

Relevanz des serologischen Nachweises von Hepatitis-B-Virusgenomen mit der Polymerase-Kettenreaktion bei Schwangeren für das Risiko der perinatalen Virusübertragung

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Johanna Grenzebach, geb. Grathwohl

aus Schwenningen

Giessen 2000

Aus dem Medizinischen Zentrum für Kinderheilkunde
Abteilung Hämatologie und Onkologie
Leiter: Prof. Dr. med. A. Reiter
des Klinikums der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Prof. Dr. med. R. Repp

Gutachter: Prof. Dr. phil. nat. W.H. Gerlich

Tag der Disputation: 26. April 2001

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Grathwohl J, Ndumbe P, Leke R, Uy A, Gerlich WH, Repp R (1992): Perinatale Hepatitis-B-Virusübertragung (Risk of perinatal hepatitis B virus transmission in mothers with low viral DNA levels detectable by the polymerase chain reaction). *Monatsschr Kinderheilkd* 140:366-368

Grathwohl J, Ndumbe P, Ayuk-Takem J, Repp R, Uy A, Gerlich WH, Wolf H (1991): Mode of hepatitis B virus transmission in Cameroon. *Trop Med Parasitol* 42:448

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	5
2	Literaturübersicht	7
2.1	Virologische Aspekte	7
2.1.1	Klassifikation der Hepadnaviren	7
2.1.2	Struktur des Hepatitis B Virus	8
2.1.3	Struktur des Virusgenoms	9
2.1.4	Replikation des Genoms und Synthese viraler Boten-RNA	12
2.1.5	Virale Proteine	14
2.1.6	Virusreplikation	17
2.2	Epidemiologische und klinische Aspekte	18
2.2.1	Verlaufsformen der Hepatitis B	18
2.2.2	Akute Hepatitis B	18
2.2.3	Chronische Hepatitis B	19
2.2.4	Immunkomplex-assoziierte Krankheitssyndrome	19
2.2.5	Serologische Infektionsparameter	20
2.2.6	Übertragungsmodus	20
2.2.7	Virusräger und Epidemiologie	21
2.2.8	Primäres hepatozelluläres Karzinom	22
2.2.9	Impfung	23
2.2.10	Therapie	24
3	Patientenkollektiv und Methoden	25
3.1	Patientenkollektiv	25
3.1.1	Probenentnahme	25
3.2	Immunologische Methoden (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)	26
3.2.1	Nachweis von HBsAg	26
3.2.2	Nachweis von HBeAg	27
3.2.3	Nachweis von Anti-HBc	27
3.3	Molekularbiologische Methoden	27
3.3.1	Isolierung von HBV-Partikeln aus Serum	27
3.3.2	Nukleinsäure-Isolierung	28
3.3.3	Reinigung von DNA vor enzymatischen Reaktionen	28
3.3.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	29
3.3.5	Agarosegel-Elektrophorese	32
3.3.6	DNA-Sequenzierungsreaktion nach Sanger	35
3.3.7	Schneiden der DNA mit Restriktionsenzymen	33
3.3.8	Ligase-Reaktion	33
3.3.9	Herstellen kompetenter Bakterien	34
3.3.10	Herstellen von Agarplatten	34
3.3.11	Transformation kompetenter Bakterien	34
3.3.12	Isolierung klonierter Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen	35
3.3.13	HBV-DNA-Nachweis durch Southern-blot-Analyse	38
4	Ergebnisse	39
4.1	Serologische Ergebnisse	39
4.1.1	Untersuchungen der Mütter	39
4.1.2	Untersuchungen der Kinder	41
4.2	HBV-Genotypisierung mittels Multiplex-Polymerase-Kettenreaktion	42
4.3	Sequenzanalyse der Prä-S-Region eines einzelnen Virusisolats	43
5	Diskussion	48
5.1	Serologische Befunde bei der chronischen HBV-Infektion	48
5.1.1	HBV-Marker im Serum der Mütter	49
5.1.2	HBV-Marker im Serum der Neugeborenen	50
5.2	Eignung der Polymerase-Kettenreaktion zur Beurteilung des Risikos einer perinatalen HBV-Übertragung ...	51
6	Zusammenfassung	53
7	Literaturverzeichnis	55
8	Material	75
9	Liste der verwendeten Abkürzungen	80

1 Einleitung

Die Beobachtung, daß nach perkutaner Exposition von humanem Serum oder Blut eine akute Hepatitis auftreten kann, wurde schon vor über 100 Jahren berichtet (Lürman 1855). Es dauerte jedoch bis 1965, als erstmals ein mit der Erkrankung assoziiertes Antigen nachgewiesen werden konnte (Blumberg et al. 1965), das in der Folge als Hepatitis-B-surface-Antigen (HBsAg), ein Hüllprotein des Hepatitis-B-Virus (HBV), identifiziert wurde (Blumberg et al. 1967).

Die Hepatitis B ist ein Gesundheitsproblem von globalem Ausmaß: Die Zahl der chronischen Hepatitis-B-Virusträger wird weltweit auf etwa 300 Millionen geschätzt. Sie stellen das entscheidende Erregerreservoir für neue Infektionen dar (Maynard, 1990; Sherlock, 1990). Hauptendemiegebiete sind Südostasien und das tropische Afrika, wo über 10% der Bevölkerung chronische HBV-Träger sind (Prince et al. 1991; Schoub, 1992; Prince, 1990; Lingao et al. 1989; Chang et al. 1989) (**siehe Abb.1**). Die Primärinfektion erfolgt dort überwiegend perinatal oder im frühen Kindesalter (Norkrans, 1990; Bortolotti et al. 1993; Vall Mayans et al. 1990). In epidemiologischen Studien wurde die Bedeutung des HBV für das hepatozelluläre Karzinom (HCC), eines der häufigsten Krebsarten der Welt, eindeutig herausgestellt. Das Risiko für die Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms ist, im Vergleich zur nicht-infizierten Bevölkerung, für einen chronischen HBV-Träger über 200fach erhöht (Beasley et al. 1981). HBV-assoziierte Lebererkrankung, wie die Leberzirrhose und das hepatozelluläre Karzinom, sind in den genannten Regionen Hauptmortalitätsursachen. Über 250.000 Menschen sterben jährlich weltweit an den Folgen Hepatitis B Virus-assoziiierter akuter und chronischer Lebererkrankungen (Colombo, 1992; Shapiro et al. 1990; Norkrans, 1990; Feitelson, 1992; Okuda, 1992). Voraussetzung für effektive Bekämpfungstrategien sind sensitive Methoden zum Nachweis der Infektiosität. Entscheidend ist hierbei der Nachweis viraler DNA. Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) übertrifft die bisher bekannten Methoden zum Nachweis viraler Genome um mehrere Zehnerpotenzen (Larzul et al. 1990; Kaneko et al. 1990; Pereira et al. 1994). Sogar bei fehlender Nachweisbarkeit von Hepatitis B Virus-Antigenen oder gegen sie gerichteter Antikörper konnte bei einigen Patienten mit chronischen Lebererkrankungen mittels PCR HBV-DNA im Serum gefunden werden (Thiers et al. 1988; Murakami et al. 1994; Scotto et al. 1983; Lai et al. 1994; Liaw et al. 1991). Hieraus ergab sich die Frage, inwieweit Patienten mit solch niedrigen HBV-DNA-Titern im Serum als infektiös einzustufen sind.

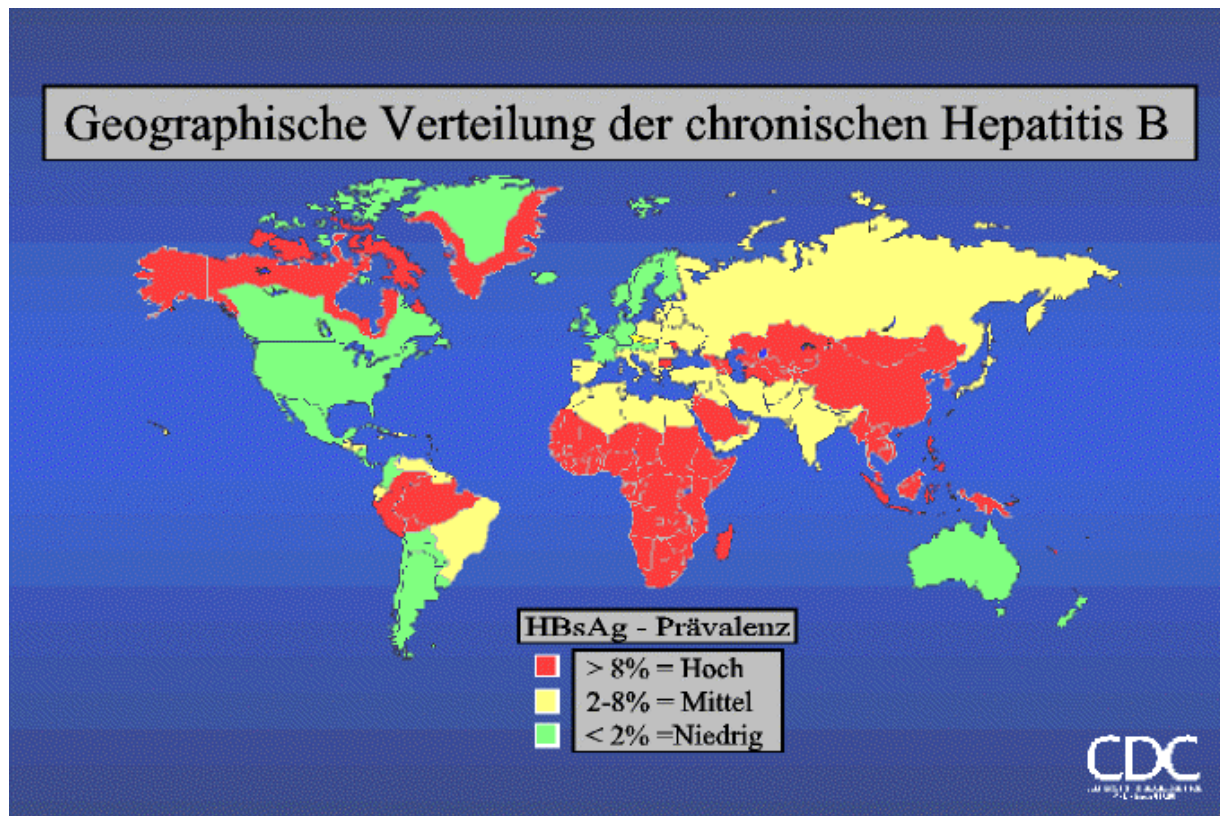


Abb.1: Geographische Verteilung der chronischen Hepatitis B
(Quelle: Center of Disease Control and Prevention, USA)

Da der perinatale Infektionsweg mit einem besonders hohen Risiko für eine Virus-Übertragung behaftet ist, untersuchten wir die Eignung dieser HBV-DNA-Bestimmung als Screeningverfahren bei Schwangeren zur Beurteilung des Infektionsrisikos für das Neugeborene. Wir führten die Untersuchungen in einer Region mit sehr hoher Hepatitis-B-Prävalenz durch, um mit einer möglichst kleinen Gesamtgruppe eine ausreichend hohe Zahl seropositiver Mütter untersuchen zu können. Die Wahl des zentralafrikanischen Landes Kamerun sollte gleichzeitig die Überprüfung der adäquaten Durchführbarkeit eines hochempfindlichen und potentiell störanfälligen Laborverfahrens, wie der PCR, unter den Bedingungen einer sehr schwierigen medizinischen Infrastruktur erlauben.

2 Literaturübersicht

2.1 Virologische Aspekte

2.1.1 Klassifikation der Hepadnaviren

Nach dem zuerst entdeckten Hepatitis-B-Virus wurden einige verwandte Viren entdeckt, die Nagetier- und Vogelarten befallen, und zur Familie der Hepadnaviridae - für hepatotrope DNA-Viren - zusammengefaßt (Feitelson et al 1986, Summers et al 1981, Tiollais et al 1985).

Die Hepadnaviren haben die folgenden gemeinsamen Eigenschaften: Die Virion-Größe und -Ultrastruktur, wobei ein sphärisches Nukleokapsid von einer Hülle umgeben ist; sodann die charakteristische Polypeptid- und Antigen-Komposition, die DNA-Größe, -Struktur und genetische Organisation sowie den ungewöhnlichen Mechanismus der DNA-Replikation, bei der eine reverse Transkriptase mit Hilfe eines viruskodierten Primers ein RNA-Intermediat in den DNA-Strang umschreibt. Allen gemeinsam ist auch eine enge Wirtsspezifität und ein ausgeprägter Hepatotropismus mit dem häufigen Vorkommen chronischer Infektionen (Tiollais et al. 1985; Galibert et al. 1982; Feitelson et al. 1986). Charakteristisch ist die Eigenschaft infizierter Hepatozyten, neben dem Virus große Mengen nicht-infektiöser viraler Hüllproteine zu produzieren (Bayer et al. 1968; Mason et al. 1980; Summers et al. 1978).

Innerhalb dieser Familie unterscheidet man die Säugetierviren und die Vogelviren. 1978 wurde das "Woodchuck Hepatitis Virus" (Summers et al. 1978), 1980 das "Ground Squirrel Hepatitis Virus" (Marion et al. 1980) und 1981 das "Duck Hepatitis B Virus" (Mason et al. 1980) sowie 1988 das "Heron Hepatitis Virus" beschrieben (Sprengel et al. 1988).

Phylogenetisch sind die Hepadnaviren mit dem Blumenkohlmosaik-Virus und den Retroviren verwandt. Sie teilen Ähnlichkeiten in der genomischen Organisation und die Verwendung eines reversen Transkriptase-Schrittes im Rahmen der Virus-Replikation (Hohn et al. 1985; Robinson, 1991).

