging and DNA synthesis, *J Virol* 68, Seite 5579-5587.
- [21] Bartenschlager, R. und Schaller, H. (1992): Hepadnaviral assembly is initiated by polymerase binding to the encapsidation signal in the viral RNA genome, *EMBO J* 11, Seite 3413-3420.

- [22] Bartenschlager, R.; Junker Niepmann, M. und Schaller, H. (1990): The P gene product of hepatitis B virus is required as a structural component for genomic RNA encapsidation, *J Virol* 64, Seite 5324-5332.
- [23] Nassal, M. (1999): Hepatitis B virus replication: novel roles for virus-host interactions, *Intervirology* 42 [2-3], Seite 100-116. URL: PM:10516465
- [24] Liu, N.; Ji, L.; Maguire, M. L. und Loeb, D. D. (2004): cis-Acting sequences that contribute to the synthesis of relaxed-circular DNA of human hepatitis B virus, *J Virol* 78 [2], Seite 642-649. URL: PM:14694095
- [25] Tang, H. und McLachlan, A. (2002): A pregenomic RNA sequence adjacent to DR1 and complementary to epsilon influences hepatitis B virus replication efficiency, *Virology* 303 [1], Seite 199-210. URL: PM:12482672
- [26] Lee, J.; Shin, M. K.; Lee, H. J.; Yoon, G. und Ryu, W. S. (2004): Three novel cis-acting elements required for efficient plus-strand DNA synthesis of the hepatitis B virus genome, *J Virol* 78 [14], Seite 7455-7464. URL: PM:15220419
- [27] Shin, M. K.; Lee, J. und Ryu, W. S. (2004): A novel cis-acting element facilitates minus-strand DNA synthesis during reverse transcription of the hepatitis B virus genome, *J Virol* 78 [12], Seite 6252-6262. URL: PM:15163718
- [28] Bruss, V. (2004): Envelopment of the hepatitis B virus nucleocapsid, *Virus Res* 106 [2], Seite 199-209. URL: PM:15567498
- [29] Wei, Y.; Tavis, J. E. und Ganem, D. (1996): Relationship between viral DNA synthesis and virion envelopment in hepatitis B viruses, *J Virol* 70, Seite 6455-6458.
- [30] Gerelsaikhan, T.; Tavis, J. E. und Bruss, V. (1996): Hepatitis B virus nucleocapsid envelopment does not occur without genomic DNA synthesis, *J Virol* 70, Seite 4269-4274.
- [31] Lan, Y. T.; Li, J.; Liao, W. und Ou, J. (1999): Roles of the three major phosphorylation sites of hepatitis B virus core protein in viral replication, *Virology* 259, Seite 342-348.
- [32] Gazina, E. V.; Fielding, J. E.; Lin, B. und Anderson, D. A. (2000): Core protein phosphorylation modulates pregenomic RNA encapsidation to different extents in human and duck hepatitis B viruses, *J Virol* 74 [10], Seite 4721-4728. URL: PM:10775610
- [33] Daub, H.; Blencke, S.; Habenberger, P.; Kurtenbach, A.; Dennenmoser, J.; Wissing, J.; Ullrich, A. und Cotten, M. (2002): Identification of SRPK1 and SRPK2 as the major cellular protein kinases phosphorylating hepatitis B virus core protein, *J Virol* 76 [16], Seite 8124-8137. URL: PM:12134018
- [34] Perlman, D. H.; Berg, E. A.; O'connor, P. B.; Costello, C. E. und Hu, J. (2005): Reverse transcription-associated dephosphorylation of hepadnavirus nucleocapsids, *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 [25], Seite 9020-9025. URL: PM:15951426
- [35] Bruss, V. (1997): A short linear sequence in the pre-S domain of the large hepatitis B virus envelope protein required for virion formation, *J Virol* 71, Seite 9350-9357.
- [36] Poisson, F.; Severac, A.; Hourieux, C.; Goudeau, A. und Roingeard, P. (1997): Both pre-S1 and S domains of hepatitis B virus envelope proteins interact with the core particle, *Virology* 228, Seite 115-120.
- [37] Tuttleman, J. S.; Pourcel, C. und Summers, J. (1986): Formation of the pool of covalently closed circular viral DNA in hepadnavirus-infected cells, *Cell* 47 [3], Seite 451-460. URL: PM:3768961
- [38] Lenhoff, R. J. und Summers, J. (1994): Coordinate regulation of replication and virus assembly by the large envelope protein of an avian hepadnavirus, *J Virol* 68, Seite 4565-4571.
- [39] Summers, J.; Smith, P. M.; Huang, M. J. und Yu, M. S. (1991): Morphogenetic and regulatory effects of mutations in the envelope proteins of an avian hepadnavirus, *J Virol* 65 [3], Seite 1310-1317. URL: PM:1995945
- [40] Yu, X. und Mertz, J. E. (1996): Promoters for synthesis of the pre-C and pregenomic mRNAs of human hepatitis B virus are genetically distinct and differentially regulated, *J Virol* 70, Seite 8719-8726.
- [41] Yu, X. und Mertz, J. E. (1997): Differential regulation of the pre-C and pregenomic promoters of human hepatitis B virus by members of the nuclear receptor superfamily, *J Virol* 71 [12], Seite 9366-9374. URL: PM:9371596
- [42] Yuh, C. H.; Chang, Y. L. und Ting, L. P. (1992): Transcriptional regulation of precore and pregenomic RNAs of hepatitis B virus, *J Virol* 66, Seite 4073-4084.
- [43] Valenzuela, P.; Quiroga, M.; Zaldivar, J.; Gray, P. und Rutter, W. J. (1980): The nucleotide sequence of the hepatitis B viral genome and the identification of the major viral genes, Fields, B. N.; Jaenisch, R. und Fox, C. F., *Animal Virus Genetics*, Seite 57-70, Academic Press, New York.

- [44] Lo, W. Y. und Ting, L. P. (1994): Repression of enhancer II activity by a negative regulatory element in the hepatitis B virus genome, *J Virol* 68, Seite 1758-1764.
- [45] Chen, M. und Ou, J. H. (1995): Cell type-dependent regulation of the activity of the negative regulatory element of the hepatitis B virus core promoter, *Virology* 214, Seite 198-206.
- [46] Raney, A. K.; Johnson, J. L.; Palmer, C. N. und McLachlan, A. (1997): Members of the nuclear receptor superfamily regulate transcription from the hepatitis B virus nucleocapsid promoter, *J Virol* 71, Seite 1058-1071.
- [47] Zhang, P. und McLachlan, A. (1994): Differentiation-specific transcriptional regulation of the hepatitis B virus nucleocapsid gene in human hepatoma cell lines, *Virology* 202, Seite 430-440.
- [48] Yu, X. und Mertz, J. E. (2003): Distinct modes of regulation of transcription of hepatitis B virus by the nuclear receptors HNF4alpha and COUP-TF1, *J Virol* 77 [4], Seite 2489-2499. URL: PM:12551987
- [49] Lopez Cabrera, M.; Letovsky, J.; Hu, K. Q. und Siddiqui, A. (1990): Multiple liver-specific factors bind to the hepatitis B virus core/pregenomic promoter: trans-activation and repression by CCAAT/enhancer binding protein, *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, Seite 5069-5073.
- [50] Xu, Z.; Jensen, G. und Yen, T. S. (1997): Activation of hepatitis B virus S promoter by the viral large surface protein via induction of stress in the endoplasmic reticulum, *J Virol* 71, Seite 7387-7392.
- [51] Zhang, P.; Raney, A. K. und McLachlan, A. (1992): Characterization of the hepatitis B virus X- and nucleocapsid gene transcriptional regulatory elements, *Virology* 191, Seite 31-41.
- [52] Takada, S.; Kaneniwa, N.; Tsuchida, N. und Koike, K. (1996): Hepatitis B virus X gene expression is activated by X protein but repressed by p53 tumor suppressor gene product in the transient expression system, *Virology* 216, Seite 80-89.
- [53] Bock, C. T.; Malek, N. P.; Tillmann, H. L.; Manns, M. P. und Trautwein, C. (2000): The enhancer I core region contributes to the replication level of hepatitis B virus In vivo and In vitro, *J Virol* 74 [5], Seite 2193-2202.
- [54] Yuh, C. H. und Ting, L. P. (1991): C/EBP-like proteins binding to the functional box-alpha and box-beta of the second enhancer of hepatitis B virus, *Mol Cell Biol* 11 [10], Seite 5044-5052. URL: PM:1922032
- [55] Doitsh, G. und Shaul, Y. (2004): Enhancer I predominance in hepatitis B virus gene expression, *Mol Cell Biol* 24 [4], Seite 1799-1808. URL: PM:14749394
- [56] Huang, J. und Liang, T. J. (1993): A novel hepatitis B virus (HBV) genetic element with Rev response element-like properties that is essential for expression of HBV gene products, *Mol Cell Biol* 13, Seite 7476-7486.
- [57] Huang, Z. M. und Yen, T. S. (1995): Role of the hepatitis B virus posttranscriptional regulatory element in export of intronless transcripts, *Mol Cell Biol* 15, Seite 3864-3869.
- [58] Huang, Z. M. und Yen, T. S. (1994): Hepatitis B virus RNA element that facilitates accumulation of surface gene transcripts in the cytoplasm, *J Virol* 68, Seite 3193-3199.
- [59] Huang, Z. M.; Zang, W. Q. und Yen, T. S. (1996): Cellular proteins that bind to the hepatitis B virus posttranscriptional regulatory element, *Virology* 217, Seite 573-581.
- [60] Ehlers, I.; Horke, S.; Reumann, K.; Rang, A.; Grosse, F.; Will, H. und Heise, T. (2004): Functional characterization of the interaction between human La and hepatitis B virus RNA, *J Biol Chem* 279 [42], Seite 43437-43447. URL: PM:15302879
- [61] Heise, T.; Guidotti, L. G. und Chisari, F. V. (2001): Characterization of nuclear RNases that cleave hepatitis B virus RNA near the La protein binding site, *J Virol* 75 [15], Seite 6874-6883. URL: PM:11435567
- [62] Nassal, M. (1992): The arginine-rich domain of the hepatitis B virus core protein is required for pregenome encapsidation and productive viral positive-strand DNA synthesis but not for virus assembly, *J Virol* 66, Seite 4107-4116.
- [63] Zhou, S. und Standing, D. N. (1992): Hepatitis B virus capsid particles are assembled from core- protein dimer precursors, *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, Seite 10046-10050.
- [64] Zheng, J.; Schodel, F. und Peterson, D. L. (1992): The structure of hepadnaviral core antigens. Identification of free thiols and determination of the disulfide bonding pattern, *J Biol Chem* 267 [13], Seite 9422-9429. URL: PM:1577770
- [65] Nassal, M.; Rieger, A. und Steinau, O. (1992): Topological analysis of the hepatitis B virus core particle by cysteine-cysteine cross-linking, *J Mol Biol* 225, Seite 1013-1025.

- [66] Kann, M. und Gerlich, W. H. (1994): Effect of core protein phosphorylation by protein kinase C on encapsidation of RNA within core particles of hepatitis B virus, *J Virol* 68, Seite 7993-8000.
- [67] Kau, J. H. und Ting, L. P. (1998): Phosphorylation of the core protein of hepatitis B virus by a 46- kilodalton serine kinase, *J Virol* 72, Seite 3796-3803.
- [68] Bottcher, B.; Wynne, S. A. und Crowther, R. A. (1997): Determination of the fold of the core protein of hepatitis B virus by electron cryomicroscopy [see comments], *Nature* 385, Seite 88-91.
- [69] Salfeld, J.; Pfaff, E.; Noah, M. und Schaller, H. (1989): Antigenic determinants and functional domains in core antigen and e antigen from hepatitis B virus, *J Virol* 63, Seite 798-808.
- [70] Garcia, P. D.; Ou, J. H.; Rutter, W. J. und Walter, P. (1988): Targeting of the hepatitis B virus precore protein to the endoplasmic reticulum membrane: after signal peptide cleavage translocation can be aborted and the product released into the cytoplasm, *J Cell Biol* 106 [4], Seite 1093-1104. URL: PM:3283145
- [71] Takahashi, K.; Machida, A.; Funatsu, G.; Nomura, M.; Usuda, S.; Aoyagi, S.; Tachibana, K.; Miyamoto, H.; Imai, M.; Nakamura, T.; Miyakawa, Y. und Mayumi, M. (1983): Immunochemical structure of hepatitis B e antigen in the serum, *J Immunol* 130, Seite 2903-2907.
- [72] Chen, M. T.; Billaud, J. N.; Sallberg, M.; Guidotti, L. G.; Chisari, F. V.; Jones, J.; Hughes, J. und Milich, D. R. (2004): A function of the hepatitis B virus precore protein is to regulate the immune response to the core antigen, *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 [41], Seite 14913-14918. URL: PM:15469922
- [73] Milich, D. und Liang, T. J. (2003): Exploring the biological basis of hepatitis B e antigen in hepatitis B virus infection, *Hepatology* 38 [5], Seite 1075-1086. URL: PM:14578844
- [74] Peterson, D. L.; Nath, N. und Gavilanes, F. (1982): Structure of hepatitis B surface antigen. Correlation of subtype with amino acid sequence and location of the carbohydrate moiety, *J Biol Chem* 257 [17], Seite 10414-10420. URL: PM:7107612
- [75] Stibbe, W. und Gerlich, W. H. (1983): Structural relationships between minor and major proteins of hepatitis B surface antigen, *J Virol* 46 [2], Seite 626-628. URL: PM:6842680
- [76] Persing, D. H.; Varmus, H. E. und Ganem, D. (1987): The preS1 protein of hepatitis B virus is acylated at its amino terminus with myristic acid, *J Virol* 61, Seite 1672-1677.
- [77] Eble, B. E.; MacRae, D. R.; Lingappa, V. R. und Ganem, D. (1987): Multiple topogenic sequences determine the transmembrane orientation of the hepatitis B surface antigen, *Mol Cell Biol* 7, Seite 3591-3601.
- [78] Fernholz, D.; Galle, P. R.; Stemler, M.; Brunetto, M.; Bonino, F. und Will, H. (1993): Infectious hepatitis B virus variant defective in pre-S2 protein expression in a chronic carrier, *Virology* 194, Seite 137-148.
- [79] Mehta, A.; Lu, X.; Block, T. M.; Blumberg, B. S. und Dwek, R. A. (1997): Hepatitis B virus (HBV) envelope glycoproteins vary drastically in their sensitivity to glycan processing: evidence that alteration of a single N-linked glycosylation site can regulate HBV secretion, *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, Seite 1822-1827.
- [80] Bruss, V.; Lu, X.; Thomssen, R. und Gerlich, W. H. (1994): Post-translational alterations in transmembrane topology of the hepatitis B virus large envelope protein, *EMBO J* 13, Seite 2273-2279.
- [81] Ostapchuk, P.; Hearing, P. und Ganem, D. (1994): A dramatic shift in the transmembrane topology of a viral envelope glycoprotein accompanies hepatitis B viral morphogenesis, *EMBO J* 13, Seite 1048-1057.
- [82] Prange, R. und Streeck, R. E. (1995): Novel transmembrane topology of the hepatitis B virus envelope proteins, *EMBO J* 14, Seite 247-256.
- [83] Klingmuller, U. und Schaller, H. (1993): Hepadnavirus infection requires interaction between the viral pre-S domain and a specific hepatocellular receptor, *J Virol* 67, Seite 7414-7422.
- [84] Le Seyec, J.; Chouteau, P.; Cannie, I.; Guguen Guillouzo, C. und Gripon, P. (1998): Role of the pre-S2 domain of the large envelope protein in hepatitis B virus assembly and infectivity, *J Virol* 72, Seite 5573-5578.
- [85] Hildt, E. und Hofschneider, P. H. (1998): The PreS2 activators of the hepatitis B virus: activators of tumour promoter pathways, *Recent Results Cancer Res* 154, Seite 315-329.
- [86] Hildt, E.; Urban, S.; Lauer, U.; Hofschneider, P. H. und Kekule, A. S. (1993): ER-localization and functional expression of the HBV transactivator MHBst, *Oncogene* 8, Seite 3359-3367.
- [87] Hildt, E.; Saher, G.; Bruss, V. und Hofschneider, P. H. (1996): The hepatitis B virus large surface protein (LHBs) is a transcriptional activator, *Virology* 225, Seite 235-239.

- [88] Hildt, E.; Munz, B.; Saher, G.; Reifenberg, K. und Hofschneider, P. H. (2002): The PreS2 activator MHBs(t) of hepatitis B virus activates c-raf-1/Erk2 signaling in transgenic mice, *EMBO J* 21 [4], Seite 525-535. URL: PM:11847101
- [89] Stockl, L.; Berting, A.; Malkowski, B.; Foerste, R.; Hofschneider, P. H. und Hildt, E. (2003): Integrity of c-Raf-1/MEK signal transduction cascade is essential for hepatitis B virus gene expression, *Oncogene* 22 [17], Seite 2604-2610. URL: PM:12730674
- [90] Oess, S. und Hildt, E. (2000): Novel cell permeable motif derived from the PreS2-domain of hepatitis-B virus surface antigens, *Gene Ther* 7 [9], Seite 750-758. URL: PM:10822301
- [91] Radziwill, G.; Tucker, W. und Schaller, H. (1990): Mutational analysis of the hepatitis B virus P gene product: domain structure and RNase H activity, *J Virol* 64, Seite 613-620.
- [92] Bartenschlager, R. und Schaller, H. (1988): The amino-terminal domain of the hepadnaviral P-gene encodes the terminal protein (genome-linked protein) believed to prime reverse transcription, *EMBO J* 7, Seite 4185-4192.
- [93] Bartholomeusz, A.; Tehan, B. G. und Chalmers, D. K. (2004): Comparisons of the HBV and HIV polymerase, and antiviral resistance mutations, *Antivir Ther* 9 [2], Seite 149-160. URL: PM:15134177
- [94] Das, K.; Xiong, X.; Yang, H.; Westland, C. E.; Gibbs, C. S.; Sarafianos, S. G. und Arnold, E. (2001): Molecular modeling and biochemical characterization reveal the mechanism of hepatitis B virus polymerase resistance to lamivudine (3TC) and emtricitabine (FTC), *J Virol* 75 [10], Seite 4771-4779. URL: PM:11312349
- [95] Xu, Z.; Yen, T. S.; Wu, L.; Madden, C. R.; Tan, W.; Slagle, B. L. und Ou, J. H. (2002): Enhancement of hepatitis B virus replication by its X protein in transgenic mice, *J Virol* 76 [5], Seite 2579-2584. URL: PM:11836439
- [96] Bouchard, M. J.; Wang, L. H. und Schneider, R. J. (2001): Calcium signaling by HBx protein in hepatitis B virus DNA replication, *Science* 294 [5550], Seite 2376-2378. URL: PM:11743208
- [97] Melegari, M.; Scaglioni, P. P. und Wands, J. R. (1998): Cloning and characterization of a novel hepatitis B virus x binding protein that inhibits viral replication, *J Virol* 72, Seite 1737-1743.
- [98] Melegari, M.; Wolf, S. K. und Schneider, R. J. (2005): Hepatitis B virus DNA replication is coordinated by core protein serine phosphorylation and HBx expression, *J Virol* 79 [15], Seite 9810-9820. URL: PM:16014942
- [99] Leupin, O.; Bontron, S.; Schaeffer, C. und Strubin, M. (2005): Hepatitis B virus X protein stimulates viral genome replication via a DDB1-dependent pathway distinct from that leading to cell death, *J Virol* 79 [7], Seite 4238-4245. URL: PM:15767425
- [100] Murakami, S. (2001): Hepatitis B virus X protein: a multifunctional viral regulator, *J Gastroenterol* 36 [10], Seite 651-660. URL: PM:11686474
- [101] Bouchard, M. J. und Schneider, R. J. (2004): The enigmatic X gene of hepatitis B virus, *J Virol* 78 [23], Seite 12725-12734. URL: PM:15542625
- [102] Arbuthnot, P.; Capovilla, A. und Kew, M. (2000): Putative role of hepatitis B virus X protein in hepatocarcinogenesis: Effects on apoptosis, DNA repair, mitogen-activated protein kinase and JAK/STAT pathways, *J Gastroenterol Hepatol* 15, Seite 357-368.
- [103] Murakami, S. (1999): Hepatitis B virus X protein: structure, function and biology, *Intervirology* 42 [2-3], Seite 81-99. URL: PM:10516464
- [104] Hu, Z.; Zhang, Z.; Doo, E.; Coux, O.; Goldberg, A. L. und Liang, T. J. (1999): Hepatitis B virus X protein is both a substrate and a potential inhibitor of the proteasome complex, *J Virol* 73, Seite 7231-7240.
- [105] Robinson, W. S. (1994): Molecular events in the pathogenesis of hepadnavirus-associated hepatocellular carcinoma, *Annu Rev Med* 45, Seite 297-323. URL: PM:8198385
- [106] Andrisani, O. M. und Barnabas, S. (1999): The transcriptional function of the hepatitis B virus X protein and its role in hepatocarcinogenesis (Review), *Int J Oncol* 15, Seite 373-379.
- [107] Yen, T. S. (1996): Hepadnaviral X Protein: Review of Recent Progress, *J Biomed Sci* 3 [1], Seite 20-30. URL: PM:11725079
- [108] Runkel, L.; Fischer, M. und Schaller, H. (1993): Two-codon insertion mutations of the HBx define two separate regions necessary for its trans-activation function, *Virology* 197, Seite 529-536.
- [109] Parashar, Misra K.; Mukherji, A. und Kumar, V. (2004): The conserved amino-terminal region (amino acids 1-20) of the hepatitis B virus X protein shows a transrepression function, *Virus Res* 105 [2], Seite 157-165. URL: PM:15351489