2.1.2 Struktur des Hepatitis B Virus

Die Virionen des HBV, nach ihrem Entdecker auch Dane-Partikel (Dane et al. 1970) genannt, sind sphärische Partikel von etwa 42 nm Durchmesser. Sie bestehen aus einer ca. 7 nm dicken Hülle und einem elektronendichten inneren Kern (Core) von 22-25 nm Durchmesser. In die aus einer Lipidmembran bestehende Hülle, die wahrscheinlich vom endoplasmatischen Retikulum stammt, sind die Proteine des "Hepatitis-B-surface-Antigens" (HBsAg) eingelagert, das "small HBs" = SHBs-, das "middle HBs" = MHBs- und das "large-HBs" = LHBs - Protein (Heermann et al. 1984). Das Core, das aus dem Virion durch Behandlung mit Detergenzien wie Natriumdodecylsulfat (SDS) freigesetzt werden kann, besteht aus 120 Dimeren des "Hepatitis-B-core-Antigens" (HBcAg) (Crowther et al. 1994) und enthält das DNA-Genom und ein Protein mit Nukleinsäure-Polymerase- und RNase-H-Aktivität sowie Primer- und Spacerdomäne (Tiollais et al. 1985; Nassal et al. 1993) (**siehe Abb.2**).

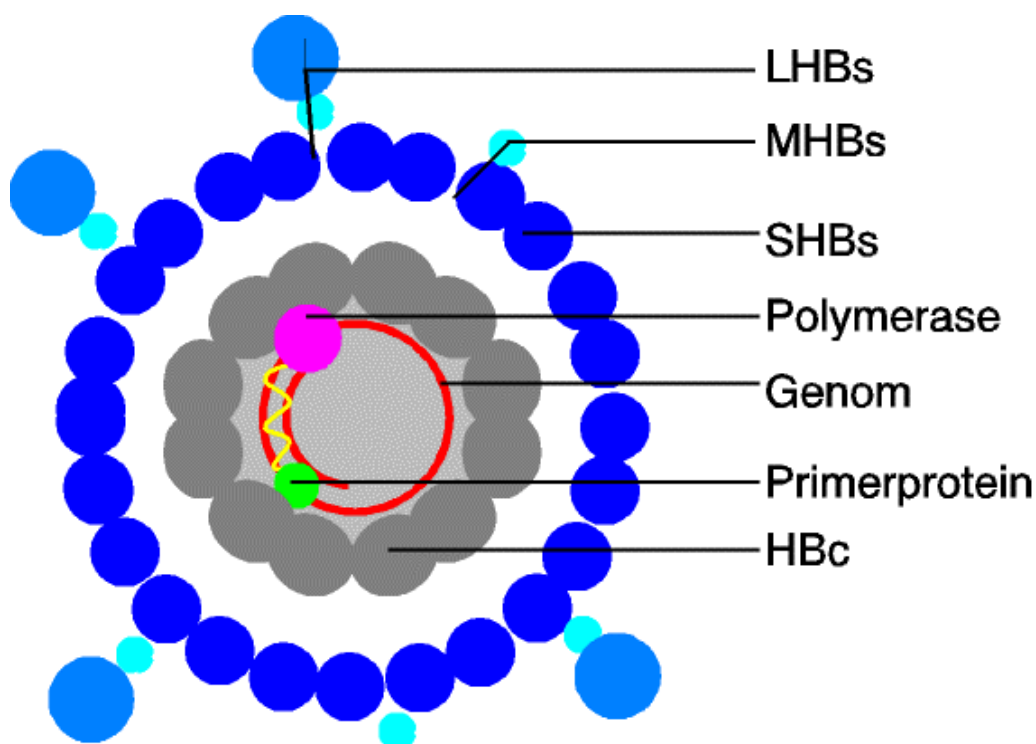


Abb.2 : Struktur des Hepatitis-B-Virus

LHBs = large HBs, MHBs = middle HBs und SHBs = small HBs sind die verschiedenen Proteine des HBsAg, die in die aus einer Lipidmembran bestehende Hülle eingelagert sind. Innerhalb der Virushülle befindet sich das Nukleokapsid, das aus 120 Dimeren des HbcAg besteht. Dieses Core enthält das Virusgenom und ein Protein mit DNA-Polymerase- und RNase-H- Aktivität sowie Primer- und Spacerdomäne.

Die Konzentration der Virionen im Serum HBV-Infizierter kann über 10^9 /ml betragen. Neben den Virionen findet man im Serum zahlreiche sphärische Partikel mit einem Durchmesser von 16-25 nm sowie filamentöse, 22 nm weite und verschiedenen lange Partikel (**siehe Abb.3**). Sie können im Serum eine Konzentration von über 10^{13} /ml erreichen. Es sind virale Hüllformen, die das HBsAg tragen, jedoch keine Core-Anteile enthalten. Sie könnten die Wirksamkeit der Immunantwort schwächen, indem sie als Köder fungieren, die Antikörper abfangen. Man kennt bisher keine weiteren Viren, die solch große Mengen von Hüllpartikeln während der natürlichen Infektion in vivo produzieren (Tiollais et al. 1985; Bayer et al. 1968).

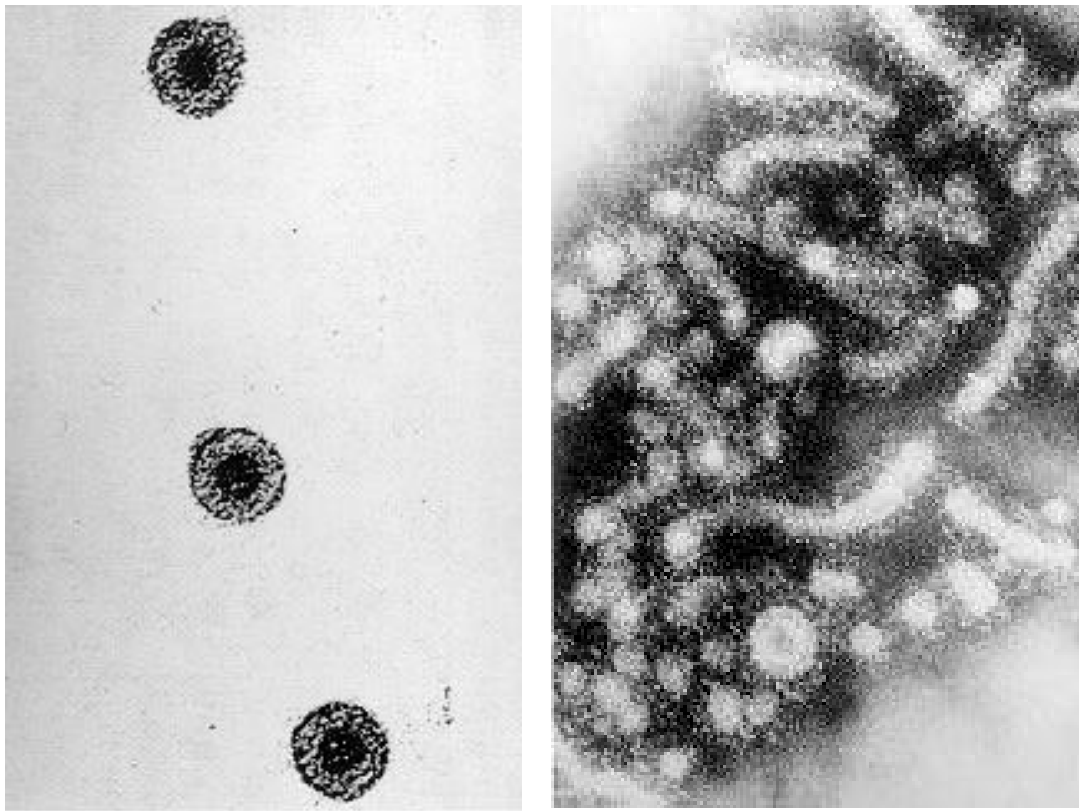


Abb.3: Vollständige Hepatitis-B-Viren und freie HbsAg-Partikel

Neben den Virionen (a) findet man im Serum zahlreiche sphärische Partikel von 16-25 nm Durchmesser sowie filamentöse, 22 nm weite und verschiedenen lange Partikel(b). Es sind virale Hüllformen, die das HBsAg tragen, jedoch keine Core-Anteile enthalten (Davis et al. 1980)

2.1.3 Struktur des Virusgenoms

Das HBV-Genom wurde 1974 erstmals durch W.S. Robinson isoliert (Robinson et al. 1974). Es ist mit etwa 3200 Nukleotiden eines der kleinsten bekannten tierischen Virusgenome (zum Vergleich: Das Genom des Herpes-Virus ist etwa 50 mal größer) und ist beeindruckend effizient

organisiert. Das Genom besteht aus einem zirkulären, partiell doppelsträngigen DNA-Molekül. Der Minusstrang besitzt dabei die volle Genomlänge. Der Plusstrang, der definitionsgemäß die gleiche Polarität wie die messenger-RNA (m-RNA) besitzt, erreicht nicht die volle Länge des Minusstrangs. Das 5'-Ende des inkompletten Plusstrangs befindet sich etwa 200-300 Basen abwärts vom 5'-Ende des Minusstrangs und bildet so eine kohäsive Überlappung, wodurch die zirkuläre Struktur des HBV-DNA-Moleküls gebildet wird. Dabei entsteht zwischen den beiden Enden des Minusstrangs eine kurze Überlappung von 5-10 Basen (terminale Redundanz), so daß das Genom in diesem Bereich dreisträngig vorliegt. Am 5'-Ende des Minusstranges ist ein Polypeptid und am 5'-Ende des Plusstrangs ist ein Oligoribonukleotid kovalent gebunden. Bei der Replikation des Genoms dienen sie als Startermoleküle (Primer) für die DNA-Synthese des jeweiligen Stranges (Tiollais et al. 1985; Gerlich et al. 1980; Pugh et al. 1990) (**siehe Abb.4**).

Das Hepatitis B Virus-Genom besitzt vier proteinkodierende offene Leserahmen: Prä-S1/Prä-S2/S, Prä-C/C, P und X (**siehe Abb.5**). Durch Verschiebung des Ableserasters wird das Genom zur Kodierung verschiedener Proteine genutzt. Es können so 50% mehr Protein kodiert werden, als dies durch ein Genom derselben Größe ohne diese Organisationform möglich wäre. Die Hauptkomponente des Oberflächenproteins, das "small-HBs", wird durch das S-Gen kodiert. Wird die Kodierregion um das PräS2- bzw. um das PräS1/PräS2-Gen erweitert, werden "middle-HBs" bzw. "large-HBs" gebildet. Das Prä-C/C-Gen kodiert für ein Prä-C/C-Protein, über dessen Funktion bisher wenig bekannt ist und dessen prozessiertes Produkt als Hepatitis B e Antigen (HBeAg) im Serum nachweisbar ist. Das Core-Gen kodiert das Hepatitis B core Antigen (HBcAg), das Strukturprotein des Nukleokapsids. Das P-Gen kodiert für die virale DNA-Polymerase/reverse Transkriptase und das kovalent an das 5'-Ende des Minusstrangs gebundene Primer-Protein und ist von zentraler Bedeutung für die Virusreplikation. Das X-Gen kodiert ein nicht membranständiges Protein, das in vitro die Transkription verschiedener viraler und zellulärer Gene steigert (Wollersheim et al. 1987).

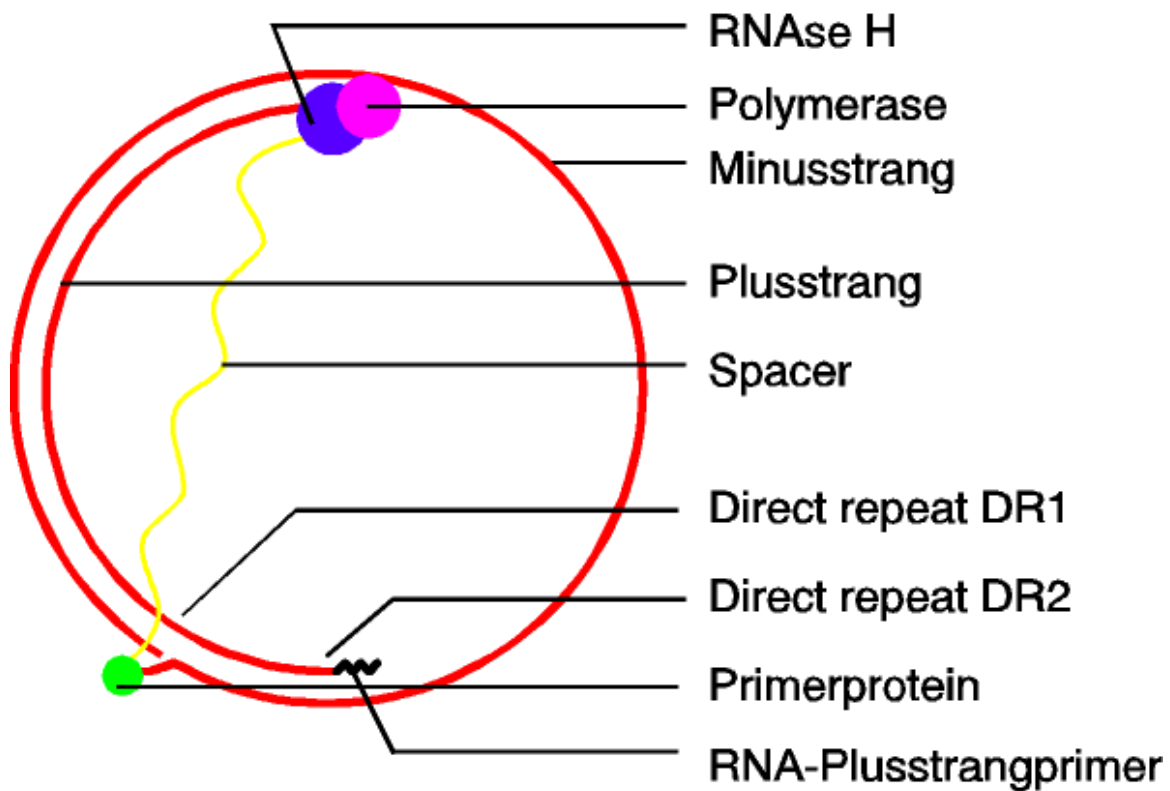


Abb.4: Genetische Organisation des Hepatitis-B-Virus

Das Genom hat eine Länge von etwa 3200 Nukleotiden. Es ist ein zirkuläres, partiell doppelsträngiges DNA-Molekül. Am 5'-Ende des Minusstrangs befindet sich das Primerprotein, welches über eine Proteinbrücke (spacer) mit enzymatisch aktiven Bereichen verbunden ist, welche die Nukleinsäure-Polymerase- und RNAse-H-Aktivität besitzen.

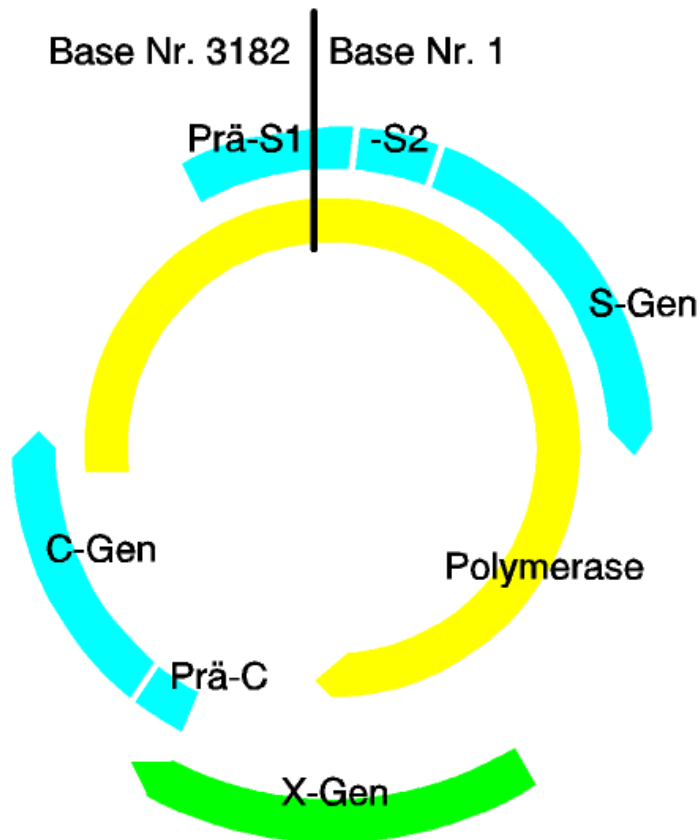


Abb.5: Proteinkodierende Leserahmen des HBV-Genoms

Das HBV-Genom besitzt mit seinen vier proteinkodierenden Leserahmen eine effektive Organisationsstruktur: Durch Verschieben des Ableserasters können einzelne DNA-Abschnitte für die Kodierung mehrerer Proteine verwendet werden.

2.1.4 Replikation des Genoms und Synthese viraler Boten-RNA

Die Replikation des viralen Genoms erfordert vier Schritte: Zuerst muß der Plusstrang vervollständigt und die DNA in eine zirkuläre doppelsträngige Form überführt werden, sodann erfolgen die Transkription der Boten-RNA, die Synthese des Minusstrangs an der längsten Boten-RNA, dem sog. Prägenom, und des Plusstrangs am zuvor synthetisierten Minusstrang. Daran sind neben der viralen Nukleinsäure-Polymerase mehrere zelluläre Enzyme beteiligt.

Um eine kovalent gebundene zirkuläre DNA zu erhalten, wird der Plusstrang im Kern der infizierten Zelle durch die virale oder eine zelluläre DNA-Polymerase komplettiert, der Protein-Primer wird vom 5'-Ende des Minusstrangs durch eine Protease und der Oligoribonukleotid-Primer vom 5'-Ende des Plusstrangs durch eine RNase entfernt. Die terminale Redundanz des Minusstrangs wird durch eine DNase eliminiert und die DNA-Enden durch eine DNA-Ligase

ligiert (Ganem et al. 1987; Miller et al. 1989). Die genomische und subgenomische mRNA wird durch die zelluläre RNA-Polymerase II im Kern der infizierten Zelle an vier Bindungsstellen des Genoms, den sog. Promotoren, transkribiert. Die Aktivität dieser Promotoren wird auf komplexe Weise durch zwei Regulationselemente des Genoms, den sog. Enhancer (Transkriptionsverstärker) beeinflusst und führt zu einer unterschiedlichen Expression der viralen Gene. Zelluläre Transkriptionsfaktoren können an die Enhancer binden und so zur zellspezifischen Expression viraler Gene führen. Den ausgeprägten Hepatotropismus des Virus führt man auf die Notwendigkeit leberzellenspezifischer Transkriptionsfaktoren zur optimalen Expression viraler Gene und auf die leberzellmembranspezifischen Oberflächenrezeptoren des Virus zurück (Yuh et al. 1993; Hu et al. 1991; Zhou et al. 1990; Huan et al. 1993; Yee, 1989; Su et al. 1992).

Das HBV-Genom besitzt nur ein einziges Polyadenylierungssignal (TATAAA). Durch dieses Signal wird an das 3'-Ende eukaryontischer mRNA nach der Transkriptionstermination eine Sequenz von Adenylatresten addiert. Somit beginnt die Synthese der vier verschiedenen mRNA zwar an verschiedenen Stellen im Genom, endet jedoch immer im Bereich des einen Polyadenylierungssignals. Die verschiedenen mRNA haben so ein identisches 3'-Ende; zudem ist die Sequenz der kürzeren RNA jeweils am 3'-Ende der folgenden längeren enthalten. Es werden jedoch nur die 5'-terminal gelegenen Bereiche zur Proteinsynthese translatiert. Der Core/e-Promoter ist für die Transkription einer 3,5 kb langen mRNA verantwortlich, die die virale Nukleinsäurepolymerase, das HBcAg und das HBeAg kodiert. Eine dazu bis auf wenige Basen am 5'-Ende identische RNA stellt die Zwischenstufe bei der Replikation des Genoms dar und wird deshalb als Prägenom bezeichnet. Das Prägenom ist länger als das Genom weil es eine terminale Sequenzredundanz trägt. Zu dieser Redundanz kommt es, weil die Transkription etwa 200 Basen abwärts der Polyadenylationssequenz startet und dieses Terminationssignal im ersten Umlauf offensichtlich überlesen wird und es so erst im zweiten Umlauf zum Abbruch kommt (Summers et al. 1982). Der PräS2/S-Promoter führt zur Transkription eines Sets von 5'-gestaffelter m-RNAs für das MHBs- und SHBs-Protein. Der PräS1-Promoter initiiert die mRNA für das LHBs-Protein. Der X-Promoter ist bislang wenig charakterisiert.

Bei der Replikation des Genoms spielen zwei kurze DNA-Sequenzen eine entscheidende Rolle: Die als DR1 und DR2 bezeichneten Sequenzen stellen die exakte Wiederholung einer 10-12 Basen langen Sequenz im Abstand von ca. 230 Basen auf dem Virusgenom dar (Seeger et al. 1986) (**siehe Abb. 4**). Die Synthese des Minusstrangs beginnt an der am 3-Ende des Prägenoms gelegenen DR1-Sequenz. Ein viruskodiertes Protein dient dabei als Primer (Bartenschlager et al.

1988). Die virale Nukleinsäurepolymerase kann aufgrund ihrer reversen Transkriptase-Aktivität an der RNA-Matrix, dem Prägenom, einen DNA-Minusstrang synthetisieren. Ihre RNase-H-Aktivität baut parallel zur Synthese das RNA-Prägenom ab. Es entsteht somit ein einzelsträngiges DNA-Molekül von negativer Polarität. Die Synthese des Plusstrangs wird initiiert durch ein 18 Basen langes Oligoribonukleotid, das vom 5'-Ende des RNA-Prägenoms stammt und startet an der am 3'-Ende gelegenen DR2-Sequenz des Minusstrangs. Die Extension des Plusstrangs erreicht bald das 5'-Ende der Minustrang-Matritze und müßte stoppen, da das 5'- und das 3'-Ende des Minusstrangs noch nicht miteinander verbunden sind. Die kurze terminale Redundanz von 9 Basenpaaren an beiden Enden des Minusstrangs ermöglicht eine weitere Verlängerung des Plusstrangs durch ein Überwechseln vom 5'-Ende auf diese identische Sequenz am 3'-Ende des Minusstrangs. Es resultiert die zirkuläre Konfiguration des Genoms. Die Synthese des Plusstrangs erfolgt nicht vollständig; etwa 10-60% des Genoms ist einzelsträngig. Man nimmt an, daß bereits das RNA-Prägenom zusammen mit der viralen Nukleinsäure-Polymerase in ein neues Kapsid aus 240 HBcAg-Molekülen verpackt wird. Die Verpackung des Prägenoms wird wahrscheinlich schon während der Translation durch eine spezifische Sekundärstruktur nahe dem 5'-Ende des RNA-Prägenoms, dem sog. Epsilon-signal initiiert, an das sich die DNA-Polymerase anlagert (Nassal et al. 1993). Nach Anlagerung weiterer HBcAg-Moleküle formiert sich das Core-Partikel, innerhalb dessen im Zytoplasma der infizierten Wirtszelle die weiteren Schritte der viralen DNA-Synthese stattfinden (Ganem et al. 1987; Seeger et al. 1986; Tiollais et al. 1985).

2.1.5 Virale Proteine

Das HBV-Genom besitzt vier proteinkodierende Leserahmen (Miller et al. 1989) (**siehe Abb.5**). Der größte Leserahmen, der 3/4 des Genoms umspannt, kodiert die virale Nukleinsäurepolymerase. Es ist ein Protein mit vier verschiedenen funktionellen Abschnitten. Der aminoternale Bereich kodiert das Primerprotein, das am RNA-Prägenom die Synthese des DNA-Minusstrangs initiiert. Carboxyterminal schließt sich ein variabler Bereich an, der als Abstandhalter (Spacer) dient zwischen dem Primerprotein und den Bereichen mit RNase-H- und Nukleinsäurepolymerase-Aktivität. Die RNase-H baut parallel zur Synthese des DNA-Minusstrangs das RNA-Prägenom ab und ermöglicht so die nachfolgende Plusstrang-Synthese (McGlynn et al. 1992). Das RNA-Prägenom dient als m-RNA für die Translation der viralen

Nukleinsäure-Polymerase und des HbcAntigens und HbeAntigens (Bartenschlager et al. 1992; Lin et al. 1992; McGlynn et al. 1992; Wang et al. 1992).

HbcAg und HbeAg werden in einem zur Polymerase versetzten Leseraster nahe dem 5'-Ende des Prägenoms kodiert. Die Primärstrukturen von HBcAg und HBeAg sind weitgehend identisch. HBeAg unterscheidet sich von HBcAg durch 10 zusätzliche aminoterminalen Aminosäuren und durch das Fehlen von 34 carboxyterminalen Aminosäuren, die posttranslational abgespalten werden. Das Startkodon für die Translation des HBeAg ist gegenüber dem Startkodon des HBcAg um 87 Nukleotide 5'-wärts verschoben. Der entsprechende Bereich wird als Prä-C-Region bezeichnet. Die Translation der beiden Proteine endet am selben Stopkodon. Die carboxyterminalen 34 Aminosäuren des HBcAg sind reich an Arginin und binden DNA. Nach der Translation aggregieren je 240 HBcAg-Moleküle und verpacken das Prägenom und die Nukleinsäurepolymerase. Freies HBcAg wird im Serum nicht nachgewiesen (Hirsch et al. 1990; Schlicht et al. 1989). Die zusätzliche aminoterminalen Sequenz des HBeAg bedingt einen anderen zellulären Transportweg: Das HBeAg-Protein wird über das rauhe endoplasmatische Retikulum von der Leberzelle sezerniert und wurde 1972 erstmals im Serum nachgewiesen (Ou et al. 1986; Schlicht et al. 1989). Die Funktion dieses Proteins ist noch nicht klar definiert. Es wird diaplastar übertragen und scheint beim Feten einer HBeAg-positiven Mutter die Ausbildung einer immunologischen Toleranz gegenüber dem HBV zu begünstigen (Milich et al. 1990; Beath et al. 1992). Trotz der großen Sequenzüberlappung der Polypeptide HBeAg und HBcAg von 149 Aminosäuren kann das humorale Immunsystem gegen beide Proteine unterschiedliche spezifische Antikörper hervorbringen.

Die Kodierung der viralen Hüllproteine ist ein weiteres Beispiel für die kompakte genetische Organisation des HBV. Die Synthese kann innerhalb eines Leserahmens an drei verschiedenen Startpositionen begonnen werden und endet immer am selben Terminationspunkt, wodurch drei verschieden große Proteine synthetisiert werden. Beginnt die Synthese am weitesten distal gelegenen Startkodon, entsteht ein 226 Aminosäuren langes Protein, das sogenannte S-Protein; beginnt sie weiter proximal, werden weitere 55 (prä-S2) bzw. 174 (prä-S2 und prä-S1) Aminosäuren aminoterminal angelagert (Heermann et al. 1984; Stibbe et al. 1983). Die Translation erfolgt nicht am Prägenom, sondern an zwei subgenomischen m-RNA. Die zugehörigen Promoter-Sequenzen wurden identifiziert. Der Prä-S1-Promoter, upstream vom Startpunkt der prä-S1-Sequenz gelegen, initiiert die Synthese einer etwa 2400 Basen langen m-RNA. Der Prä-S2-Promoter, in der prä-S1-Region gelegen, steuert die Synthese einer etwa 2100 Basen langen m-RNA. Die 2400 Basen lange m-RNA kodiert für das als "large-S" bezeichnete

Protein; die 2100 Basen lange mRNA kodiert für das "middle-S" und für das "small-S" oder als "major-S" bezeichnete Protein. Wie die Bezeichnung "major-S" anzeigt, wird dieses Protein am effizientesten translatiert (Cattaneo et al. 1983). Die S-Polypeptide werden in die Lipidmembran des endoplasmatischen Retikulums eingelagert (Patzner et al. 1986) und sprossen als Partikel in das Lumen. Der intrazelluläre Transport erfolgt durch den Golgi-Apparat.