- [110] Murakami, S.; Cheong, J. H. und Kaneko, S. (1994): Human hepatitis virus X gene encodes a regulatory domain that represses transactivation of X protein, *J Biol Chem* 269 [21], Seite 15118-15123. URL: PM:8195148
- [111] de Franchis, R.; Meucci, G.; Vecchi, M.; Tatarella, M.; Colombo, M.; Del Ninno, E.; Rumi, M. G.; Donato, M. F. und Ronchi, G. (1993): The natural history of asymptomatic hepatitis B surface antigen carriers [see comments], *Ann Intern Med* 118, Seite 191-194.
- [112] Chisari, F. V. und Ferrari, C. (1995): Hepatitis B virus immunopathology, *Springer Semin Immunopathol* 17, Seite 261-281.
- [113] Ganem, D. und Prince, A. M. (2004): Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences, *N Engl J Med* 350 [11], Seite 1118-1129. URL: PM:15014185
- [114] Ferrari, C.; Penna, A.; Bertoletti, A.; Valli, A.; Antoni, A. D.; Giuberti, T.; Cavalli, A.; Petit, M. A. und Fiaccadori, F. (1990): Cellular immune response to hepatitis B virus-encoded antigens in acute and chronic hepatitis B virus infection, *J Immunol* 145, Seite 3442-3449.
- [115] Guidotti, L. G. und Chisari, F. V. (2000): Cytokine-mediated control of viral infections, *Virology* 273 [2], Seite 221-227. URL: PM:10915592
- [116] Guidotti, L. G. und Chisari, F. V. (1996): To kill or to cure: options in host defense against viral infection, *Curr Opin Immunol* 8 [4], Seite 478-483. URL: PM:8794011
- [117] Guidotti, L. G.; Rochford, R.; Chung, J.; Shapiro, M.; Purcell, R. und Chisari, F. V. (1999): Viral clearance without destruction of infected cells during acute HBV infection, *Science* 284, Seite 825-829.
- [118] Webster, G. J. und Bertoletti, A. (2002): Control or persistence of hepatitis B virus: the critical role of initial host-virus interactions, *Immunol Cell Biol* 80 [1], Seite 101-105. URL: PM:11869367
- [119] Webster, G. J.; Reignat, S.; Maini, M. K.; Whalley, S. A.; Ogg, G. S.; King, A.; Brown, D.; Amlot, P. L.; Williams, R.; Vergani, D.; Dusheiko, G. M. und Bertoletti, A. (2000): Incubation phase of acute hepatitis B in man: dynamic of cellular immune mechanisms, *Hepatology* 32 [5], Seite 1117-1124. URL: PM:11050064
- [120] Maini, M. K.; Boni, C.; Lee, C. K.; Larrubia, J. R.; Reignat, S.; Ogg, G. S.; King, A. S.; Herberg, J.; Gilson, R.; Alisa, A.; Williams, R.; Vergani, D.; Naoumov, N. V.; Ferrari, C. und Bertoletti, A. (2000): The role of virus-specific CD8(+) cells in liver damage and viral control during persistent hepatitis B virus infection, *J Exp Med* 191 [8], Seite 1269-1280. URL: PM:10770795
- [121] Baron, J. L.; Gardiner, L.; Nishimura, S.; Shinkai, K.; Locksley, R. und Ganem, D. (2002): Activation of a nonclassical NKT cell subset in a transgenic mouse model of hepatitis B virus infection, *Immunity* 16 [4], Seite 583-594. URL: PM:11970881
- [122] Perrillo, R. P. (2001): Acute flares in chronic hepatitis B: the natural and unnatural history of an immunologically mediated liver disease, *Gastroenterology* 120 [4], Seite 1009-1022. URL: PM:11231956
- [123] Chisari, F. V. und Ferrari, C. (1995): Hepatitis B virus immunopathogenesis, *Annu Rev Immunol* 13, Seite 29-60.
- [124] Günther, S.; Fischer, L.; Pult, I.; Sterneck, M. und Will, H. (1999): Naturally occurring variants of hepatitis B virus, *Adv Virus Res* 52, Seite 25-137.
- [125] Pol, S.; Samuel, D.; Cadranel, J.; Legendre, C.; Bismuth, H.; Brechot, C. und Kreis, H. (2000): Hepatitis and solid organ transplantation, *Transplant Proc* 32 [2], Seite 454-457. URL: PM:10715478
- [126] Lai, M. K. (1998): Viral hepatitis and kidney transplantation, *J Formos Med Assoc* 97, Seite 801-811.
- [127] Fabrizi, F. und Martin, P. (2000): Hepatitis B virus infection in dialysis patients, *Am J Nephrol* 20 [1], Seite 1-11. URL: PM:10644861
- [128] Kelly, C. J. (1994): T cell function in chronic renal failure and dialysis, *Blood Purif* 12 [1], Seite 36-41. URL: PM:7986474
- [129] Kohler, H. und Meuer, S. C. (1994): Effects of interleukin-2 on hepatitis B vaccination in uraemic patients, *Lancet* 344 [8933], Seite 1368-1369. URL: PM:7832889
- [130] Gane, E. und Pilmore, H. (2002): Management of chronic viral hepatitis before and after renal transplantation, *Transplantation* 74 [4], Seite 427-437. URL: PM:12352899

- [131] Fairley, C. K.; Mijch, A.; Gust, I. D.; Nicholson, S.; Dimitrakakis, M. und Lucas, C. R. (1991): The increased risk of fatal liver disease in renal transplant patients who are hepatitis Be antigen and/or HBV DNA positive, *Transplantation* 52, Seite 497-500.
- [132] Parfrey, P. S.; Forbes, R. D.; Hutchinson, T. A.; Kenick, S.; Farge, D.; Dauphinee, W. D.; Seely, J. F. und Guttman, R. D. (1985): The impact of renal transplantation on the course of hepatitis B liver disease, *Transplantation* 39, Seite 610-615.
- [133] Rao, K. V.; Kasiske, B. L. und Anderson, W. R. (1991): Variability in the morphological spectrum and clinical outcome of chronic liver disease in hepatitis B-positive and B-negative renal transplant recipients, *Transplantation* 51 [2], Seite 391-396. URL: PM:1994533
- [134] Preikschat, P.; Günther, S.; Reinhold, S.; Will, H.; Budde, K.; Neumayer, H. H.; Krüger, D. H. und Meisel, H. (2002): Complex hepatitis B virus populations with mutations in core promotor, C gene and pre-S region are associated with development of liver cirrhosis in long-term renal transplant recipients, *Hepatology* 35, Seite 466-477.
- [135] Tur Kaspas, R.; Shaul, Y.; Moore, D. D.; Burk, R. D.; Okret, S.; Poellinger, L. und Shafritz, D. A. (1988): The glucocorticoid receptor recognizes a specific nucleotide sequence in hepatitis B virus DNA causing increased activity of the HBV enhancer, *Virology* 167, Seite 630-633.
- [136] Chou, C. K.; Wang, L. H.; Lin, H. M. und Chi, C. W. (1992): Glucocorticoid stimulates hepatitis B viral gene expression in cultured human hepatoma cells, *Hepatology* 16, Seite 13-18.
- [137] Ohtsu, T.; Sai, T.; Oka, M.; Sugai, Y. und Tobinai, K. (1991): Activation of hepatitis B virus infection by chemotherapy containing glucocorticoid in hepatitis B virus carriers with hematologic malignancies, *Jpn J Clin Oncol* 21, Seite 360-365.
- [138] Kletzmayer, J. und Watschinger, B. (2002): Chronic hepatitis B virus infection in renal transplant recipients, *Semin Nephrol* 22 [4], Seite 375-389. URL: PM:12118403
- [139] Lam, P. W.; Wachs, M. E.; Somberg, K. A.; Vincenti, F.; Lake, J. R. und Ferrell, L. D. (1996): Fibrosing cholestatic hepatitis in renal transplant recipients, *Transplantation* 61, Seite 378-381.
- [140] Trautwein, C.; Schrem, H.; Tillmann, H. L.; Kubicka, S.; Walker, D.; Boker, K. H.; Maschek, H. J.; Pichlmayr, R. und Manns, M. P. (1996): Hepatitis B virus mutations in the pre-S genome before and after liver transplantation, *Hepatology* 24, Seite 482-488.
- [141] Fang, J. W.; Wright, T. L. und Lau, J. Y. (1993): Fibrosing cholestatic hepatitis in patient with HIV and hepatitis B [letter], *Lancet* 342, Seite 1175-1175.
- [142] Davies, S. E.; Portmann, B. C.; O'Grady, J. G.; Aldis, P. M.; Chaggar, K.; Alexander, G. J. und Williams, R. (1991): Hepatic histological findings after transplantation for chronic hepatitis B virus infection, including a unique pattern of fibrosing cholestatic hepatitis, *Hepatology* 13, Seite 150-157.
- [143] Foo, N. C.; Ahn, B. Y.; Ma, X.; Hyun, W. und Yen, T. S. (2002): Cellular vacuolization and apoptosis induced by hepatitis B virus large surface protein, *Hepatology* 36 [6], Seite 1400-1407.
- [144] Zanati, S. A.; Locarnini, S. A.; Dowling, J. P.; Angus, P. W.; Dudley, F. J. und Roberts, S. K. (2004): Hepatic failure due to fibrosing cholestatic hepatitis in a patient with pre-surface mutant hepatitis B virus and mixed connective tissue disease treated with prednisolone and chloroquine, *J Clin Virol* 31 [1], Seite 53-57. URL: PM:15288614
- [145] Liaw, Y. F.; Tai, D. I.; Chu, C. M. und Chen, T. J. (1988): The development of cirrhosis in patients with chronic type B hepatitis: a prospective study, *Hepatology* 8 [3], Seite 493-496. URL: PM:3371868
- [146] Yang, H. I.; Lu, S. N.; Liaw, Y. F.; You, S. L.; Sun, C. A.; Wang, L. Y.; Hsiao, C. K.; Chen, P. J.; Chen, D. S. und Chen, C. J. (2002): Hepatitis B e antigen and the risk of hepatocellular carcinoma, *N Engl J Med* 347 [3], Seite 168-174. URL: PM:12124405
- [147] Wong, D. K.; Cheung, A. M.; O'Rourke, K.; Naylor, C. D.; Detsky, A. S. und Heathcote, J. (1993): Effect of alpha-interferon treatment in patients with hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. A meta-analysis [see comments], *Ann Intern Med* 119, Seite 312-323.
- [148] Tillmann, H. L.; Bock, C. T.; Bleck, J. S.; Rosenau, J.; Boker, K. H.; Barg-Hock, H.; Becker, T.; Trautwein, C.; Klempnauer, J.; Flemming, P. und Manns, M. P. (2003): Successful treatment of fibrosing cholestatic hepatitis using adefovir dipivoxil in a patient with cirrhosis and renal insufficiency, *Liver Transpl* 9 [2], Seite 191-196. URL: PM:12548514
- [149] Opio, C. K.; Lee, W. M. und Kirkpatrick, P. (2005): Entecavir, *Nat Rev Drug Discov* 4 [7], Seite 535-536. URL: PM:16075486

- [150] Hannoun, C.; Horal, P. und Lindh, M. (2000): Long-term mutation rates in the hepatitis B virus genome, *J Gen Virol* 81 Pt 1, Seite 75-83.
- [151] Günther, S.; Sommer, G.; Von Breunig, F.; Iwanska, A.; Kalinina, T.; Sterneck, M. und Will, H. (1998): Amplification of full-length hepatitis B virus genomes from samples from patients with low levels of viremia: frequency and functional consequences of PCR-introduced mutations, *J Clin Microbiol* 36, Seite 531-538.
- [152] Blum, H. E. (1993): Hepatitis B virus: significance of naturally occurring mutants, *Intervirology* 35, Seite 40-50.
- [153] Burda, M. R.; Günther, S.; Dandri, M.; Will, H. und Petersen, J. (2001): Structural and functional heterogeneity of naturally occurring hepatitis B virus variants, *Antiviral Res* 52 [2], Seite 125-138. URL: PM:11672822
- [154] Okamoto, H.; Wang, Y.; Tanaka, T.; Machida, A.; Miyakawa, Y. und 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, Seite 407-414.
- [155] Pumpens, P.; Grens, E. und Nassal, M. (2002): Molecular epidemiology and immunology of hepatitis B virus infection - an update, *Intervirology* 45 [4-6], Seite 218-232. URL: PM:12566704
- [156] Pult, I.; Chouard, T.; Wieland, S.; Klemenz, R.; Yaniv, M. und Blum, H. E. (1997): A hepatitis B virus mutant with a new hepatocyte nuclear factor 1 binding site emerging in transplant-transmitted fulminant hepatitis B, *Hepatology* 25, Seite 1507-1515.
- [157] Günther, S.; Piwon, N.; Iwanska, A.; Schilling, R.; Meisel, H. und Will, H. (1996): Type, prevalence, and significance of core promoter/enhancer II mutations in hepatitis B viruses from immunosuppressed patients with severe liver disease, *J Virol* 70, Seite 8318-8331.
- [158] Schlager, F.; Schaefer, S.; Metzler, M.; Gratzki, N.; Lampert, F.; Gerlich, W. H. und Repp, R. (2000): Quantitative DNA fragment analysis for detecting low amounts of hepatitis B virus deletion mutants in highly viremic carriers, *Hepatology* 32 [5], Seite 1096-1105.
- [159] Günther, S.; Baginski, S.; Kissel, H.; Reinke, P.; Kruger, D. H.; Will, H. und 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, Seite 751-758.
- [160] Kalinina, T.; Riu, A.; Fischer, L.; Will, H. und Sterneck, M. (2001): A dominant hepatitis B virus population defective in virus secretion because of several S-gene mutations from a patient with fulminant hepatitis, *Hepatology* 34 [(2)], Seite 385-394.
- [161] Bock, C. T.; Buerke, B.; Tillmann, H. L.; Tacke, F.; Kliem, V.; Manns, M. P. und Trautwein, C. (2003): Relevance of hepatitis B core gene deletions in patients after kidney transplantation, *Gastroenterology* 124 [7], Seite 1809-1820. URL: PM:12806615
- [162] Marinos, G.; Torre, F.; Gunther, S.; Thomas, M. G.; Will, H.; Williams, R. und Naoumov, N. V. (1996): Hepatitis B virus variants with core gene deletions in the evolution of chronic hepatitis B infection, *Gastroenterology* 111, Seite 183-192.
- [163] Fiordalisi, G.; Primi, D.; Tanzi, E.; Magni, E.; Incarbone, C.; Zanetti, A. R. und Cariani, E. (1994): Hepatitis B virus C gene heterogeneity in a familial cluster of anti-HBc negative chronic carriers, *J Med Virol* 42, Seite 109-114.
- [164] Zoulim, F.; Zhang, X.; Pichoud, C. und Trepo, C. (1996): Heterogeneity of hepatitis B virus (HBV) core gene in a patient with HBV-associated cirrhosis and serum negativity for anti-HBc, *J Hepatol* 24, Seite 155-160.
- [165] Laskus, T.; Rakela, J.; Steers, J. L.; Wiesner, R. H. und Persing, D. H. (1994): Precore and contiguous regions of hepatitis B virus in liver transplantation for end-stage hepatitis B, *Gastroenterology* 107, Seite 1774-1780.
- [166] Gerolami, R.; Henry, M.; Borentain, P.; Colson, P.; Botta, D. und Tamalet, C. (2005): Fulminant hepatitis B associated with a specific insertion in the basal core promoter region of hepatitis B virus DNA after immunosuppressive treatment, *Clin Infect Dis* 40 [4], Seite e24-e27. URL: PM:15712066
- [167] Repp, R.; Keller, C.; Borkhardt, A.; Csecke, A.; Schaefer, S.; Gerlich, W. H. und Lampert, F. (1992): Detection of a hepatitis B virus variant with a truncated X gene and enhancer II, *Arch Virol* 125, Seite 299-304.
- [168] Laskus, T.; Rakela, J.; Tong, M. J.; Nowicki, M. J.; Mosley, J. W. und Persing, D. H. (1994): Naturally occurring hepatitis B virus mutants with deletions in the core promoter region, *J Hepatol* 20, Seite 837-841.
- [169] Bock, C. T.; Tillmann, H. L.; Maschek, H. J.; Manns, M. P. und Trautwein, C. (1997): A preS mutation isolated from a patient with chronic hepatitis B infection leads to virus retention and misassembly, *Gastroenterology* 113, Seite 1976-1982.