Die einzelnen Proteine des HBsAg sind in der Virion-Hülle und in den nicht-infektiösen Partikeln in unterschiedlicher Menge vertreten. Das "S-Protein" stellt jeweils den Hauptanteil (Cattaneo et al. 1983). Im aminoterminalen Bereich der Prä-S1-Sequenz wurde ein spezifischer Leberzellrezeptor nachgewiesen, von dem man annimmt, daß er die Anheftung des HBV an die Leberzellmembran vermittelt (Neurath et al. 1986). Alle drei Proteine können auch in glykosilierter Form vorliegen (Stibbe et al. 1982). Die Primärstruktur des S-Proteins enthält drei hydrophobe Sequenzen, die durch zwei hydrophile Sequenzen getrennt sind. Die hydrophoben Bezirke sind teilweise in die Lipidmembran der Hülle eingelagert und stabilisieren die Hüllstruktur (Guerrero et al. 1988; Gavilanes et al. 1990). Der Begriff "HBsAg" bezeichnet eine Mischung der beschriebenen drei Proteine, da mit den meisten der verfügbaren Antisera nicht zwischen den drei Proteinkomponenten unterschieden werden kann. Es sind jedoch verschiedene antigene Determinanten des HBsAg bekannt, die eine serologische Subtypisierung des HBsAg ermöglichen. Sie werden als "d", "y", "w" und "r" bezeichnet. "d" und "y" sowie "w" und "r" verhalten sich wie Allele. Die antigene Heterogenität der w-Determinante und zusätzliche Determinanten wie q, x und g sind beschrieben. Die allen Hepatitis B Viren gemeinsame Determinante wird mit "a" bezeichnet. Sie ist für die Kreuzimmunität nach überstandener Infektion verantwortlich. Neben der Determinante "a" besitzt jedes HBV zwei weitere Subtypendeterminanten, z.B. "ayw". Die HBsAg-Subtypen sind ungleich über die Welt verteilt und dienen als gebräuchliche Marker für epidemiologische Studien über die Ausbreitung des Virus in menschlichen Populationen. In Westafrika herrscht der ayw-Subtyp vor (Mazzur et al. 1974; Hoofnagle et al. 1977; Okamoto et al. 1988; Ashton-Rickardt et al. 1989; Couroucé-Pauty et al. 1976). Nach Sequenzierung von 18 HBV-Isolaten unterteilten Okamoto et al. (1988) die HBV-Genotypen in vier Gruppen: A bis D. 1992 entdeckten Norder et al. noch zwei weitere Genotypen: E und F. Der Genotyp G wurde von Stuyver et al (2000) publiziert.

Der vierte Leserahmen kodiert ein Protein von etwa 160 Aminosäuren Länge, das sogenannte X-Protein. Der X-Promoter liegt oberhalb vom X-Gen im Bereich des P-Leserahmens. Das X-Protein ist nicht membranständig. Über seine in-vivo-Funktion sind noch wenig Fakten bekannt.

In vitro steigert es die Aktivität von bestimmten zellulären und viralen Promoter- und Enhancer-Sequenzen (Aufiero et al. 1990; Repp et al. 1992). Immortalisierte Leberzellkulturen konnten durch Transfektion mit dem X-Gen zu Tumorzellen transformiert werden (Höhne et al. 1990). Das X-Protein zeigt im Vergleich verschiedener HBV-Isolate einen höheren Konservierungsgrad als die anderen HBV-Gene, was auf seine Bedeutung für den Infektionszyklus des HBV schließen läßt. Hinweise auf einen Einfluß des X-Gens auf die Entwicklung eines HBV-assoziierten primären Leberzellkarzinoms ergaben sich durch den Nachweis von in das Genom solcher Tumorzellen integrierter X-Gen-Sequenzen (Gerlich et al. 1989).

Eine fünfte mRNA-Spezies, die über einen RNA-Splicingmechanismus entsteht, scheint ein weiteres Protein kodieren zu können. Über die Funktion eines solchen Proteins ist bisher nur wenig bekannt (Soussan et al. 2000).

2.1.6 Virusreplikation

Die Anheftung des Virus an die Leberzellmembran erfolgt sehr wahrscheinlich über einen Rezeptor der Leberzellmembran, der ein durch den aminoterminalen Bereich des Prä-S1-Gens kodiertes Protein erkennt (Neurath et al. 1986). Über die Viruspenetration und die Freisetzung der viralen DNA gibt es mangels geeigneter Zellkulturmodelle keine eindeutigen Kenntnisse. Die virale DNA wird zum Zellkern transportiert, wo sie zu einem doppelsträngigen zirkulären DNA-Molekül vervollständigt wird. Anschließend erfolgt die Transkription der verschiedenen m-RNA und die Translation der verschiedenen viralen Proteine. HBcAg-Moleküle, das Prägenom und die virale Polymerase gelangen zurück ins Zytoplasma der Zelle und aggregieren zu neuen Nukleokapsidpartikeln. Dort erfolgen die weiteren Schritte der Replikation des HBV-Genoms. Die Nukleokapside werden schließlich in eine Hülle aus HBsAg-Partikel verpackt. Komplette Viren wie auch im Überschuß gebildete HBsAg-Partikel werden von der Wirtszelle sezerniert. Die Wirtszelle wird normalerweise durch die Virusreplikation nicht geschädigt (Pugh et al. 1990).

2.2 Epidemiologische und klinische Aspekte

2.2.1 Verlaufsformen der Hepatitis B

Akute Hepatitis, fulminant verlaufende Hepatitis, asymptomatische Trägerstadium und chronische Hepatitis sind Facetten der Infektion des Menschen durch das Hepatitis-B-Virus. Für die verschiedenen Verlaufsformen wird einerseits die individuelle, virusspezifische Immunantwort und andererseits die Heterogenität der infizierenden Virusvarianten verantwortlich gemacht (Tiollais et al. 1985; Eddleston et al. 1986; Baker, 1992; Barnaba et al. 1992). Erfolgt die Infektion bei Geburt oder in den ersten ein bis zwei Lebensjahren, so führt dies selten zu einer klinisch manifesten Erkrankung. Durch die Virusüberschwemmung des immunologisch noch unreifen Organismus kommt es zum Persistieren des HBV. In der Folge entwickelt sich in über 90% bzw. 50-60% ein chronischer Verlauf (Krogsgaard, 1994). Durch die diaplazentare Transmission des HBeAg scheint beim Feten eine immunologische Toleranz induziert zu werden, was eine chronische Infektion begünstigt (Milich et al. 1990). Bei einer Infektion im Jugendlichen- und Erwachsenenalter treten in 10-30% der Fälle klinische Symptome auf; bei den übrigen verläuft die Infektion asymptomatisch. Eine normale Immunantwort führt in der Regel zur Elimination des Virus. Persistiert das HBV im Wirtsorganismus, resultiert oft eine chronisch persistierende oder chronisch aggressive Hepatitis, die zur Leberzirrhose führen kann. Bei "Gesunden" kommt es in nur 2-4% zur Chronifizierung; bei Drogenbenutzern jedoch in 10-20% und bei anderen immunkompromittierten Patienten noch häufiger, z.B. bei Hämodialysepatienten in 20-30% und bei Nierentransplantierten in 40-50% (Liaw et al. 1991; McMahon et al. 1984). Bei jahrelang bestehender HBV-Infektion kommt es oft zur Integration des Virusgenoms in das Genom der Wirtszelle; dies kann nach einer Inkubationszeit von 10-50 Jahren zu einem hepatozellulären Karzinom führen (Tiollais et al. 1985; Koff, 1993).

2.2.2 Akute Hepatitis B

Die mildeste, anikterische Form verläuft klinisch inapparent und ist lediglich durch einen Transaminasenanstieg gekennzeichnet. Unspezifische gastrointestinale und grippeähnliche Symptome können auch bei anikterischem Verlauf bestehen.

Einem ikterischen Verlauf geht normalerweise ein Prodromalstadium von 3-4 Tagen bis 3 Wochen mit den genannten unspezifischen Symptomen voraus. Nach Einsetzen des Ikterus

bessert sich die Symptomatik. Der Ikterus bildet sich nach 1-4 Wochen zurück; Müdigkeit und Abgeschlagenheit bleiben teilweise noch einige Monate bestehen.

In etwa 1% der Fälle entwickelt sich innerhalb von 1-4 Wochen nach Krankheitsbeginn eine fulminante Hepatitis, die in wenigen Tagen zu einem progredienten Ikterus mit plötzlichem Abfall der Transaminasen, der Gerinnungsfaktoren und der Syntheseparameter der Leber führt. Klinisch und sonographisch nimmt die Lebergröße deutlich ab. Wiederholtes Erbrechen, der Foetor hepaticus und die beginnende Enzephalopathie sind die Vorboten des akuten Leberversagens.

2.2.3 Chronische Hepatitis B

Bei der chronischen Hepatitis B Infektion handelt es sich nicht um ein einheitliches Krankheitsbild, sondern um eine Verlaufsdiagnose, die einen Virusträgerstatus, definiert als Persistenz des HBsAg im Serum über mindestens 6 Monate, voraussetzt und mit einer Transaminasenerhöhung sehr unterschiedlichen Ausmaßes einhergeht. Weltweit weisen über 300 Millionen Menschen einen solchen HBsAg-Trägerstatus auf (Sherlock 1990). Anhand des morphologisch-histologischen Bildes unterscheidet man zwischen der chronisch-persistierenden und der chronisch-aggressiven Hepatitis B (Ishikawa et al. 1993). Bei der benignen chronisch-persistierenden Hepatitis sind die entzündlichen Veränderungen auf die Periportalfelder begrenzt; Spontanheilungen sind häufig. Sogenannte Mottenfraßnekrosen charakterisieren die chronisch-aggressive Hepatitis: Durch Ausweitung der portalen Entzündung auf die Läppchenperipherie kommt es zum Untergang von Lebergewebe. In der Folge kann eine makronoduläre Zirrhose entstehen (Bortolotti et al. 1993).

2.2.4 Immunkomplex-assoziierte Krankheitssyndrome

HBsAg-AntiHBs-Komplexe im Serum können gelegentlich für bestimmte Krankheitssyndrome eine pathogenetische Rolle spielen. Diese manifestieren sich extrahepatisch in Form von Hautausschlägen, Arthritis, nekrotisierender Vaskulitis oder Glomerulitis. Die Pathogenese dieser Syndrome scheint eine durch HBsAg-Anti-HBs-Komplexe und Komplement vermittelte Gewebsschädigung zu sein, wie sie klassisch im experimentellen Modell der Serumkrankheit beschrieben ist (Casserly et al. 1999; Wicki et al. 1999).

2.2.5 Serologische Infektionsparameter

HBsAg tritt schon vor dem Transaminasenanstieg während der Inkubationszeit in der Regel 4 bis 12 Wochen nach Infektion im Serum auf. Bei einem unkomplizierten Verlauf fallen die Titer nach etwa 6 Wochen auf 25 % des Ausgangswertes ab. Ist dies nicht der Fall, ist ein Übergang in eine chronische Verlaufsform wahrscheinlich. Die Anti-HBs-Antikörper erscheinen in 90 % der Fälle erst in der späten Rekonvaleszenz 3-4 Monate nach Erkrankungsbeginn, wenn HBsAg bereits nicht mehr nachweisbar ist und zeigen Immunität an. Im Laufe der Zeit fällt der Anti-HBs-Titer langsam ab (Kaboth 1982). HBcAg ist im Serum nicht nachweisbar, sondern kann im Zellkern mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen werden. Anti-HBc-Antikörper treten während der akuten Infektionsphase als erste Antikörper auf und persistieren in der Regel lebenslang. Etwa 5 % - 10% der akuten Infektionen bleiben HBsAg- und anti-HBs-negativ und können nur durch den Nachweis von Anti-HBc-Antikörpern diagnostiziert werden. Anti-HBc-IgM-Antikörper werden bereits kurz nach dem Beginn der Virusvermehrung gebildet und bleiben etwa 2-4 Monate nachweisbar. In einigen Fällen einer akuten Hepatitis-B-Infektion können die HBs- und HBe-Antigene beim Auftreten klinischer Symptome schon verschwunden, die entsprechenden Antikörper aber noch nicht nachweisbar sein. Die Anti-HBc-IgM-Bestimmung kann diese diagnostische Lücke schließen. HBeAg erscheint in der Frühphase der Infektion im Serum. Sein Auftreten korreliert mit dem Auftreten von Dane-Partikeln im Serum. Anti-HBe tritt unmittelbar nach der Elimination von HBeAg auf und ist meist für 2-5 Jahre nachweisbar (Chernesky 1987, Koff 1993).

2.2.6 Übertragungsmodus

Das Hepatitis-B-Virus wird parenteral übertragen. Während in den asiatischen Endemiegebieten der perinatale Übertragungsweg die Hauptrolle spielt (Bortolotti et al. 1993; Stevens 1979, Chang et al 1989, Shapiro et al 1990, Gust 1996, Lansang 1996, Lingao et al. 1989) wird in den afrikanischen Endemiegebieten die Infektion vorwiegend postnatal und im frühen Kindesalter erworben (Lin et al. 1993; Vall Mayans et al. 1990; Lingao et al. 1989; Chang et al. 1989; McCarthy et al. 1989; Grathwohl et al. 1991; Ndumbe et al. 1989; Shapiro, 1993; Özsoylu, 1993, Kiire 1996, Madzime et al. 1999).

Wird die Infektion im frühen Kindesalter aquiriert, verläuft sie meist subklinisch-anikterisch (Bortolotti et al. 1993). Die vertikale Transmission des HBV, d.h. die Infektion des Feten bzw. Neugeborenen durch die Mutter, kann intrauterin-diplazentar (Chang et al. 1996, Chen et al.