- [170] Walter, E.; Keist, R.; Niederost, B.; Pult, I. und Blum, H. E. (1996): Hepatitis B virus infection of tupaia hepatocytes in vitro and in vivo, *Hepatology* 24, Seite 1-5.
- [171] Ren, S. und Nassal, M. (2001): Hepatitis B virus (HBV) virion and covalently closed circular DNA formation in primary tupaia hepatocytes and human hepatoma cell lines upon HBV genome transduction with replication-defective adenovirus vectors, *J Virol* 75 [3], Seite 1104-1116. URL: PM:11152483
- [172] Chisari, F. V. (1996): Hepatitis B virus transgenic mice: models of viral immunobiology and pathogenesis, *Curr Top Microbiol Immunol* 206, Seite 149-173.
- [173] Dandri, M.; Burda, M. R.; Torok, E.; Pollok, J. M.; Iwanska, A.; Sommer, G.; Rogiers, X.; Rogler, C. E.; Gupta, S.; Will, H.; Greten, H. und Petersen, J. (2001): Repopulation of mouse liver with human hepatocytes and in vivo infection with hepatitis B virus, *Hepatology* 33 [4], Seite 981-988. URL: PM:11283864
- [174] Brown, J. J.; Parashar, B.; Moshage, H.; Tanaka, K. E.; Engelhardt, D.; Rabbani, E.; Roy-Chowdhury, N. und Roy-Chowdhury, J. (2000): A long-term hepatitis B viremia model generated by transplanting nontumorigenic immortalized human hepatocytes in Rag-2-deficient mice, *Hepatology* 31 [1], Seite 173-181. URL: PM:10613743
- [175] Ohashi, K.; Marion, P. L.; Nakai, H.; Meuse, L.; Cullen, J. M.; Bordier, B. B.; Schwall, R.; Greenberg, H. B.; Glenn, J. S. und Kay, M. A. (2000): Sustained survival of human hepatocytes in mice: A model for in vivo infection with human hepatitis B and hepatitis delta viruses, *Nat Med* 6 [3], Seite 327-331.
- [176] Ilan, E.; Burakova, T.; Dagan, S.; Nussbaum, O.; Lubin, I.; Eren, R.; Ben Moshe, O.; Arazi, J.; Berr, S.; Neville, L.; Yuen, L.; Mansour, T. S.; Gillard, J.; Eid, A.; Jurim, O.; Shouval, D.; Reisner, Y. und Galun, E. (1999): The hepatitis B virus-trimera mouse: a model for human HBV infection and evaluation of anti-HBV therapeutic agents, *Hepatology* 29, Seite 553-562.
- [177] Dandri, M.; Burda, M. R.; Zuckerman, D. M.; Wursthorn, K.; Matschl, U.; Pollok, J. M.; Rogiers, X.; Gocht, A.; Kock, J.; Blum, H. E.; von Weizsacker, F. und Petersen, J. (2005): Chronic infection with hepatitis B viruses and antiviral drug evaluation in uPA mice after liver repopulation with tupaia hepatocytes, *J Hepatol* 42 [1], Seite 54-60. URL: PM:15629507
- [178] Baumert, T. F.; Yang, C.; Schurmann, P.; Kock, J.; Ziegler, C.; Grulich, C.; Nassal, M.; Liang, T. J.; Blum, H. E. und von Weizsacker, F. (2005): Hepatitis B virus mutations associated with fulminant hepatitis induce apoptosis in primary Tupaia hepatocytes, *Hepatology* 41 [2], Seite 247-256. URL: PM:15660384
- [179] Glebe, D.; Aliakbari, M.; Krass, P.; Knoop, E. V.; Valerius, K. P. und Gerlich, W. H. (2003): Pre-s1 antigen-dependent infection of Tupaia hepatocyte cultures with human hepatitis B virus, *J Virol* 77 [17], Seite 9511-9521. URL: PM:12915565
- [180] Kock, J.; Baumert, T. F.; Delaney, W. E.; Blum, H. E. und von Weizsacker, F. (2003): Inhibitory effect of adefovir and lamivudine on the initiation of hepatitis B virus infection in primary tupaia hepatocytes, *Hepatology* 38 [6], Seite 1410-1418. URL: PM:14647052
- [181] Gripon, P.; Rumin, S.; Urban, S.; Le Seyec, J.; Glaise, D.; Cannie, I.; Guyomard, C.; Lucas, J.; Trepo, C. und Guguen-Guillouzo, C. (2002): Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus, *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 [24], Seite 15655-15660. URL: PM:12432097
- [182] Günther, S.; Li, B. C.; Miska, S.; Kruger, D. H.; Meisel, H. und 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, Seite 5437-5444.
- [183] Yuan, T. T.; Lin, M. H.; Qiu, S. M. und Shih, C. (1998): Functional characterization of naturally occurring variants of human hepatitis B virus containing the core internal deletion mutation, *J Virol* 72, Seite 2168-2176.
- [184] Shih, C. H.; Li, L. S.; Roychoudhury, S. und Ho, M. H. (1989): In vitro propagation of human hepatitis B virus in a rat hepatoma cell line, *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, Seite 6323-6327.
- [185] Sprinzl, M. F.; Oberwinkler, H.; Schaller, H. und Protzer, U. (2001): Transfer of hepatitis B virus genome by adenovirus vectors into cultured cells and mice: crossing the species barrier, *J Virol* 75 [11], Seite 5108-5118. URL: PM:11333892
- [186] Delaney, W. E. 4th und Isom, H. C. (1998): Hepatitis B virus replication in human HepG2 cells mediated by hepatitis B virus recombinant baculovirus, *Hepatology* 28, Seite 1134-1146.
- [187] Delaney, W. E. 4th; Miller, T. G. und Isom, H. C. (1999): Use of the hepatitis B virus recombinant baculovirus-HepG2 system to study the effects of (-)-beta-2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine on replication of hepatitis B virus and accumulation of covalently closed circular DNA, *Antimicrob Agents Chemother* 43, Seite 2017-2026.
- [188] Günther, S.; Piwon, N.; Jung, A.; Iwanska, A.; Schmitz, H. und Will, H. (2000): Enhanced replication contributes to enrichment of hepatitis B virus with a deletion in the core gene, *Virology* 273 [2], Seite 286-299.

- [189] Yuan, T. T.; Lin, M. H.; Chen, D. S. und Shih, C. (1998): A defective interference-like phenomenon of human hepatitis B virus in chronic carriers, *J Virol* 72, Seite 578-584.
- [190] Moriyama, K. (1997): Reduced antigen production by hepatitis B virus harbouring nucleotide deletions in the overlapping X gene and precore-core promoter, *J Gen Virol* 78, Seite 1479-1486.
- [191] Chua, P. K.; Wen, Y. M. und Shih, C. (2003): Coexistence of two distinct secretion mutations (P5T and I97L) in hepatitis B virus core produces a wild-type pattern of secretion, *J Virol* 77 [13], Seite 7673-7676. URL: PM:12805468
- [192] Parekh, S.; Zoulim, F.; Ahn, S. H.; Tsai, A.; Li, J.; Kawai, S.; Khan, N.; Trepo, C.; Wands, J. und Tong, S. (2003): Genome replication, virion secretion, and e antigen expression of naturally occurring hepatitis B virus core promoter mutants, *J Virol* 77 [12], Seite 6601-6612. URL: PM:12767980
- [193] Delaney, W. E.; Yang, H.; Westland, C. E.; Das, K.; Arnold, E.; Gibbs, C. S.; Miller, M. D. und Xiong, S. (2003): The hepatitis B virus polymerase mutation rtV173L is selected during lamivudine therapy and enhances viral replication in vitro, *J Virol* 77 [21], Seite 11833-11841. URL: PM:14557667
- [194] Le Pogam, S. und Shih, C. (2002): Influence of a putative intermolecular interaction between core and the pre-S1 domain of the large envelope protein on hepatitis B virus secretion, *J Virol* 76 [13], Seite 6510-6517. URL: PM:12050364
- [195] Wen, Y. M. (2004): Structural and functional analysis of full-length hepatitis B virus genomes in patients: Implications in pathogenesis, *J Gastroenterol Hepatol* 19 [5], Seite 485-489. URL: PM:15086590
- [196] Lin, X.; Ma, Z. M.; Yao, X.; Zhang, Y. P. und Wen, Y. M. (2002): Replication efficiency and sequence analysis of full-length hepatitis B virus isolates from hepatocellular carcinoma tissues, *Int J Cancer* 102 [5], Seite 487-491. URL: PM:12432551
- [197] Kajiya, Y.; Hamasaki, K.; Nakata, K.; Nakagawa, Y.; Miyazoe, S.; Takeda, Y.; Ohkubo, K.; Ichikawa, T.; Nakao, K.; Kato, Y. und Eguchi, K. (2002): Full-length sequence and functional analysis of hepatitis B virus genome in a virus carrier: a case report suggesting the impact of pre-S and core promoter mutations on the progression of the disease, *J Viral Hepat* 9 [2], Seite 149-156. URL: PM:11876799
- [198] Hasegawa, K.; Huang, J.; Rogers, S. A.; Blum, H. E. und Liang, T. J. (1994): Enhanced replication of a hepatitis B virus mutant associated with an epidemic of fulminant hepatitis, *J Virol* 68, Seite 1651-1659.
- [199] Sterneck, M.; Kalinina, T.; Otto, S.; Gunther, S.; Fischer, L.; Burdelski, M.; Greten, H.; Broelsch, C. E. und Will, H. (1998): Neonatal fulminant hepatitis B: structural and functional analysis of complete hepatitis B virus genomes from mother and infant, *J Infect Dis* 177, Seite 1378-1381.
- [200] Sterneck, M.; Kalinina, T.; Gunther, S.; Fischer, L.; Santantonio, T.; Greten, H. und Will, H. (1998): Functional analysis of HBV genomes from patients with fulminant hepatitis, *Hepatology* 28, Seite 1390-1397.
- [201] Galibert, F.; Mandart, E.; Fitoussi, F.; Tiollais, P. und Charnay, P. (1979): Nucleotide sequence of the hepatitis B virus genome (subtype ayw) cloned in *E.coli*, *Nature* 25 [281(5733)], Seite 646-650.
- [202] Nassal, M. (1988): Total chemical synthesis of a gene for hepatitis B virus core protein and its functional characterization, *Gene* 66 [2], Seite 279-294. URL: PM:2901997
- [203] Cullen, B. R. und Malim, M. H. (1992): Secreted placental alkaline phosphatase as a eukaryotic reporter gene, *Methods Enzymol* 216, Seite 362-368.
- [204] Heermann, K. H.; Goldmann, U.; Schwartz, W.; Seyffarth, T.; Baumgarten, H. und Gerlich, W. H. (1984): Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-s sequence, *J Virol* 52, Seite 396-402.
- [205] Meisel, H.; Sominskaya, I.; Pumpens, P.; Pushko, P.; Borisova, G.; Deepen, R.; Lu, X.; Spiller, G. H.; Kruger, D. H.; Grens, E. und et al (1994): Fine mapping and functional characterization of two immunodominant regions from the preS2 sequence of hepatitis B virus, *Intervirology* 37, Seite 330-339.
- [206] Beterams, G. und Nassal, M. (2001): Significant interference with hepatitis B virus replication by a core-nuclease fusion protein, *J Biol Chem* 276 [12], Seite 8875-8883. URL: PM:11124940
- [207] Nakabayashi, H.; Taketa, K.; Miyano, K.; Yamane, T. und Sato, J. (1982): Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium, *Cancer Res* 42, Seite 3858-3863.
- [208] Knowles, B. B.; Howe, C. C. und Aden, D. P. (1980): Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen, *Science* 209 [4455], Seite 497-499. URL: PM:6248960
- [209] Yuan, T. T.; Faruqi, A.; Shih, J. W. und Shih, C. (1995): The mechanism of natural occurrence of two closely linked HBV precore predominant mutations, *Virology* 211, Seite 144-156.

- [210] Southern, E. M. (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis, *J Mol Biol* 98 [3], Seite 503-517. URL: PM:1195397
- [211] Ronaghi, M. (2001): Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing, *Genome Res* 11 [1], Seite 3-11. URL: PM:11156611
- [212] Uhlmann, K.; Brinckmann, A.; Toliat, M. R.; Ritter, H. und Nurnberg, P. (2002): Evaluation of a potential epigenetic biomarker by quantitative methyl-single nucleotide polymorphism analysis, *Electrophoresis* 23 [24], Seite 4072-4079. URL: PM:12481262
- [213] Chisari, F. V.; Filippi, P.; Buras, J.; McLachlan, A.; Popper, H.; Pinkert, C. A.; Palmiter, R. D. und Brinster, R. L. (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, Seite 6909-6913.
- [214] Gilles, P. N.; Guerrette, D. L.; Ulevitch, R. J.; Schreiber, R. D. und Chisari, F. V. (1992): HBsAg retention sensitizes the hepatocyte to injury by physiological concentrations of interferon-gamma, *Hepatology* 16, Seite 655-663.
- [215] Sommer, G.; van Bommel, F. und Will, H. (2000): Genotype-specific synthesis and secretion of spliced hepatitis B virus genomes in hepatoma cells, *Virology* 271 [2], Seite 371-381. URL: PM:10860890
- [216] Buckwold, V. E.; Xu, Z.; Chen, M.; Yen, T. S. und Ou, J. H. (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, Seite 5845-5851.
- [217] Li, J.; Buckwold, V. E.; Hon, M. W. und Ou, J. H. (1999): Mechanism of suppression of hepatitis B virus precore RNA transcription by a frequent double mutation, *J Virol* 73, Seite 1239-1244.
- [218] Moriyama, K.; Okamoto, H.; Tsuda, F. und 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, Seite 269-280.
- [219] Zheng, Y.; Li, J. und Ou, J. H. (2004): Regulation of hepatitis B virus core promoter by transcription factors HNF1 and HNF4 and the viral X protein, *J Virol* 78 [13], Seite 6908-6914. URL: PM:15194767
- [220] Preikschat, P.; Borisova, G.; Borschukova, O.; Dislers, A.; Mezule, G.; Grens, E.; Kruger, D. H.; Pumpens, P. und Meisel, H. (1999): Expression, assembly competence and antigenic properties of hepatitis B virus core gene deletion variants from infected liver cells, *J Gen Virol* 80, Seite 1777-1788.
- [221] Kazaks, A.; Dishlers, A.; Pumpens, P.; Ulrich, R.; Kruger, D. H. und Meisel, H. (2003): Mosaic particles formed by wild-type hepatitis B virus core protein and its deletion variants consist of both homo- and heterodimers, *FEBS Lett* 549 [1-3], Seite 157-162. URL: PM:12914943
- [222] Preikschat, P.; Kazaks, A.; Dishlers, A.; Pumpens, P.; Kruger, D. H. und Meisel, H. (2000): Interaction of wild-type and naturally occurring deleted variants of hepatitis B virus core polypeptides leads to formation of mosaic particles, *FEBS Lett* 478 [1-2], Seite 127-132. URL: PM:10922483
- [223] Kwon, J. A. und Rho, H. M. (2002): Hepatitis B viral core protein activates the hepatitis B viral enhancer II/pregenomic promoter through the nuclear factor kappaB binding site, *Biochem Cell Biol* 80 [4], Seite 445-455.
- [224] Kawai, K.; Horiike, N.; Michitaka, K. und Onji, M. (2003): The effects of hepatitis B virus core promoter mutations on hepatitis B core antigen distribution in hepatocytes as detected by laser-assisted microdissection, *J Hepatol* 38 [5], Seite 635-641. URL: PM:12713875
- [225] Jazayeri, M. S.; Dornan, E. S.; Boner, W.; Fattovich, G.; Hadziyannis, S. und Carman, W. F. (2004): Intracellular distribution of hepatitis B virus core protein expressed in vitro depends on the sequence of the isolate and the serologic pattern, *J Infect Dis* 189 [9], Seite 1634-1645. URL: PM:15116300
- [226] Serinoz, E.; Varli, M.; Erden, E.; Cinar, K.; Kansu, A.; Uzunalimoglu, O.; Yurdaydin, C. und Bozkaya, H. (2003): Nuclear localization of hepatitis B core antigen and its relations to liver injury, hepatocyte proliferation, and viral load, *J Clin Gastroenterol* 36 [3], Seite 269-272. URL: PM:12590241
- [227] Brandenburg, B.; Gutzeit, C. und Hildt, E. (2005): Intracellular trafficking of hepatitis B virus nucleocapsids, Abstractband der Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Seite 154-154.
- [228] Rabe, B. und Kann, M. (2005): Analysis of the role of the phosphorylation domain of hepatitis B virus capsids for microtubule-dependent intracellular capsid transport, Abstractband der Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Seite 438-438.

- [229] Roingeard, P.; Romet Lemonne, J. L.; Leturcq, D.; Goudeau, A. und 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, Seite 113-120.
- [230] Raney, A. K.; Le, H. B. und McLachlan, A. (1992): Regulation of transcription from the hepatitis B virus major surface antigen promoter by the Sp1 transcription factor, *J Virol* 66, Seite 6912-6921.
- [231] Bock, C. T.; Tillmann, H. L.; Manns, M. P. und Trautwein, C. (1999): The pre-S region determines the intracellular localization and appearance of hepatitis B virus, *Hepatology* 30, Seite 517-525.
- [232] Xu, Z. und Yen, T. S. (1996): Intracellular retention of surface protein by a hepatitis B virus mutant that releases virion particles, *J Virol* 70, Seite 133-140.
- [233] Melegari, M.; Scaglioni, P. P. und Wands, J. R. (1997): The small envelope protein is required for secretion of a naturally occurring hepatitis B virus mutant with pre-S1 deleted, *J Virol* 71, Seite 5449-5454.
- [234] Tai, P. C.; Suk, F. M.; Gerlich, W. H.; Neurath, A. R. und Shih, C. (2002): Hypermodification and immune escape of an internally deleted middle-envelope (M) protein of frequent and predominant hepatitis B virus variants, *Virology* 292 [1], Seite 44-58. URL: PM:11878907
- [235] Tang, H.; Raney, A. K. und McLachlan, A. (2001): Replication of the wild type and a natural hepatitis B virus nucleocapsid promoter variant is differentially regulated by nuclear hormone receptors in cell culture, *J Virol* 75 [19], Seite 8937-8948. URL: PM:11533157
- [236] Misra, K. P.; Mukherji, A. und Kumar, V. (2004): The conserved amino-terminal region (amino acids 1-20) of the hepatitis B virus X protein shows a transrepression function, *Virus Res* 105 [2], Seite 157-165. URL: PM:15351489
- [237] Sahu, G. K.; Tai, P. C.; Chatterjee, S. B.; Lin, M. H.; Tennant, B.; Gerin, J. und Shih, C. (2002): Out-of-frame versus in-frame core internal deletion variants of human and woodchuck hepatitis B viruses, *Virology* 292 [1], Seite 35-43. URL: PM:11878906
- [238] Ninomiya, T.; Hayashi, Y.; Saijoh, K.; Ohta, K.; Yoon, S.; Nakabayashi, H.; Tamaoki, T.; Kasuga, M. und Itoh, H. (1996): Expression ratio of hepatocyte nuclear factor-1 to variant hepatocyte nuclear factor-1 in differentiation of hepatocellular carcinoma and hepatoblastoma, *J Hepatol* 25 [4], Seite 445-453. URL: PM:8912143
- [239] Suk, F. M.; Lin, M. H.; Newman, M.; Pan, S.; Chen, S. H.; Liu, J. D. und Shih, C. (2002): Replication advantage and host factor-independent phenotypes attributable to a common naturally occurring capsid mutation (I97L) in human hepatitis B virus, *J Virol* 76 [23], Seite 12069-12077.
- [240] Yu, X. und Mertz, J. E. (2001): Critical roles of nuclear receptor response elements in replication of hepatitis B virus, *J Virol* 75 [23], Seite 11354-11364. URL: PM:11689616
- [241] Blum, H. E.; Zhang, Z. S.; Galun, E.; von Weizsacker, F.; Garner, B.; Liang, T. J. und Wands, J. R. (1992): Hepatitis B virus X protein is not central to the viral life cycle in vitro, *J Virol* 66, Seite 1223-1227.
- [242] Tang, H.; Delgermaa, L.; Huang, F.; Oishi, N.; Liu, L.; He, F.; Zhao, L. und Murakami, S. (2005): The Transcriptional Transactivation Function of HBx Protein Is Important for Its Augmentation Role in Hepatitis B Virus Replication, *J Virol* 79 [9], Seite 5548-5556. URL: PM:15827169
- [243] Durantel, D.; Carrouee-Durantel, S.; Werle-Lapostolle, B.; Brunelle, M. N.; Pichoud, C.; Trepo, C. und Zoulim, F. (2004): A new strategy for studying in vitro the drug susceptibility of clinical isolates of human hepatitis B virus, *Hepatology* 40 [4], Seite 855-864. URL: PM:15382118
- [244] Fouillot, N.; Tlouzeau, S.; Rossignol, J. M. und Jean Jean, O. (1993): Translation of the hepatitis B virus P gene by ribosomal scanning as an alternative to internal initiation, *J Virol* 67, Seite 4886-4895.
- [245] Cao, F. und Tavis, J. E. (2004): Detection and characterization of cytoplasmic hepatitis B virus reverse transcriptase, *J Gen Virol* 85 [Pt 11], Seite 3353-3360. URL: PM:15483251
- [246] Kalinina, T.; Riu, A.; Fischer, L.; Santantonio, T.; Will, H. und Sterneck, M. (2003): Selection of a secretion-incompetent mutant in the serum of a patient with severe hepatitis B, *Gastroenterology* 125 [4], Seite 1077-1084. URL: PM:14517791
- [247] Possehl, C.; Repp, R.; Heermann, K. H.; Korec, E.; Uy, A. und Gerlich, W. H. (1992): Absence of free core antigen in anti-HBc negative viremic hepatitis B carriers, *Arch Virol Suppl* 4, Seite 39-41.
- [248] Heise, T.; Sommer, G.; Reumann, K.; Meyer, I.; Will, H. und Schaal, H. (2006): The hepatitis B virus PRE contains a splicing regulatory element, *Nucleic Acids Res* 34 [1], Seite 353-363. URL: PM:16410615