1996) oder peripartal (Dazza et al. 1993) erfolgen. Die Muttermilch spielt für die Übertragung eine geringe Rolle. Die Infektionsgefahr ist bei akuter mütterlicher Erkrankung im dritten Trimenon und im Wochenbett am größten (Beath SV, 1992, Heijntink et al 1984, Krause 1992, Michielsen et al. 1999, Mitsuda et al. 1989). Das Infektionsrisiko für ein Neugeborenes einer HBeAg-positiven Mutter liegt zwischen 70-100%, wohingegen Neugeborene von Müttern, die nur HBsAg-positiv sind, ein Infektionsrisiko von etwa 20% haben (Mitsuda et al. 1989). Über 90% der perinatal durch eine HBeAg-positive Mutter infizierten Kinder werden zu chronischen HBsAg-Trägern (Ho 1998, McMahon et al. 1984, Milich et al. 1990). Sie tragen ein hohes Risiko für die Entwicklung einer Leberzirrhose sowie eines hepatozellulären Karzinoms (Chang et al 1989, Feitelson 1992, Kew 1992).

Nach Geburt lassen sich im kindlichen Serum plazentär übertragene IgG-Antikörper nachweisen, die nach etwa 3-7 Monaten verschwinden. Mit einer HBs-Antigenämie ist frühestens nach 3 Monaten zu rechnen (Gerlich et al. 1994, Koff 1993).

Weitere Übertragungsmöglichkeiten sind enger körperlicher Kontakt, Sexualverkehr, Transfusionen, parenteraler Drogengebrauch und Nadelstich- und andere Verletzungen im klinischen Alltag (Szmuness 1975, Norkrans 1990, Pereira 1994). In tropischen Ländern stellen Hautulzera, rituelle Skarifikationen und das Durchstechen von Ohrläppchen, oft unter äußerst unsterilen Bedingungen vorgenommen, eine weitere Infektionsmöglichkeit dar. Beengtes Wohnen, infizierte Bettwanzen und das gemeinsame Benutzen von Toilettengegenständen wie Zahnbürsten und Rasiermesser tragen ebenfalls zur Verbreitung des Virus bei ((Kew et al 1973, Blumberg et al 1975, Szmuness et al 1978; Vall Mayans et al. 1990).

2.2.7 Virusträger und Epidemiologie

Die Zahl der HBV-Träger, die definitionsgemäß einen HBsAg-Trägerstatus über sechs Monate aufweisen, wird weltweit auf über 300 Millionen geschätzt (Maynard, 1990; Sherlock, 1990), wobei deutliche regionale Unterschiede der Prävalenz bestehen: In Teilen Ostasiens und im tropischen Afrika beträgt die HBV-Trägerrate über 10%, wohingegen in Westeuropa nur 0,1-0,5% der Bevölkerung HBV-Träger sind (Prince et al. 1991; Prince, 1990; Robson, 1992; Schoub, 1992; Lingao et al. 1989; Chang et al. 1989; Goudeau et al. 1990). Es ist nicht geklärt, weshalb die HBV-Infektion in bestimmten Gebieten endemisch vorkommt und in benachbarten Regionen die Durchseuchung sehr viel geringer ist. Über 40% der HBV-Träger sterben an den Folgen der Infektion (Ghendon, 1990; Shapiro et al. 1990). Neben dem Risiko einer

Leberzirrhose besteht für sie ein bis zu 200fach erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines hepatozellulären Karzinomes, wie prospektive Studien eindeutig bewiesen haben (Beasley et al. 1981; Norkrans, 1990; Colombo, 1992). Da die HBV-Träger meist über Jahre keinerlei klinische Symptome aufweisen, obwohl sich in ihren Körperflüssigkeiten hohe Virustiter nachweisen lassen, stellen sie ein wichtiges Erregerreservoir dar.

2.2.8 Primäres hepatozelluläres Karzinom

Verschiedene Befunde belegen einen Zusammenhang zwischen der chronischen Infektion mit HBV und dem hepatozellulären Karzinom oder sind damit assoziiert; so z.B. das häufige Vorkommen hepatozellulärer Karzinome in HBV-Endemiegebieten, prospektive Studien die für HBV-Träger ein über 200fach höheres Risiko für die Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms belegen (Beasley et al. 1981; Bortolotti et al. 1993), der Nachweis integrierter subgenomischer viraler DNA in Hepatomzellen (Gerlich et al. 1989) und die experimentelle Induktion von Leberkarzinomen in mit Hepadnaviridae infizierten Waldmurmeltieren (Colombo, 1992). Neben der HBV-Infektion stellen auch die HCV-Infektion, die Leberzirrhose jedweder Genese (v.a. alkoholbedingt) und die Exposition von karzinogenen Chemikalien wie z.B. Aflatoxinen oder Alkaloiden tropischer Pflanzen, anabolen Steroiden sowie oralen Kontrazeptiva weitere Risikofaktoren für das hepatozelluläre Karzinom dar (Feitelson, 1992; Okuda, 1992). In weiten Teilen Afrikas ist das primäre hepatozelluläre Karzinom (PHK) das am häufigsten vorkommende Karzinom (Bortolotti et al. 1993); in 90% der Fälle tritt es in zirrhotisch veränderter Restleber bei in 80% positivem HBsAg-Befund auf (Bortolotti et al. 1993). Die Bedeutung der peripartalen Infektion für die Entstehung des kindlichen PHK ist gesichert (Bortolotti et al. 1993, Chang 1989).

Die Frage, wie HBV karzinogen wirkt, ist noch nicht endgültig geklärt. HBV könnte direkt die Tumorentstehung triggern oder aber der Lebertumor entsteht indirekt durch die chronische Entzündung mit Zelluntergang und Regeneration im erkrankten Gewebe. Als mutagener Faktor werden dabei die bei der chronischen Entzündung von Phagozyten und anderen Zellen gebildeten Oxidantien (aktiver Sauerstoff, Radikale und organische Peroxide) angesehen, die DNA-Einzelstrangbrüche und die Aktivierung von Onkogenen wie c-fos und c-myc verursachen können.

Die lange Latenz zwischen der HBV-Infektion und dem Auftreten des Lebertumors spricht gegen die Annahme eines viralen Onkogens. Jedoch nimmt man an, daß das vom X-Gen kodierte Gen-

aktivierende Protein in einem frühen Stadium in den karzinogenen Prozess involviert ist (Ganem et al. 1987, Nakatake et al. 1993).

Eine andere Möglichkeit der viralen Karzinogenese besteht darin, daß das Virus seine DNA in die Wirtschromosomen integriert. Obwohl das HBV während des Replikationszyklus keine Integration seines Genoms in das Genom der Wirtszelle benötigt, könnten solche Integrationen als zufällige Beiprodukte entstehen. Integrierte virale DNA wird in 75-85% der hepatozellulären Karzinome gefunden (Shaul et al. 1984; Gerlich et al. 1989; Nagaya et al. 1987). Die Integrationsstellen sind variabel. Man findet häufig extensive Deletionen und Rearrangements im Bereich der viralen wie auch der zellulären DNA, die für jede integrierte Sequenz verschieden sind, was anzeigt, daß die Integration kein geordnetes oder reproduzierbares Geschehen ist (Tokino et al. 1991; Rogler, 1991; Schirmacher et al. 1993).

2.2.9 Impfung

Die Immunisierung mit hochgereinigten HBsAg-Partikeln aus dem Serum von HBsAg-Trägern führt zum Schutz gegen die HBV-Infektion (Hoofnagle 1989). Der Impfstoff erwies sich als sehr wirksam und sicher. Seine Herstellung war jedoch mit einigen Problemen behaftet; so ist die Zahl der verfügbaren HBsAg-Träger begrenzt und das Reinigungsverfahren langwierig und kostspielig.

Inzwischen läßt sich der Impfstoff gentechnologisch herstellen. Das in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* hergestellte HBsAg (Valenzuela et al 1982) enthält keine Prä-S1- und Prä-S2-Determinante, was zeigt, daß die Immunantwort gegen die S-Determinante des HBsAg allein protektiv sein kann (Szmunn et al 1980, Lee et al 1991). 1984 wurde ein Impfstoff entwickelt, der, in Ovarzellen des chinesischen Hamsters produziert, neben dem S-Gen-Produkt auch die antigene Determinante des prä-S2-Gens enthält. Die Prä-S2-Determinante ist im Mausmodell deutlich stärker immunogen als das S-Antigen. Impfversager, die keine Antikörper gegen HBsAg bilden, könnten mit dieser Vakzine geschützt werden (Milich, 1991).

Die Grundimmunisierung besteht aus drei Injektionen im Abstand von vier Wochen bzw. sechs Monaten. Es wird jeweils 1 ml Impfstoff entsprechend 0,01 mg oder 0,02 mg HBsAg verabreicht. Für Neugeborene und Kinder unter 10 Jahren beträgt die Einzeldosis 0,5 ml. Neugeborene HBsAg-positiver Mütter erhalten simultan zur 1. Impfung 0,4 ml/kg Hepatitis-B-Hyperimmunglobulin gleich nach Geburt. Die Auffrischimpfung wird bei Anti-HBs-Titern unter 10 U/l empfohlen (Szmunn et al 1980, Niesert et al 1994, Forsyth et al. 1995).

2.2.10 Therapie

Bei Patienten mit chronischer Hepatitis sollte vor dem Hintergrund des ungünstigen Verlaufs mit Progression zur Leberzirrhose und zum HCC ein Therapieversuch immer gemacht werden. Interferon-alpha ist derzeit das einzige zugelassene Präparat zur Behandlung der chronischen Hepatitis B. Es hat einen nachweisbaren Effekt auf die Virusreplikation. Ein Langzeiteffekt mit Elimination der viralen DNA aus der Leber kann jedoch nur für etwa 30% der Patienten nachgewiesen werden (Perillo 1993, Pape 1994, Cotonat et al. 2000; Gurakan et al. 2000; Mutimer et al. 2000). Weitere Therapieansätze sind die Immunmodulation mit PräS-Antigenhaltigen Impfstoffen und Zytokinen (Pol et al. 2000; Sperotto et al. 2000). Als weitere Substanzen werden heute Nukleosidanaloga wie die erprobte Substanz Lamivudine eingesetzt. Problematisch hierbei ist der häufige Wiederanstieg der Virämie nach Absetzen der Therapie und eine häufige Resistenzentwicklung bei einer Dauertherapie (Ahmed et al. 1999, Lai et al. 1998).

3 Patientenkollektiv und Methoden

3.1 Patientenkollektiv

Die Untersuchung wurde an Patienten des Zentralkrankenhauses (Hôpital Central) in Yaoundé, der Hauptstadt von Kamerun, durchgeführt. Das Hôpital Central hat das größte Einzugsgebiet aller Krankenhäuser des Landes. Vor Aufnahme in die Studie erfolgte die Aufklärung und schriftliche Einverständniserklärung der Patientinnen.

3.1.1 Probenentnahme und Testpersonen

Von 109 Mutter-Kind-Paaren wurde am Tag der Geburt des Kindes Venenblut der Mutter und Nabelschnurblut des Neugeborenen entnommen. Von allen noch erreichbaren Säuglingen dieses Kollektivs (n=25) wurde im Alter von sechs Monaten eine weitere Blutprobe entnommen. Für die Blutentnahme und die weitere Aufarbeitung der Proben wurde eigens für diese Untersuchung angeschafftes Einmalmaterial verwendet. Die Serumproben wurden bis zur Untersuchung tiefgefroren.

Die anti-HBc-Bestimmungen wurden freundlicherweise von Frau Dr. Angela Uy, Institut für Medizinische Mikrobiologie der Universität Göttingen, durchgeführt. HBsAg und HBeAg wurden am Institut für Medizinische Virologie des "Centre Universitaire des Sciences de la Santé" (C.U.S.S.) in Yaoundé bestimmt. Es wurden kommerziell erhältliche ELISA-Testsysteme (Enzygnost^R) verwendet, die für die in Kamerun durchgeführten Untersuchungen von der Firma Behringwerke AG, Marburg, dankenswerterweise zur Verfügung gestellt wurden. Alle Seren wurden auf das Vorhandensein von HBsAg untersucht. Bei positivem HBsAg-Befund wurde zusätzlich auf HBeAg getestet. Da anti-HBc in der Regel als erster Antikörper kurz nach dem Auftreten von HBsAg nachweisbar wird und meist lebenslang persistiert, ist seine Bestimmung der wertvollste Parameter für epidemiologische Untersuchungen (Chernesky 1987). Die meisten HBsAg-negativen Proben wurden deshalb auf anti-HBc getestet. Wegen teilweise nicht ausreichender Serummenge konnten nicht alle Proben auf anti-HBc getestet werden, da eine zweite Blutentnahme nicht möglich war.

Der HBV-DNA-Nachweis mit der Polymerase-Kettenreaktion wurde im Labor der Univeritäts-Kinderklinik Gießen durchgeführt. Die untere Nachweisgrenze der Methode wurde anhand einer Verdünnungsreihe eines HBV-DNA-positiven Standardserums ermittelt und

lag bei etwa 1000 HBV-Genomen/ml Serum. Negativ- und Positivkontrollen wurden in jedem Experiment mitgeführt. Zur Spezifitätskontrolle wurde ein Teil der PCR-Produkte sequenziert oder mit $5'(^{32}\text{P})$ -markierten, zu einem internen Bereich des zu amplifizierenden HBV-Genabschnitts homologen Oligonukleotiden nach Blotten auf Nitrozellulosefolie hybridisiert.

3.2 Immunologische Methoden (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

3.2.1 Nachweis von HBsAg

Die Konzentration von HBsAg wird in Einheiten gemessen. Eine Einheit des Paul-Ehrlich-Standards (PEI-Einheit) entspricht dabei etwa 1 ng HBsAg in serologisch aktiver Form (Gerlich et al. 1994). Die zur Zeit verwendeten Enzymimmunoassays (EIA) sind auf höchste Empfindlichkeit ausgelegt und können Werte zwischen 0,05 und 30 PEI-Einh./ml quantitativ unterscheiden. Der typische gesunde niedrigvirämische HBsAg-Träger hat HBsAg-Konzentrationen zwischen 1000 und 25000 PEI-Einh./ml. Ein hohes Signal des unverdünnten Serums im EIA besagt also nichts über das Ausmaß der Virämie, da der lineare Bereich sich auf die hohen Empfindlichkeitsstufen beschränkt.