- [249] Cartegni, L.; Wang, J.; Zhu, Z.; Zhang, M. Q. und Krainer, A. R. (2003): ESEfinder: A web resource to identify exonic splicing enhancers, *Nucleic Acids Res* 31 [13], Seite 3568-3571. URL: PM:12824367
- [250] Obert, S.; Zachmann Brand, B.; Deindl, E.; Tucker, W.; Bartenschlager, R. und Schaller, H. (1996): A splice hepadnavirus RNA that is essential for virus replication, *EMBO J* 15, Seite 2565-2574.
- [251] Su, T. S.; Lai, C. J.; Huang, J. L.; Lin, L. H.; Yauk, Y. K.; Chang, C. M.; Lo, S. J. und Han, S. H. (1989): Hepatitis B virus transcript produced by RNA splicing, *J Virol* 63, Seite 4011-4018.
- [252] Stutz, F. und Izaurralde, E. (2003): The interplay of nuclear mRNP assembly, mRNA surveillance and export, *Trends Cell Biol* 13 [6], Seite 319-327. URL: PM:12791298
- [253] Tange, T. O.; Nott, A. und Moore, M. J. (2004): The ever-increasing complexities of the exon junction complex, *Curr Opin Cell Biol* 16 [3], Seite 279-284. URL: PM:15145352
- [254] Reed, R. (2003): Coupling transcription, splicing and mRNA export, *Curr Opin Cell Biol* 15 [3], Seite 326-331. URL: PM:12787775
- [255] Soussan, P.; Garreau, F.; Zylberberg, H.; Ferray, C.; Brechot, C. und Kremsdorf, D. (2000): In vivo expression of a new hepatitis B virus protein encoded by a spliced RNA, *J Clin Invest* 105 [1], Seite 55-60. URL: PM:10619861
- [256] Rosmorduc, O.; Petit, M. A.; Pol, S.; Capel, F.; Bortolotti, F.; Berthelot, P.; Brechot, C. und Kremsdorf, D. (1995): In vivo and in vitro expression of defective hepatitis B virus particles generated by spliced hepatitis B virus RNA, *Hepatology* 22, Seite 10-19.
- [257] Chisari, F. V.; Klopchin, K.; Moriyama, T.; Pasquinelli, C.; Dunsford, H. A.; Sell, S.; Pinkert, C. A.; Brinster, R. L. und Palmiter, R. D. (1989): Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus transgenic mice, *Cell* 59, Seite 1145-1156.
- [258] Wang, H. C.; Chang, W. T.; Chang, W. W.; Wu, H. C.; Huang, W.; Lei, H. Y.; Lai, M. D.; Fausto, N. und Su, I. J. (2005): Hepatitis B virus pre-S2 mutant upregulates cyclin A expression and induces nodular proliferation of hepatocytes, *Hepatology* 41 [4], Seite 761-770. URL: PM:15726643
- [259] Wang, H. C.; Wu, H. C.; Chen, C. F.; Fausto, N.; Lei, H. Y. und Su, I. J. (2003): Different types of ground glass hepatocytes in chronic hepatitis B virus infection contain specific pre-S mutants that may induce endoplasmic reticulum stress, *Am J Pathol* 163 [6], Seite 2441-2449. URL: PM:14633616
- [260] Fan, Y. F.; Lu, C. C.; Chang, Y. C.; Chang, T. T.; Lin, P. W.; Lei, H. Y. und Su, I. J. (2000): Identification of a pre-S2 mutant in hepatocytes expressing a novel marginal pattern of surface antigen in advanced diseases of chronic hepatitis B virus infection, *J Gastroenterol Hepatol* 15 [5], Seite 519-528. URL: PM:10847439
- [261] Lenhoff, R. J. und Summers, J. (1994): Construction of avian hepadnavirus variants with enhanced replication and cytopathicity in primary hepatocytes, *J Virol* 68 [9], Seite 5706-5713. URL: PM:8057452
- [262] Vignuzzi, M.; Stone, J. K.; Arnold, J. J.; Cameron, C. E. und Andino, R. (2006): Quasispecies diversity determines pathogenesis through cooperative interactions in a viral population, *Nature* 439 [7074], Seite 344-348. URL: PM:16327776



## Danksagung

Frau Dr. Helga Meisel bin ich zutiefst dankbar für die Möglichkeit, diese Arbeit in ihrer Arbeitsgruppe am Institut für Virologie der Charité Campus Mitte anzufertigen, für die umfassende Betreuung, ihre stetige Diskussionsbereitschaft und für ihr intensives Engagement. Bei Prof. Detlev H. Krüger möchte mich herzlich für seine kontinuierliche Unterstützung und wertvollen Anregungen bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Astrid Schories, Heike Lerch und Brita Auste für ihre exzellente technische Unterstützung bei der Durchführung der Experimente und die stets angenehme Arbeitsatmosphäre. Dr. Anne-Sophie Endres danke ich für viele anregende Diskussionen und Ideen sowie für ihren unvergleichlichen Enthusiasmus.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei allen Kooperationspartnern, die mir hilfsbereit zur Seite standen. Anja Brinckmann, Prof. Dr. Peter Nürnberg und Nico Ruf danke ich für die intensive Unterstützung bei der Etablierung und Durchführung des Pyrosequenzierungs-Assays am Gene Mapping Center des Max-Delbrück-Centrums für Molekulare Medizin, Berlin-Buch. Dr. Tilman Heise (Heinrich-Pette-Institut für Experimentelle Virologie und Immunologie, Hamburg) danke ich für überaus motivierende Diskussionen und die Durchführung der Northern Blots zum Thema des Spleißens. Bei HD Dr. Reinhild Prange (Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Universität Mainz) möchte ich mich für die freundliche Einführung in die Immunfluoreszenzfärbungen, für die Überlassung zahlreicher Antikörper und für anregende Diskussionen bedanken. Dem Robert-Koch-Institut (Berlin) gilt mein Dank für die Möglichkeit, das konfokale Laserscanning-Mikroskop zu nutzen, und dort insbesondere Hi-Gung Bae für ihre technische Unterstützung. PD Dr. Glen Kristiansen und Britta Beyer (Institut für Pathologie, Charité Campus Mitte) danke ich für die Durchführung der immunzytochemischen Färbungen. PD Dr. Stephan Günther (Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Hamburg) sei für die intensiven Diskussionen und Anregungen zu den Ergebnissen gedankt.

Weiterhin möchte ich den vielen Kollegen am Institut für Virologie, insbesondere Angela Kather und Dr. Boris Klempa, danken, die mich durch vielfältige Diskussionen und ihre Hilfsbereitschaft unterstützt und zur Auflockerung des Arbeitsalltags beigetragen haben.

Der Charité danke ich für die finanzielle Unterstützung durch ein Promotionsstipendium. Und nicht zuletzt gilt mein Dank Dr. Fabian Sokolowski, meinen Eltern und allen Freunden für ihre fortwährende, unersetzliche Unterstützung im Leben außerhalb der Wissenschaft.



---

## Publikationen

### Artikel

**Märschenz, S.**, Endres A.-S., Brinckmann, A., Heise, T., Kristiansen, G., Nürnberg, P., Krüger, D.H., Günther, S., Meisel, H. Functional analysis of complex hepatitis B virus variants associated with development of liver cirrhosis. *Gastroenterology* 2006; 131:765–780.

**Märschenz, S.**, Brinckmann, A., Nürnberg, P., Krüger, D.H., Günther, S., Meisel, H. Enhanced replication and enrichment of complex hepatitis B virus variants associated with development of cirrhosis in renal transplant recipients. (Manuskript erstellt).

### Vorträge

**Märschenz, S.**, Endres A.-S., Brinckmann, A., Heise, T., Nürnberg, P., Günther, S., Meisel, H. Functional analysis of complex HBV variants associated with development of liver cirrhosis in renal transplant recipients. International HBV Meeting: Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Heidelberg, September 2005

**Märschenz, S.** Phenotypic characterization of complex HBV variants in immuno-suppressed patients with liver cirrhosis. Forschungswochenende des Zentrums für Infektionsbiologie und Immunität (ZIBI). Zeuthen, September 2004

**Märschenz, S.** Strukturelle und funktionelle Besonderheiten von Mutanten des Hepatitis-B-Virus bei Nierentransplantierten. Wissenschaftliches Festkolloquium aus Anlass des 80. Geburtstages von Prof. Dr. Hans-Alfred Rosenthal. Berlin, September 2004

**Märschenz, S.** Phenotypic characterization of complex HBV variants. 14th European Student Conference (ESC). Berlin, November 2003

**Märschenz, S.**, Endres A.-S., Brinckmann, A., Nürnberg, P., Krüger, D.H., Meisel, H. Complex hepatitis B virus variants accumulating during development of liver cirrhosis under immunosuppression show a “high replication” phenotype. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie (GfV). Berlin, März 2003

**Märschenz, S.**, Endres A.-S., Meisel, H. Functional analysis of HBV populations with a complex mutation pattern derived from an immunosuppressed patient with end stage liver disease. 12th European Students' Conference (ESC). Berlin, November 2001

## Poster

**Märschenz, S.**, Heise, T., Krüger, D.H., Meisel, H. The major spliced pregenomic RNA is strongly reduced in complex hepatitis B virus variants. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie (GfV). München, März 2006

**Märschenz, S.**, Endres A.-S., Brinckmann, A., Nürnberg, P., Krüger, D.H., Meisel, H. Functional analysis of hepatitis B virus hybrid genomes with core promoter and C gene mutations, derived from complex HBV variants associated with liver cirrhosis in immuno-suppressed patients. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie (GfV). Hannover, März 2005

**Märschenz, S.**, Endres A.-S., Brinckmann, A., Nürnberg, P., Krüger, D.H., Meisel, H. Phenotype of complex hepatitis B virus variants associated with liver cirrhosis in immuno-suppressed patients. International HBV Meeting: Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Marine Biology Institute, Woods Hole, Massachusetts, USA, Oktober 2004

Lichtfuss, G., **Märschenz, S.**, Hildt, E., Meisel, H. Functional analysis of naturally occurring hepatitis B virus X protein mutants associated with liver cirrhosis in immunosuppressed patients. International HBV Meeting: Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Marine Biology Institute, Woods Hole, Massachusetts, USA, Oktober 2004

**Märschenz, S.**, Endres A.-S., Kristiansen, G., Krüger, D.H., Meisel, H. Phenotypic characterization of complex hepatitis B virus variants. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie (GfV). Tübingen, März 2004

Schmidt, S., Endres A.-S., **Märschenz, S.**, Krüger, D.H., Meisel, H. Phenotypic susceptibility of hepatitis B virus variants from immunosuppressed patients to nucleoside analogues. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie (GfV). Tübingen, März 2004

**Märschenz, S.**, Endres A.-S., Kristiansen, G., Meisel, H. Characterization of the phenotype of complex hepatitis B virus variants. International HBV Meeting: Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Bergamo, Italien, September 2003

**Märsch**enz, S., Endres A.-S., Brinckmann, A., Nürnberg, P., Krüger, D.H., Meisel, H. The accumulation of complex hepatitis B virus variants with a high replication phenotype is associated with development of liver cirrhosis in an immunosuppressed patient. 7. Kongress für Infektionskrankheiten und Tropenmedizin. Berlin, Februar 2003. Abstract in Infection 2003; 31(Suppl 1):125.

**Märsch**enz, S., Endres A.-S., Meisel, H. High replication phenotype of complex HBV variants accumulating during development of liver cirrhosis in an immunosuppressed patient. International HBV Meeting: Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Asilomar, Kalifornien, USA, September/Oktober 2002

**Märsch**enz, S., Endres A.-S., Krüger, D.H., Meisel, H. Functional analysis of HBV variants derived from an immunosuppressed patient with endstage liver disease in hepatoma cells. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie (GfV). Erlangen, April 2002



## **Selbständigkeitserklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit „Funktionelle Analyse von komplexen Hepatitis-B-Virus-Varianten, assoziiert mit Leberzirrhose bei Immunsupprimierten“ selbständig verfasst und alle verwendeten Hilfsmittel und Quellen angegeben habe.

Berlin, Mai 2006

Stefanie Märschencz



# Anhang

Tabelle A.1: Mutationen der analysierten HBV-Klone des Patienten A.

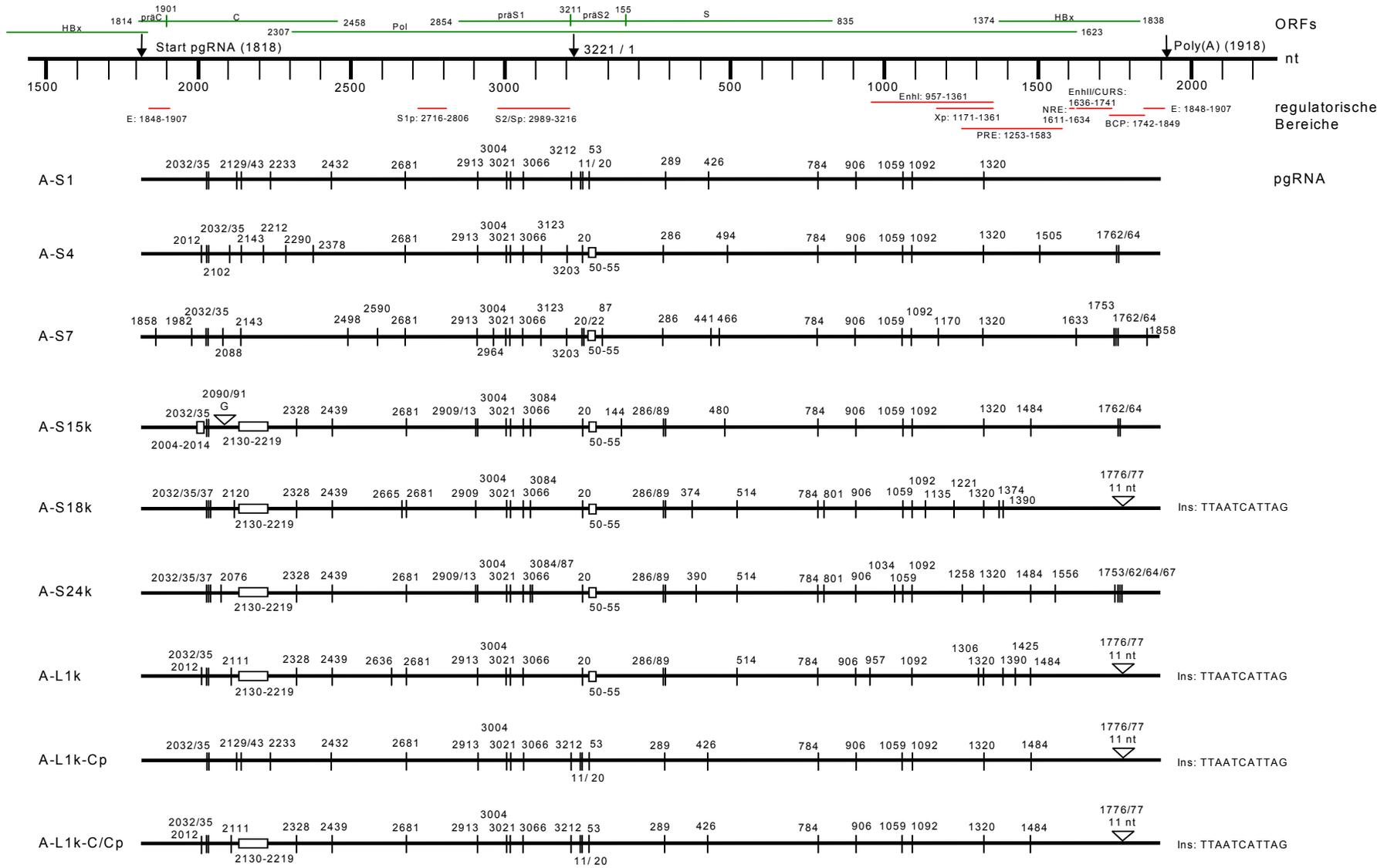
Klon	Da- tum	Var Typ	Mutationen										
			Cp/EnhII, nt 1611– 1741	BCP, nt 1742–1849	S1p, nt 2716–2806	S2/Sp, nt 2989–3216	EnhI, nt 957–1361	Core, AS 1–185	präS1, AS 1–119	präS2, AS 120–174	S, AS 1–226	X, AS 1–154	Polymerase, AS 1–845
alle Klone des Patienten				1790 C>T		3004 G>C, 3021 C>T, 3066 C>T	1092 C>T, 1320 G>A	P171Q (GtD)	V48I, D51H, R66G	T130A	S210R		H36N (GtD), I71V (GtD), L125F, R230H, R233P, P239Q, S240G (GtD), K248R, R254W, N312S, L344I (GtD), S402T, S567A, S601V (GtD)
A-S1	07/92	A				3212 T>C	1059 T>C	E77Q, V93M (GtD), S178T		präS2-Start M>T, F127V, L141F (GtD)	L91P		D42E, S203P, L309R, S323F (GtD)
A-S4	07/92	B		1762 A>T, 1764 G>A		3123 A>G, 3203 C>T	1059 T>C	E46H, R160G	P117L	Del 140–141	T114A	n.a.	n.a.
A-S7	01/93	B	NRE: 1633 A>G	1753 T>C, 1762 A>T, 1764 G>A			1059 T>C			Del 140–141; N152S	V96G	n.a.	n.a.
A-S15k	11/93	E		1762 A>T, 1764 G>A,		3084 G>A	1059 T>C	fsh ab AS 36, T62*	P19L, W77*	Del 140–141; P171H	L109P	K130M, V131I	F8L, L45F, S203P, E260K, P261T, Del 322–323, S324A, I401V, S800Y
A-S18k	11/95	J		Ins 1776/77		3084 G>A	1059 T>C, 1135 A>C, 1221 A>C	Del 77–106; E46G, N74D, C107G, L143P, S180F	P19L, W77*	Del 140–141	W74G, L216*	X-Start M>L	F8L, L45F, T120I, E260K, Del 322–323, S324A, I401F, L430R, M477V, M684L (GtD), T769A (GtD)
A-S19k	11/95	E		1753 T>C, 1762 A>T, 1764 G>A	2783 A>C		n.a.	Del 77–106; C107G, L143P		Del 140–141; I174S	L216 *	n.a.	n.a.
A-S22k	05/96	J		Ins 1776/77		3207 G>T, neues ATG	n.a.	Del 77–106; Y38H, H51R, C107G	N39S, Q119H	Del 140–141	G119S	n.a.	n.a.
A-S23k	05/96	E		1753 T>C, 1762 A>T, 1764 G>A		3084 G>A	n.a.	Del 77–106; C107G	W77*	Del 140–141	R73H, G185R, I213V, L216*	n.a.	n.a.
A-S24k	05/96	E		1753 T>C, 1762 A>T, 1764 G>A; 1767T>C		3084 G>A, 3087 C>A	1034 A>G, 1059 T>C, 1258 C>T	Del 77–106; E46G, C107G, I59T, E76G, L143P, S180F	P19L; W77*	Del 140–141	R79H, L216*	I127T, K130M, V131I, F132L	F8L, L45F, S203P, E260K, P261T, Del 322–323, S324A, I401V, M477V, Q650R, S800Y, V824A
A-L1k	07/96	J		Ins 1776/77			1306 C>T	Del 77–106; Y38H, W71G, C107G, L143P, S180 F		Del 140–141	Y6C (GtD), G135V, G136N, C137H, R138*		F8L, L45F, S203P, Del 322–323, S324A, I401V, M477V, R741W, T769A (GtD), S800Y,
A-L2k	07/96	F		Del 1763–1770		3084 G>A	n.a.	Del 77–106, C107G, W125C, L143P, Q179R	P19L, D42N, W77*	Del 140–141		n.a.	n.a.
A-L3k	07/96	J		Ins 1776/77		3085 A>G, 3158 G>A	n.a.	Del 77–106; S21F, C107G, T142P, L143P, S180V	S78G, G102E	Del 124–141	E2G, Q30P, N40S, T125M (GtD)	n.a.	n.a.
A-L6k	07/96	E		1753 T>C, 1762 A>T, 1764 G>A		3066 C1, Del 3214–57, 3212 T>C	n.a.	Del 77–106; C107G, A131V, L143P, T162P		präS2-Start M>T; Del 121–142		n.a.	n.a.
A-L7k	07/96	J		Ins 1776/77		3084 G>A, 3212 T>C	n.a.	Del 77–106; Y38P, C107G, S180F	P19L, W77*	präS2-Start M>T; Del 140–141	G130S	n.a.	n.a.
A-L8k	07/96	E		1753 T>C, 1762 A>T, 1764 G>A		Del 3045–3089, 3090 T>C, 3155 C>A, 3163 C>A, Del 3176–5	n.a.	Del 77–106, C107G, L143P, S180F	P19L, N37H, Del 65–79, S101*, Del 108–119	Del 120–124, Del 140– 141		n.a.	n.a.

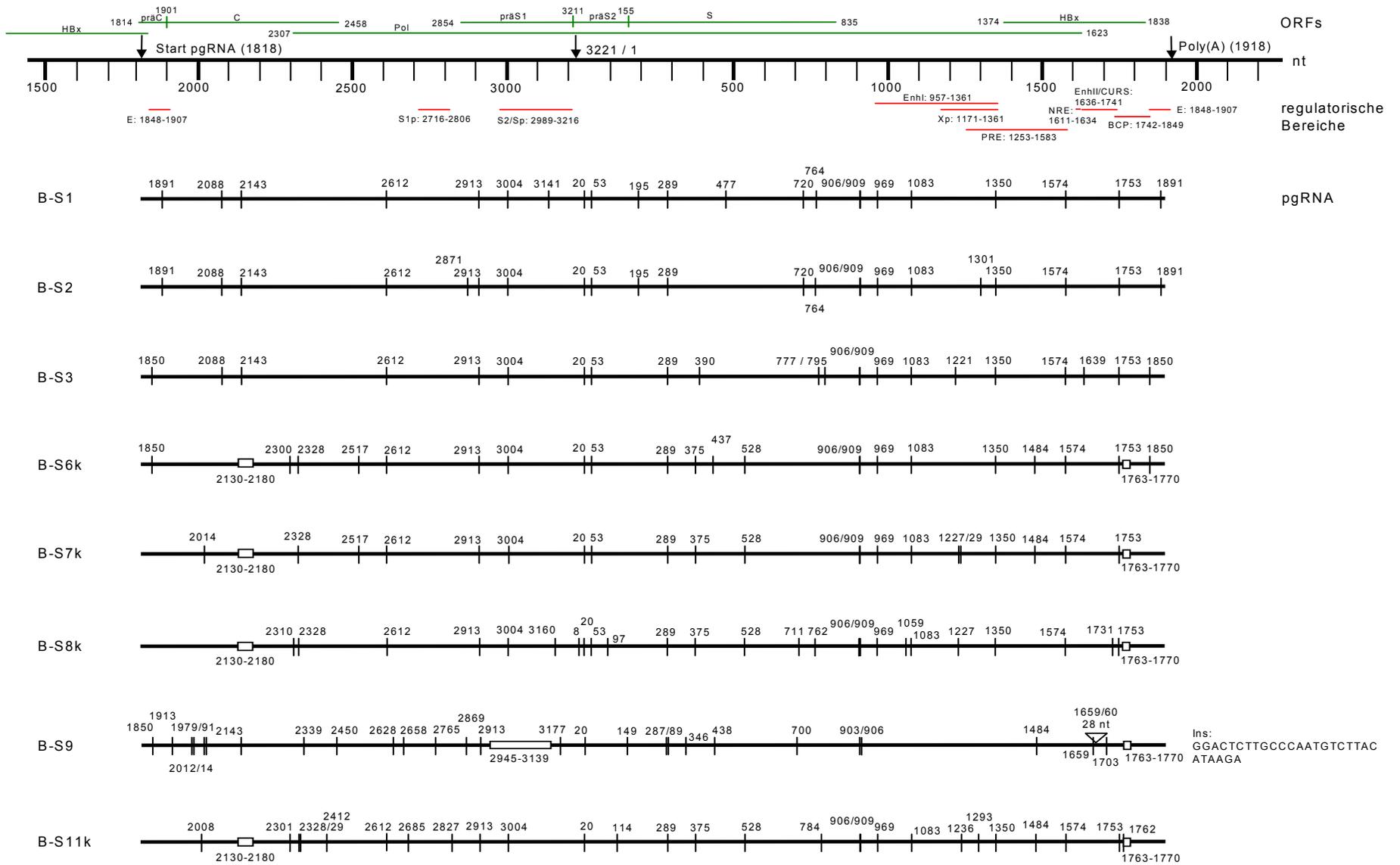
Mutationen sind im Vergleich zur Sequenz des Referenz-Wt-Genoms des Genotyps A (Valenzuela, GenBank-Nr. X02763) angegeben. Die nt wurden von der einzigen *EcoRI*-Schnittstelle des HBV-Genoms, die AS jeweils vom Core-, präS1-, S-, X- und Polymerase-Startkodon gezählt. Grau hinterlegte Klone wurden für die detaillierten Analysen verwendet. Keines der Genome hatte Mutationen im präC-Bereich. Abkürzungen: \* = Stoppkodon, AS = Aminosäure, BCP = basaler Core-Promotor, Cp = Core-Promotor, Del = Deletion, fsh = *frameshift*, Enh = Enhancer, GtD = Mutationen, die dem Genotyp D-Wt-Genom (Galibert, V01460) entsprechen, Ins = Insertion, n.a. = nicht analysiert, nt, Nukleotide, S1p = S1-Promotor, S2/Sp = präS2/S-Promotor