Der Enzygnost^R-HBsAg-Mikro ist ein nach dem Sandwich-Prinzip (Chernesky 1987) aufgebauter Enzymimmunoassay. Die Mikrotiterplatten sind mit Antikörpern gegen das HBsAg beschichtet. In die Vertiefung wird die Plasma- oder Serumprobe (100µl) gegeben und inkubiert. Das in der Probe befindliche Antigen bindet an den Antikörper. Nicht fixiertes Material wird sodann durch zweimaliges Waschen entfernt. Es wird anschließend die Konjugatlösung zugegeben. In dieser 2. Reaktion wird Peroxidase-konjugierter Antikörper gegen HBsAg an die noch freie Ag-Determinante gebunden. Die nicht gebundenen enzymkonjugierten Antikörper werden ausgewaschen. Durch Zugabe des Substrats Wasserstoffperoxid wird die gebundene Enzymaktivität bestimmt. Die enzymatische Reaktion wird mit Hilfe des Chromogens o-Phenylendiamin sichtbar gemacht. Die Reaktion wird mit 0,5 N Schwefelsäure gestoppt und kann photometrisch bei 492 nm abgelesen werden. Die Farbintensität ist der in der Probe vorhandenen HBsAg-Konzentration proportional (vgl. Anleitung zum Behring-Enzygnost^R-HBsAg-Mikro). Der Test hat eine hohe Spezifität von 99,9 %. Die Nachweisgrenze liegt bei unter 0,18 ng/ml. Mit dem "Organon-Washer" wurde die genaue Durchführung der Waschschrte erleichtert, da er die gleichzeitige Bearbeitung von 8 Probengefäßen ermöglicht. Der Einsatz des Waschgeräts ist bei

Vorhandensein einer Wasserstrahlpumpe, eines Absauggerätes und Stromanschlusses für eine Kreislumpumpe auch in den Tropen möglich.

3.2.2 Nachweis von HBeAg

Der Enzygnost^R-HBe ist ebenfalls ein nach dem Sandwich-Prinzip aufgebauter ELISA. Die Nachweisgrenze liegt bei unter 3 U/ml.

3.2.3 Nachweis von Anti-HBc

Der Enzygnost^R-Anti-HBc ist ein kompetitiver Enzymimmuntest. Die Mikrotiterplatten sind mit gentechnologisch hergestelltem HBcAg beschichtet, an das der in der Probe nachzuweisende Antikörper bindet. In einer 2. Reaktion werden Peroxidase-konjugierte Anti-HBc-Antikörper zugegeben, die an die noch nicht gebundenen Antigen determinanten binden. Nach einem Waschvorgang zur Entfernung von überschüssigem Konjugat wird Chromogen-Lösung zur Farbreaktion zugegeben. Nach Zugabe der Stopplösung erfolgt die Farbmessung. Die Farbintensität ist der in der Patientenprobe vorhandenen Anti-HBc-Konzentration umgekehrt proportional. Der Test hat eine Nachweisgrenze von 1,5 U/l und eine Spezifität von über 99,2 %.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 Isolierung von HBV-Partikeln aus Serum

Das Serum wird 10 Minuten bei 10.000 UPM in einer Eppendorf-Zentrifuge vorzentrifugiert, um Zellreste zu entfernen. Anschließend werden 0,5 ml einer 10%-Saccharose-Lösung in ein 4 ml Beckman-Zentrifugenröhrchen gegeben, mit 1 ml Serum überschichtet und mit PBS-Puffer aufgefüllt. Durch Ultrazentrifugation bei 50.000 UPM und 4°C in einem Beckman SW60-Rotor werden die Dane-Partikel über das Saccharose-Kissen pelletiert. Der Überstand wird dekantiert und das verbleibende Pellet in 2 ml 50 mM MOPS-Puffer (pH 7,0) resuspendiert. Nach Suspension kann die Probe bei -70°C gelagert werden.

3.3.2 Nukleinsäure -Isolierung

Aus dem in 2 ml 50 mM MOPS-Puffer (pH 7,0) suspendierten Viruspellet erfolgte die Isolierung der viralen DNA nach einem modifizierten Protokoll von Sattler und Robinson (Nishida et al. 1995). Zur Probe werden 20 µl Heringsperma-DNA (250 ng/µl), 100 µl Proteinase K (20 mg/ml) und 200 µl SDS 10%, des anionischen Detergens Natriumdodecylsulfat, zugegeben, so daß eine Endkonzentration von 1mg/ml resp. 1% erreicht wird. Zum Verdau der Proteine wird die Probe im Wasserbad 30 Min. bei 37°C, 30 Min. bei 60°C und erneut 30 Min. bei 37°C inkubiert. Die zugegebene Heringsperma-DNA dient als Carrier für die anschließende Präzipitation der DNA. Um das SDS wieder auszufällen, wird 1 ml 2,5 M Kaliumacetat (pH 4,8) zugegeben und die Probe für 10 Min. bei 2500 UPM zentrifugiert. Der Überstand enthält die gelöste virale DNA.

3.3.3 Reinigung von DNA vor enzymatischen Reaktionen

Vor dem Einsatz von DNA in enzymatischen Reaktionen wird sie von kontaminierenden Molekülen und Enzyminhibitoren gereinigt. Es wurden zwei Methoden angewandt; das Prinzip der Ionenaustauscher-Säulenchromatographie und ein modifiziertes Protokoll von Vogelstein und Gillespie. Die virale DNA wird, bevor sie als Probe in die PCR eingesetzt wird, über eine Ionenaustauschersäule der Fa. Qiagen gereinigt (Nedjar et al. 1994). Die Matrix dieser Säule besteht aus Silicagel, das positiv geladene Gruppen enthält und mit einer hydrophilen Substanz beschichtet ist, die unspezifische Bindungen verhindert. In der mobilen Phase liegt ein pH-Wert vor, bei dem alle Nukleinsäuren negative Nettoladungen tragen, so daß sie an die positiven Gruppen des Austauscherharzes binden. Erhöht man nun die NaCl-Konzentration und den pH-Wert der mobilen Phase, so verdrängen die Chloridionen die negativ geladene DNA; die Nukleinsäuren werden eluiert.

Eine "Qiagen-100"-Säule wird mit 2 ml QBT-Puffer äquilibriert und die Probe auf die Säule pipettiert. Es folgen drei Waschschrte mit je 4 ml QC-Puffer, um kontaminierende Substanzen zu entfernen. Die gereinigte DNA wird mit 4 ml QF-Puffer eluiert und isovolämisch mit Isopropanol präzipitiert. Nach 2 h Inkubation bei -20°C wird die DNA durch Zentrifugation (30 Min. bei 14.000 UPM und 4°C) pelletiert. Der Überstand wird dekantiert. Zum Auswaschen noch vorhandener Salze wird das Pellet in 1 ml Äthanol 70% durch Vortexen suspendiert und durch Zentrifugation (15 Min. bei 14.000 UPM und RT) repelletiert. Der Überstand wird dekantiert und das Pellet bei 60°C im Heizblock kurz angetrocknet. Die DNA wird in 20 µl sterilem Aqua bidestillata gelöst und kann als Ausgangsmaterial in der PCR eingesetzt werden.

Zur Reinigung von DNA-Proben nach einem modifizierten Protokoll von Vogelstein und Gillespie wurde ein Isogene-Kit der Fa. Wack-Chemie (Bad Homburg) verwendet. Zur Probe werden 2 Volumina 6M Natriumjodidlösung gegeben und 5 Min. auf Eiswasser inkubiert. Anschließend werden pro 5 µg DNA-Gehalt der Probe 10 µl des DNA-Binder-Reagenz zugegeben und durch 10 Min. Hin-und-Herkippen die DNA-Bindung optimiert. Durch 5 Min. Zentrifugation (14.000 UPM bei RT) wird die gebundene DNA pelletiert. Das Pellet wird dann dreimal mit je 200 µl Wasch-Puffer durch kurzes Vortexen und anschließende Repelletierung gewaschen. Der Überstand wird dekantiert und die DNA in destilliertem Aqua eluiert. Dazu werden zum Pellet 20 µl Aqua gegeben und nach kurzem Vortexen wie oben beschrieben zentrifugiert. Der Überstand, der die eluierte DNA enthält, wird abgenommen und der Elutionsschritt nochmals mit weiteren 20 µl Aqua wiederholt, um eine maximale DNA-Elution zu gewährleisten.

3.3.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Das Prinzip der PCR wurde 1986 von Mullis et al. veröffentlicht (Saiki et al. 1988). Es stellt ein biochemisches Verfahren zur exponentiellen Vermehrung eines DNA-Fragments dar (**siehe Abb.7**). Der DNA-Bereich, der durch eine DNA-Polymerase wiederholt repliziert wird, liegt zwischen zwei Bereichen mit bekannter Nukleotidsequenz. Als Starter (Primer) für die Reaktion werden Oligonukleotide eingesetzt, deren Nukleotidsequenz komplementär ist zum 3'-Ende des zu amplifizierenden DNA-Segments. Das Reaktionsgemisch wird einem zyklischen Temperaturwechsel unterzogen: Zuerst wird bei 94°C denaturiert (Melting), wodurch die doppelsträngige DNA in ihre beiden Einzelstränge aufgetrennt wird. Nach Abkühlung auf etwa 60°C binden die Primer an ihre komplementären Zielsequenzen am 3'-Ende des jeweiligen DNA-Einzelstranges (Annealing) und initiieren so die Synthese des komplementären DNA-Stranges. Während der Inkubation beim Temperaturoptimum der DNA-Polymerase, bei 72-74°C, wird die Synthese weitergeführt (Extension). Die hitzestabile DNA-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* verliert beim erneuten Erhitzen der Probe auf 94°C ihre Aktivität nicht. Im folgenden Zyklus werden die neu synthetisierten Tochterstränge vom Originalstrang getrennt und dienen nun ihrerseits als Matritze für die DNA-Synthese. Da in jedem der nachfolgenden Zyklen

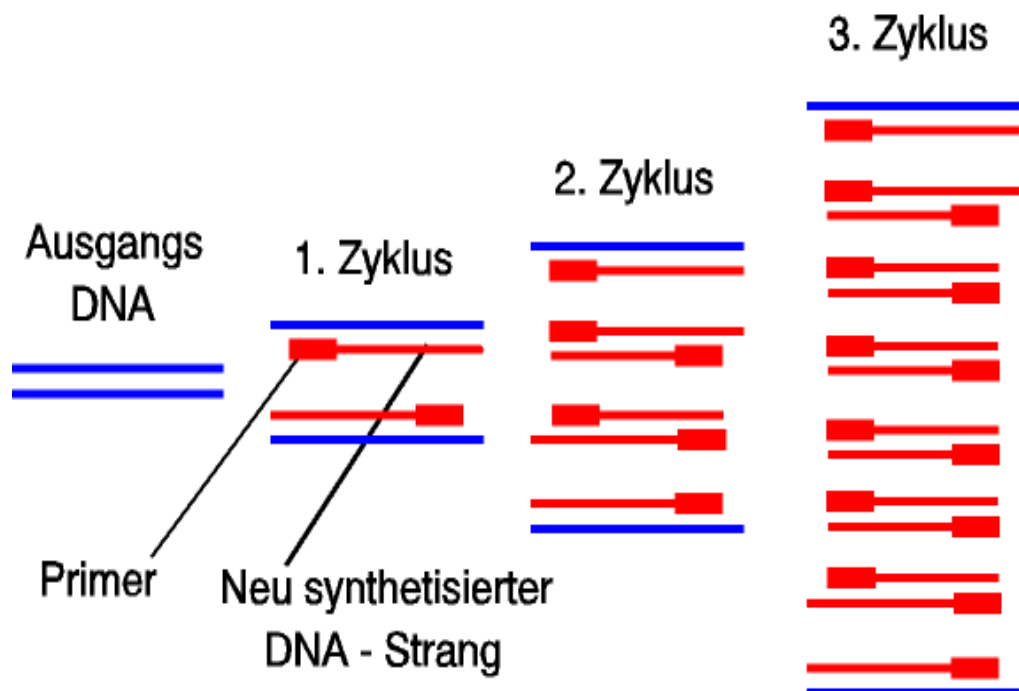


Abb.7: Polymerase-Kettenreaktion

Ein biochemisches Verfahren zur exponentiellen Vermehrung eines DNA-Fragments. Als Starter (Primer) für die Reaktion, bei der ein DNA-Bereich durch eine DNA-Polymerase wiederholt repliziert wird, werden Oligonukleotide eingesetzt, deren Nukleotidsequenz komplementär ist zum 3'-Ende des zu amplifizierenden DNA-Segments

eine Verdopplung der Ausgangs-DNA erfolgt, wird unter optimaler Reaktionseffizienz bei n Zyklen die ursprüngliche DNA-Menge um den Faktor 2^n vermehrt. Vor allem die begrenzte Enzymaktivität und Wechselwirkungen zwischen den neu synthetisierten DNA-Molekülen untereinander erlauben jedoch nur während der ersten Reaktionszyklen eine vollständige Verdopplung der Zielsequenz mit exponentieller Produktvermehrung und führen dazu, daß die Reaktion fließend in eine Phase nur noch linearer Produktvermehrung übergeht.

Bei der vorliegenden Untersuchung wurden für die Prä-S-Region des HBV-Genoms spezifische Oligonukleotid-Primer verwendet, die an Regionen binden, welche im Vergleich der einzelnen HBV-Genotypen eine sehr hohe Homologie aufwiesen. Hierdurch sollte eine Amplifikation von Genomabschnitten aller bekannten HBV-Genotypen ermöglicht werden. Ihre Positionen entsprechen den Basen 2815-2839 und 193-179 der DNA-Sequenz des HBV-Serosubtyps "ayw" (Bichko et al. 1985). Die Sensitivität der PCR zum Nachweis von HBV-Genomen im Serum wurde in seriellen Verdünnungsreihen ermittelt. Die geringste noch nachweisbare Konzentration lag bei 10^3 Virusgenomen / ml Serum. Als Standard wurde ein Serum eingesetzt, dessen Viruskonzentration von Prof. Dr. Gerlich (Medizinische Virologie der Justus-Liebig-Universität

Gießen) unter Verwendung des "Euro-Hep-Standards" als Bezugsgröße bestimmt worden war. Alle mütterlichen und kindlichen Seren mit positivem DNA-Nachweis wurden zudem in einer speziellen Multiplex-Polymerase-Kettenreaktion zur Bestimmung des HBV-Genotyps untersucht (Repp et al. 1993).

Die Oligonukleotidprimer hatten die folgenden Sequenzen:

Primer P1: 5'-GGGTCACCATATTCTTGGGAACAAGA-3' (Sense primer)

Primer P2: 5'-GCAGGGGTCCTAGGAATCCTGATG-3' (Antisense primer)

An die Oligonukleotidprimer war jeweils eine Erkennungssequenz für die Restriktionsenzyme Sal I und Bcl I angefügt, um die PCR-Produkte in einen Vektor klonieren zu können.

Reaktionsgemisch (100µl):	33,5 µl	bidest., steriles Aqua
	10 µl	Reaktionspuffer
	27 µl	Template-Puffer
	4 µl	dATP (10 µmol)
	4 µl	dCTP (10 µmol)
	4 µl	dGTP (10 µmol)
	4 µl	dTTP (10 µmol)
	5 µl	Primer I (20 µMolar)
	5 µl	Primer II (20 µMolar)
	0,5 µl	Taq-Polymerase (2,5 U)
	3 µl	DNA-Präparation

Zur Inaktivierung vorhandener Proteasen wurde das Gemisch vor Zugabe der DNA-Polymerase für 5 Min. bei 95°C inkubiert. Die PCR wurde in einem Fischer-Technik-System, bestehend aus drei Heizbädern und einem Beförderungskran, das an ein Computersystem angeschlossen ist, durchgeführt.

Amplifikation:	Zyklus 1:	Melting	5'	94°C
		Annealing	2'	63°C
		Extension	2'	74°C
	Zyklus 2-34:	Melting	1'	94°C
		Annealing	2'	63°C
		Extension	2'	74°C
		(+ 3"/Zyklus)		
	Zyklus 35:	Melting	1'	94°C
		Annealing	2'	63°C
		Extension	10'	74°C

5 µl der PCR-Probe werden durch Agarosegelelektrophorese analysiert. Die Proben wurden bei -20°C aufbewahrt.

3.3.5 Agarosegel-Elektrophorese

Wird ein elektrisches Feld an ein Agarosegel angelegt, so wandert die DNA, die bei einem neutralen pH negativ geladen ist, zur Anode. Lineare doppelsträngige DNA-Moleküle zeigen im elektrischen Feld auf Agarosegelen eine Wanderungsgeschwindigkeit, die umgekehrt proportional dem dekadischen Logarithmus ihres Molekulargewichtes ist (Helling et al 1974).

Zur Herstellung eines 2% Gels wird zunächst die entsprechende Menge Agarose in 1x TAE-Puffer (pH 8) aufgeköcht. Nach Abkühlen auf 50°C wird die Agarose in eine flache, abgedichtete Plexiglasform gegossen, wobei durch Einstecken eines PVC-Kammes nahe der Kathode 3 mm breite, nicht bis zum Gefäßboden reichende Vertiefungen ausgespart werden (Maniatis et al. 1982). 5 µl des Längenmarkers (Marker IV, Boehringer Mannheim) werden mit 5 µl sterilem Aqua bidest., 1 µl Blaumarker (Bromphenolblau) und 1 µl Glycerin (zur Erhöhung des spezifischen Gewichts) versetzt und in die äußerste Vertiefung pipettiert. 5 µl des Probengemisches werden mit 5 µl sterilem Aqua bidest. und 1 µl Glycerin versetzt und in die Vertiefungen pipettiert. Mit einer Spannung von 5 Volt/cm Gellänge erfolgt die Elektrophorese. Als Laufpuffer dient 1x TAE-Puffer. Nachdem die Bromphenolbande das anodenseitige Gel-Ende erreicht hat, wird die Elektrophorese beendet und die DNA-Banden werden durch Überschichten des Gels mit einer Ethidiumbromidlösung (0,5 µg/ml) angefärbt. Das Gel wird unter UV-Beleuchtung (254 nm) unter Verwendung eines Polaroidfilmes (Typ 57)

photographiert. Die Größe der DNA-Fragmente läßt sich durch Vergleich mit den DNA-Banden des Längenstandards bestimmen.

3.3.6 Schneiden der DNA mit Restriktionsenzymen

Die DNA-Probe sowie das Plasmid pUC19 werden mit den passenden Restriktionsendonukleasen geschnitten. Es wurden die vom Hersteller angegebenen Puffer und Inkubationstemperaturen verwendet.

Restriktionsansatz HBV-DNA-Probe: 1 µg DNA-Probe, 5 µl Sal I (20 U), 5 µl Bcl I (20 U), 10 µl Puffer H, Aqua bidest. ad 100 µl.

1. Restriktionsansatz Plasmid pUC19: 10 µg pUC19 (0,25 µg/ml), 5 µl Sal I (20 U), 10 µl Puffer H, Aqua bidest. ad 100 µl.

2. Restriktionsansatz Plasmid pUC19: 40 µl Sal I verdautes pUC19, 5 µl Bam HI (20 U), 10 µl Puffer B, 45 µl Aqua bidest.

Restriktionsansatz Plasmid-DNA:

40 µl Plasmid-DNA, 2 µl EcoRI, 2 µl HindIII, 0,3 µl RNase H, 5 µl 10x Puffer B.

Die vollständigen Restriktionsansätze werden kurz gevortext. Nach 3 h Inkubation bei 37°C im Wärmeblock wird ein Aliquot zur Agarosegelanalyse entnommen.

3.3.7 Ligase-Reaktion

Die Ligase Reaktion stellt eine enzymatische Verknüpfung des in Bakterien zu vermehrenden und als Insert bezeichneten DNA-Fragments (geschnittenes PCR-Produkt) mit dem Vektor (pUC19) her, der die zur extrachromosomalen DNA-Vermehrung in Bakterien erforderlichen Sequenzabschnitte und ein β-Lactamase-Gen als Selektionsmarker trägt.

Ligase-Reaktionsansatz:

20 µl DNA-Probe, 2 µl Sal I und Bam HI verdautes pUC19 (500ng), 5 µl Ligase-Puffer, 1 µl T4-Ligase, 22 µl Aqua bidest.

Molares Verhältnis Insert/Vektor = 3:1

Der Ligase-Ansatz wird 16 h abgedunkelt bei 14°C inkubiert; anschließend wird er bei 4°C aufbewahrt.

3.3.8 Herstellen kompetenter Bakterien

Es wird zunächst eine Bakterien-Vorkultur hergestellt: Zu 20 ml 2YT-Medium ohne Ampicillin werden 50 µl einer Glycerinkultur des E. coli-Stammes JM 101 gegeben und über Nacht (16 h) bei 37°C und 250 UPM kultiviert. Anschließend wird die Hauptkultur angesetzt: Zu 20 ml 2YT-Medium ohne Ampicillin werden 100 µl der Vorkultur gegeben und unter oben angegebenen Bedingungen etwa 1 h kultiviert, bis eine optische Dichte des Kulturmediums von ca. 0,3 erreicht ist, gemessen im Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 550 nm. Die Bakterienkultur wird daraufhin durch Zentrifugation (20 Min. bei 2500 UPM und 4°C) in einem JA-14-Rotor sedimentiert. Das Bakteriensediment wird in 10 ml 0,1 M Magnesiumchlorid auf Eis resuspendiert und erneut abzentrifugiert (20 Min. bei 1500 UPM und 4°C). Daraufhin werden die Bakterien in 10 ml 0,1 M Calciumchlorid resuspendiert, 20 Min. auf Eis inkubiert und anschließend wie oben angeben abzentrifugiert. Das Sediment wird in 2 ml 0,1 M Calciumchlorid resuspendiert und 2 h auf Eis inkubiert. Derartige kompetente Bakterien können bis zu 48 h auf Eis aufbewahrt werden.

3.3.9 Herstellen von Agarplatten

500 ml 2YT-Medium wird mit 7,5 g Bactoagar aufgekocht und 1 ml (=50 mg) Ampicillin zugegeben. Nach Abkühlung auf 50°C werden die Platten gegossen und nach dem Erstarren auf dem Kopf stehend gelagert.

3.3.10 Transformation kompetenter Bakterien

Zu jedem Ligase-Ansatz werden 100 µl der kompetenten Bakterien gegeben und wie folgt inkubiert: 30 Min. auf Eiswasser, 5 Min. bei 37°C und 10 Min. auf Eiswasser. Anschließend werden 200 µl des vorgewärmten 2YT-Mediums ohne Ampicillin zugegeben und das Gemisch bei 37°C für 45 Min. inkubiert. Daraufhin plattiert man die Bakterien mit einer gebogenen Pasteurpipette auf vorher auf RT gebrachte Agarplatten aus und stellt die Platten auf dem Kopf

stehend zur Kultur in den auf 37°C vorgeheizten Brutschrank. Nach 16 h Kultur werden einzelne Kolonien von den Platten abgehoben, in je 5 ml 2YT-Medium mit Ampicillin gegeben und weitere 16 h bei 37°C und 250 UPM kultiviert.

3.3.11 Isolierung klonierter Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen

Die Plasmide enthaltenden Bakterien wurden in 2YT-Medium bei 37°C kultiviert. Nach 16 h erfolgt die Isolierung der Plasmide durch eine modifizierte alkalische Lyse in Verbindung mit der DNA-Reinigung über Quiagen-Ionenaustauschersäulen.

In ein Eppendorf-Gefäß werden nacheinander je 1 ml der Bakteriensuspension überführt und 1 Min. bei 14.000 UPM abzentrifugiert, so daß sich im Gefäß schließlich ein Pellet aus 3 ml Bakteriensuspension befindet. Das Bakterienpellet wird in 0,3 ml des alkalischen Lysepuffers P1 suspendiert, dem Gemisch dann 0,3 ml des Puffers P2 zugegeben, vorsichtig gemischt bis die Lösung aufklart und 5 Min. bei RT inkubiert. Anschließend wird 0,3 ml des Puffers P3 zugegeben und vorsichtig gemischt. Durch die hohe Salzkonzentration des Puffers P3 (KAc) präzipitieren Proteine, chromosomale DNA, zelluläre Bestandteile und SDS; die anschließende 10minütige Inkubation auf Eis fördert dies noch. Das Lysat wird 15 Min. bei 10.000 UPM und RT in der Eppendorf-Zentrifuge abzentrifugiert und der Überstand, der die gelöste Plasmid-DNA enthält, sofort abpipettiert. Die Reinigung der DNA erfolgt über Quiagen-20-Ionenaustauschersäulen. Die Säule wird mit 1 ml des Puffers QBT äquilibriert und dann der DNA-haltige Überstand darauf pipettiert. Es folgen vier Waschschrte mit je 1 ml des Puffers QC, bevor die DNA mit 0,8 ml des Puffers QF eluiert wird. Die DNA wird mit 0,7 Volumen Isopropanol bei RT entsalzt und präzipitiert und bei 10.000 UPM für 30 Min. zentrifugiert. Um die letzten Salzspuren zu entfernen, wird das DNA-Pellet in 1 ml Äthanol 70% gewaschen, luftgetrocknet und in 40 µl Aqua bidest. gelöst. Je ein Aliquot wird zur Bestimmung der DNA-Menge im Spektralphotometer und zur Agarosegel-Analyse entnommen. Die gelöste DNA wird bei -20°C aufbewahrt.

3.3.12 DNA-Sequenzierungsreaktion nach Sanger

Mitte der 70er Jahre wurden Methoden entwickelt, um die Nukleotidsequenz der DNA zu bestimmen. Diese Fortschritte legten den Grundstein für die ausführliche Analyse der Struktur und Funktion einer großen Anzahl von Genen. Sanger entwickelte die Dideoxy-vermittelte

Kettenabbruchmethode (Sanger et al. 1977). 2',3'-Dideoxynukleotidtriphosphate (ddNTP) unterscheiden sich von konventionellen Deoxynukleotidtriphosphaten (dNTP) dadurch, daß ihnen ein Hydroxylrest an der 3'-Position der Desoxyribose fehlt. Sie können über ihre 5'-Triphosphatgruppe durch die DNA-Polymerase in den DNA-Strang eingebaut werden. Das Fehlen der 3'-Hydroxylgruppe verhindert jedoch die Ausbildung einer Phosphodiester-Bindung mit dem nachfolgenden dNTP. Eine weitere Kettenextension ist so unmöglich. Fügt man eine kleine Menge eines ddNTP zu den vier konventionellen dNTP in ein Reaktionsgemisch, entsteht ein Wettbewerb zwischen Kettenverlängerung und seltenem, aber spezifischem Kettenabbruch. Die Reaktionsprodukte sind Serien von Oligonukleotidketten, deren Länge bestimmt ist durch die Distanz zwischen Ausgangspunkt des Primers und Stelle des vorzeitigen Kettenabbruchs. Verwendet man die verschiedenen ddNTP in vier verschiedenen enzymatischen Reaktionen werden Oligonukleotidpopulationen kreiert, die an Positionen enden, die in der Sequenz des Matrizenstrangs von A,C,G oder T besetzt sind. Die Extensionreaktion wird in zwei Schritten durchgeführt: In der zuerst durchgeführten "Labelling"-Reaktion werden die entstehenden Oligonukleotidketten radioaktiv markiert; die anschließende Terminationsreaktion führt dann zum Kettenabbruch. Trägt man die vier Oligonukleotid-Populationen in benachbarte Spuren eines Sequenz-Gels auf und führt die Elektrophorese durch, kann die Nukleotidsequenz des Originalstrangs von der Reihenfolge der sukzessiv länger werdenden Fragmente in den vier Spuren abgelesen werden. Die Position der aufgetrennten Fragmente wird autoradiographisch bestimmt.