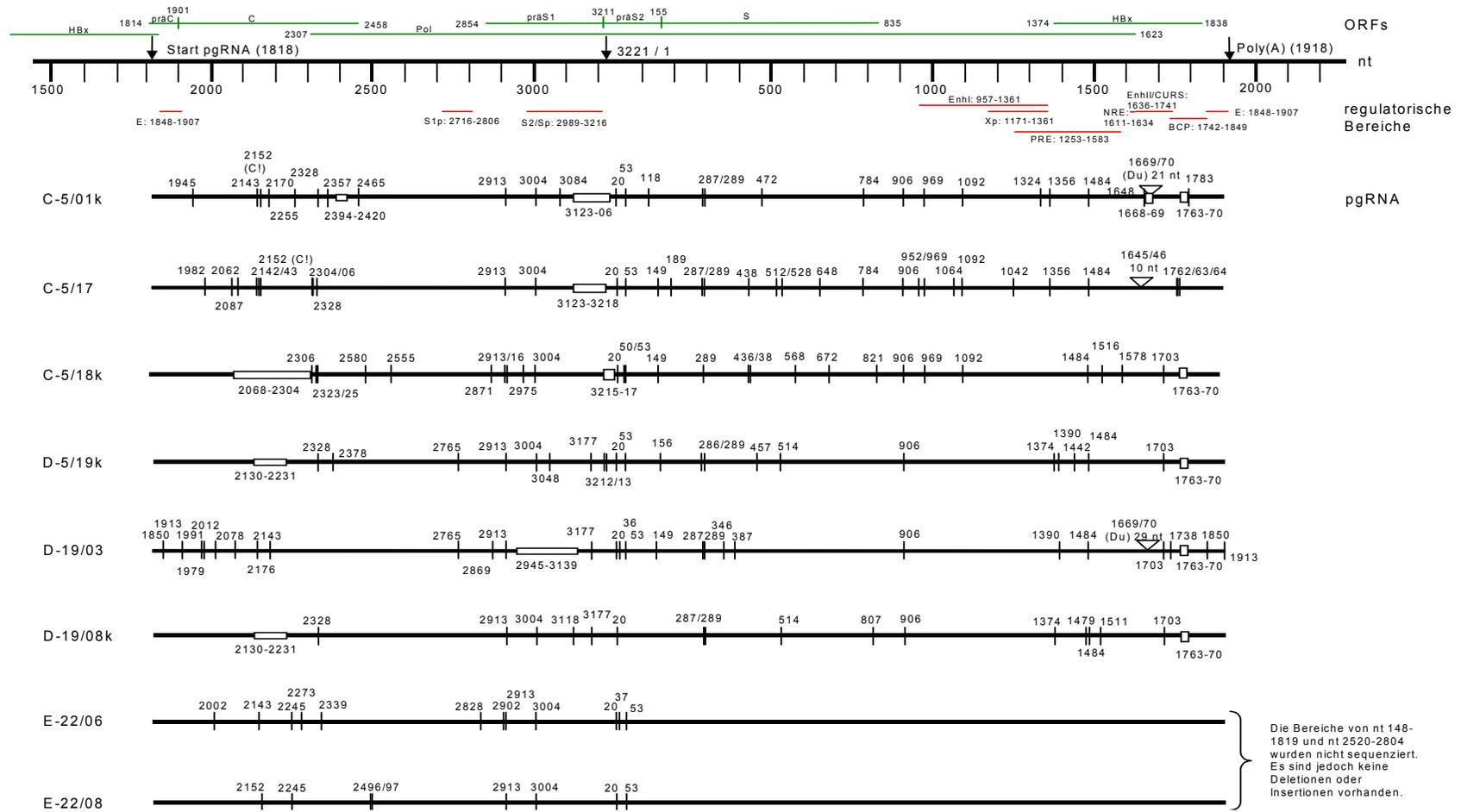
**Tabelle A.2: Mutationen der analysierten HBV-Klone des Patienten B.**

Klon	Datum	Var Typ	Mutationen										
			Cp/ EnhII, nt 1611–1741	BCP, nt 1742–1849	S1p, nt 2716–2806	S2/Sp, nt 2989–3216	EnhI, nt 957–1361	Core, AS 1–185	präS1, AS 1–119	präS2, AS 120–174	S, AS 1–226	X, AS 1–154	Polymerase, AS 1–845
alle Klone des Patienten					2790C>A (GtD)	2995 G>A (GtD), 3004 G>C, 3024 A>G (GtD), 3049 A>G (GtD)		P171Q (GtD)	I48V, D51H, R66G (GtD)	T130A			H36N (GtD), S203P, R230H, R233P, N312S, S240G (GtD), K248R, S402T
B-S1	05/93	A		1753 T>C		3141 C>A	969 G>A, 1083 A>G (GtD), 1350 C>T	G63V, V93M (GtD)		L141F (GtD)	V14G, P108H, T189I, S204R	I127T	H279Y, S323F (GtD), K560T, V830D (GtD)
B-S2	05/93	A		1753 T>C			969 G>A, 1083 A>G (GtD), 1301 G>A, 1350 C>T	G63V, V93M (GtD)		L141F (GtD)	V14G, T189I, S204R	I127T	K189E, S323F (GtD), K560T, R739H V830D (GtD)
B-S3	05/93	A		1753 T>C			969 G>A, 1083 A>G (GtD), 1221 A>C, 1350 C>T	G63V, V93M (GtD)		L141F (GtD)	R79H, I208T, P214L	L89P, I127T	S323F (GtD), V830D (GtD)
B-S4k	12/95	D		1753 T>C; 1762 A>T, Del 1763–70	n.a.	n.a.	n.a.	Del 77–93, L143P	n.a.	n.a.	n.a.	I127T, K130?, V131I, F132R, V133R, G135* (aus Cp, Rest n.a.)	n.a.
B-S5k	12/95	E		1753 T>C, 1762 A>T, 1764 G>A	n.a.	n.a.	ab nt 1230 sequenziert: 1350 C>T	L19S, Del 77–93, L143P	n.a.	n.a.	n.a.	I127T, K130M, V131I (aus Cp, Rest n.a.)	n.a.
B-S6k	12/95	D		1753 T>C; Del 1763–70			969 G>A, 1083 A>G (GtD), 1350 C>T	Del 77–93, P134L, L143P		L141F (GtD)	W74*	I127T, K130N, V131I, F132R, V133R, G135*	F8L, I71V, S323F (GtD), I451T, S800Y, V830D (GtD)
B-S7k	12/95	D		1753 T>C; Del 1763–70			969 G>A, 1083 A>G (GtD), 1227 T>C, 1229 A>G 1350 C>T	Del 77–93, L143P		L141F (GtD)	W74*	I127T, K130N, V131I, F132R, V133R, G135*	F8L, I71V, S323F (GtD), Q715R, S800Y, V830D (GtD)
B-S8k	12/95	D	1731 T>C,	1753 T>C; Del 1763–70		3160 A>C	969 G>A, 1059 T>A, 1083 A>G (GtD), 1227 T>C, 1350 C>T	Del 77–93, A137D, L143P		A126P, L141F (GtD)	W74*	W120R, I127T, K130N, V131I, F132R, V133R, G135*	P2T, F8L, K285T, C308S, S323F (GtD), E338K, V830D (GtD)
B-S9	02/96	C	Alpha-Box:1659 A>G, Ins 1759/60 (28 nt); Beta-Box: 1703 C>T	Del 1763–70	2765T>G	Del 2945–3139, 3177 C>T		P4T, V27I, L31V, Y38H, L60V, V93M, T147A, Q184*	S6P, Del 31–95, S96A	T173A	S45A, L95*	R96G, G99A, L100Q, P101C, A102L, M103T, S104*	Y118H, I188T, Del 214-278, L291F, D355G, I401S, V539I, S800Y
B-S11k	02/96	D		1753 T>C; Del 1763–70			969 G>A, 1083 A>G (GtD), 1236 G>A, 1293 T>C, 1350 C>T	Del 77–93, P134L, L143P		L141F (GtD), I161T	W74*	I127T, K130N, V131I, F132R, V133R, G135*	F8P, L127I, P174L, M717I, S800Y, V830D (GtD)

Mutationen sind im Vergleich zur Sequenz des Referenz-Wt-Genoms des Genotyps A (Valenzuela, GenBank-Nr. X02763) angegeben. Die nt wurden von der einzigen *EcoRI*-Schnittstelle des HBV-Genoms, die AS jeweils vom Core-, präS1-, S-, X- und Polymerase-Startkodon gezählt. Grau hinterlegte Klone wurden für die detaillierten Analysen verwendet. Keines der Genome hatte AS-Austausche im präC-Bereich. Abkürzungen: \* = Stoppkodon, AS = Aminosäure, BCP = basaler Core-Promotor, Cp = Core-Promotor, Del = Deletion, fsh = *frameshift*, Enh = Enhancer, GtD = Mutationen, die dem Genotyp D-Wt-Genom (Galibert, V01460) entsprechen, Ins = Insertion, n.a. = nicht analysiert, nt, Nukleotide, S1p = S1-Promotor, S2/Sp = präS2/S-Promotor







**Abbildung A.1: Darstellung der Mutationen auf der pgRNA analysierter HBV-Genome.** Oben sind die Nukleotidpositionen als Lineal, die ORFs und die regulatorischen Bereiche des HBV-Genoms (Genotyp A) schematisch dargestellt. Die Zählung beginnt an der einzigen *EcoRI*-Schnittstelle des HBV-Genoms. Die pgRNA diverser analysierter HBV-Genome der Patienten A–E ist als horizontale Linie gezeigt. Die Nukleotidaustausche (Strich), Insertionen (Dreieck) und Deletionen (Rechteck) sind im Vergleich zur Sequenz des Wt-Genoms des Genotyps A (Valenzuela, X02763) mit ihren Positionen auf dem Genom angegeben. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind Austausche, die bei allen Klonen eines Patienten auftraten und mit der Sequenz des Referenz-Wt-Genoms des Genotyps D (Galibert, V01460) identisch waren, nicht aufgeführt.