Für die Sequenzierungsreaktionen wurde Sequenase, eine genetisch modifizierte Bakteriophage-T7-DNA-Polymerase ohne 3'-5'-Exonuklease-Aktivität, eingesetzt. Dazu wird die DNA-Probe zunächst in der PCR unter Verwendung von für die Prä-S-Region spezifischen Oligonukleotid-Primern amplifiziert, die an ihrem 5'-Ende das Erkennungssignal für die Restriktionsenzyme Bcl I bzw. Sal I besitzen. Diese Restriktionsschnittstellen finden sich auch als singuläre Signalsequenzen in der Polylinker-Region des Plasmids pUC19 (Messing, 1983). Ein Aliquot der erhaltenen PCR-Probe wird in einer Agarosegel-Elektrophorese eingesetzt und der DNA-Gehalt der Probe wird durch Vergleich mit dem Längenstandard der Markerbande bestimmt. Die restliche DNA-Probe wird durch Isogene-Reinigung von kontaminierenden Molekülen und Salzen getrennt. Das PCR-Produkt wird vor der Sequenzierung in pUC19, einem Plasmid des Bakteriums *Escherichia coli*, unter Verwendung der Restriktionsseiten Sal I und Bam HI kloniert. Vor Beginn der Sequenzierungsreaktionen muß die doppelsträngige DNA durch Zugabe von NaOH in einzelsträngige DNA denaturiert werden. Unter Verwendung eines Sequenase-Reaktionskits läuft die Sequenzierreaktion in den folgenden Einzelschritten ab:

Annealing-Reaktion: Zu 10 µl der Proben-DNA werden 2 µl Annealing-Puffer und 2µl der Primer-Lösung gegeben und 20 Min. bei 37°C inkubiert. Die Primer binden an ihre komplementäre Zielsequenz.

Extensions-Reaktionen:

a) Labelling-Reaktion:

Zur Annealing-Mixtur werden 3 µl des Labelling-Gemisches (dCTP,dGTP und dTTP), 1 µl [³²P]dATP (= 10 µCi) und 2 µl T7-DNA-Polymerase (= 3 U) gegeben und 5 Min. bei RT inkubiert. Die Polymerase verlängert die angelagerten Primer und baut das radioaktiv markierte Nukleotid in die neu synthetisierten Ketten ein.

b) Terminations-Reaktion:

In vier Mikrozentrifugen-Röhrchen 'A', 'C','G' und 'T' werden jeweils 2,5 µl der entsprechenden ddNTP-haltigen Nukleotidmischung pipettiert (z.B. 'A': ddATP in Lösung mit dATP,dGTP,dCTP und dTTP) und 1 Min. auf 37°C vorgewärmt. Sodann werden 4,5 µl der Labelling-Mixtur zu jeder der vorgewärmten Sequenzmischungen gegeben und bei 37°C inkubiert. Das Enzym verlängert die Ketten weiter und baut dabei an verschiedenen Stellen die Abbruchnukleotide ein. Nach 5 Min. werden 5 µl der Stop-Lösung zugegeben. Ein Aliquot wird 2 Min. bei 75-80°C denaturiert und auf ein Sequenziergel aufgetragen. Die restliche Probe wird bei -20°C aufbewahrt.

Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Zur Auftrennung der bei der Sequenzierungsreaktion synthetisierten DNA-Stränge wird ein 6% denaturierendes Polyacrylamidgel verwendet. Zu 60 ml der steril filtrierten Acrylamid-Arbeitslösung werden 370 µl Ammoniumpersulfat 10% und 37 µl TEMED-Puffer gegeben. Die Lösung wird zwischen zwei 25 x 42 cm große abgedichtete Glasplatten, die durch Abstandshalter auf 4 mm Distanz voneinander gehalten sind, gegossen. Man läßt das Gel 1-2 h polymerisieren. Die Glasplatten wurden zuvor mit verschiedenen Silikonlösungen ("bind-silane", "repell-silane") vorbehandelt, um ein gezieltes späteres Festkleben des Gels auf einer der beiden Platten zu erreichen und ein Zerreißen des Gels beim Abnehmen einer Platte zu vermeiden. Am oberen Ende werden mit Hilfe eines PVC-Kammes Vertiefungen eingebracht, in die die Proben eingefüllt werden können. In einem mit dem Laufpuffer (1xTBE) gefüllten Elektrophoresegestell wird mit einer konstanten Spannung von 1300 Volt die Gelelektrophorese durchgeführt. Nach

Beendigung der Elektrophorese wird die obere Glasplatte abgenommen, das Gel 20 Min. in 10% Essigsäure fixiert, mit Leitungswasser abgespült und 30-40 Min. bei 80°C getrocknet. Anschließend erfolgt die Autoradiographie eines Kodak-XAR-2-Films für 16-24 h bei Raumtemperatur.

3.3.13 HBV-DNA-Nachweis durch Southern-blot-Analyse

Ein Zehntel des Amplifikationsgemisches der PCR wurde auf ein 1% Agarosegel aufgetragen, nach der Elektrophorese mit Ethidiumbromid gefärbt und die im Agarosegel enthaltene DNA mit Hilfe einer Vakublot-Kammer auf Nitrozellulose gebunden und über 2 h bei 80°C eingebacken. Die Nitrozellulosefolie wurde in Kunststoff-Folie eingeschweißt. Danach erfolgte die Zugabe des Hybridisierungspuffers aus 900 mM Natriumchlorid, 90 mM Trinatriumcitrat (pH 7,4), 0,02% Polyvinylpyrrolidon, 0,02% Ficoll, 0,02% bovinem Serumalbumin und 50 µg hitzedenaturierter Kalbsthymus-DNA mit einer Inkubation über mindestens 6 h bei 68°C zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen der Nitrozellulose. Die Hybridisierung wurde mit einem ³²P-markierten, für den amplifizierten Bereich Allel-spezifischen Oligonukleotids durch eine Inkubation bei 68°C über 16 durchgeführt. Danach wurde die Nitrozellulosefolie 3x je 30 Minuten in einer wässrigen Lösung aus 15 mM NaCl, 1,5 mM Trinatriumcitrat (pH 7,4) und 0,1% Natriumdodecylsulfat (SDS) bei 65°C gewaschen und nach Lufttrocknen zwischen zwei Verstärkerfolien auf einen Kodak-XAR5-Film bei -70°C exponiert (Thiers et al. 1988; Scotto et al. 1983; Maniatis et al. 1982).

4 Ergebnisse

4.1 Serologische Ergebnisse

4.1.1 Untersuchungen der Mütter

Im Rahmen unserer Untersuchungen wurde von 109 Müttern am Tag der Geburt ihres Kindes Venenblut entnommen. Das Serum wurde mittels ELISA auf HBV-assoziierte Antigene und Antikörper, sowie mittels PCR auf das Vorhandensein von HBV-DNA untersucht. Der serologische Status und die Altersverteilung der Mütter sind in Tabelle 1 und 2 wiedergegeben.

Tabelle 1

Altersverteilung der untersuchten Mütter und Anteil der HBsAg-Trägerinnen

Alter (a)	11-15	16-20	21-25	26-30	31-35	36-40	41-45
	1 (0,9 %)	36 (33 %)	35 (32 %)	26 (23,8 %)	8 (7,3 %)	2 (1,8 %)	1 (0,9 %)
HBsAg+	0	8 (53,3%)	6 (40,0%)	1 (6,7%)	0	0	0

Die HBsAg-Trägerrate betrug 13,7 % und der Anteil HBeAg-positiver Schwangerer 0,9 %. Anti-HBc (Antikörper gegen HBcAg) als Marker der HBV-Durchseuchung wurde bei 75 % der Schwangeren nachgewiesen. Der Anteil positiver PCR-Befunde lag innerhalb der untersuchten Gruppe bei 22,9 % (Tabelle 2). Eine Aufschlüsselung der positiven PCR-Befunde bezogen auf weitere serologische Marker einer HBV-Infektion ist in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 2

Anteil der Mütter mit positiven Befunden für die einzelnen HBV-assoziierten Seromarker (n=109)

HBsAg-positiv	15 (13,7 %)
HBeAg-positiv	1 (0,9 %)
anti-HBc-positiv	82 (75,2 %)
HBV-DNA-positiv	25 (22,9 %)

Tabelle 3

Anteil HBV-DNA-positiver (PCR) Mütter, bezogen auf den serologischen Nachweis von HBeAg, HBsAg und anti-HBc

HBeAg	HBsAg	anti-HBc	Anzahl	davon HBV-DNA-positiv
+	+	+	1/109 (0,9%)	1/1 (100%)
-	+	+	14/109 (12,8%)	5/14 (35,7%)
-	-	+	67/109 (61,5%)	11/67 (16,4%)
-	-	-	27/109 (24,7%)	8/27 (29,6%)

HBsAg-positiv und zugleich HBeAg-negativ Mütter waren zu 36 % in der PCR positiv für HBV-DNA, wogegen 16 % der mütterlichen Seren, die nur anti-HBc aufwiesen, gleichzeitig positive PCR-Resultate erbrachten. Es fällt auf, daß auch bei Schwangeren, welche für alle drei der bestimmten serologischen HBV-Marker HBsAg, HBeAg oder anti-HBc negativ waren, in 29,6% der Fälle HBV-DNA mittels PCR im Serum nachgewiesen werden konnte.

Die Korrelation positiver HBsAg-Befunde mit dem Alter der Mütter wurde anhand des "Fisher Exact Test" untersucht. Dabei zeigte sich eine signifikante Assoziation zwischen einem positiven HBsAg-Befund und einem mütterlichen Alter von unter 25 Jahren (**siehe Tab.1, Abb. 8**).

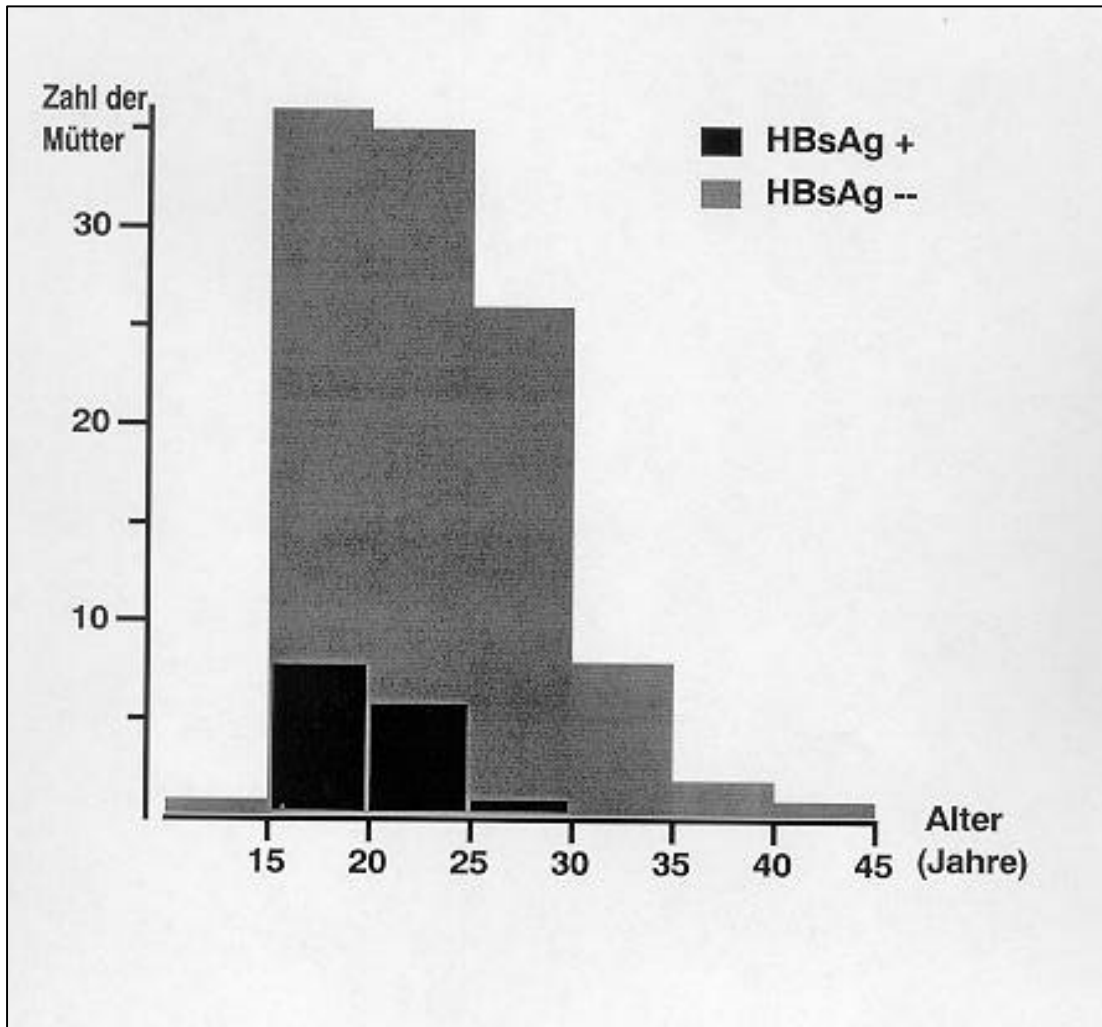


Abb.8: Altersverteilung der untersuchten Mütter und Anteil der HBsAg-Trägerinnen

4.1.2 Untersuchungen der Kinder

Im Nabelschnurblut der Neugeborenen wurde in 6 von 111 Seren HBV-DNA gefunden (**siehe Tab.4**). Zwei der 6 Kinder konnten im Alter von 6 Monaten nachuntersucht werden und waren dann beide HBV-DNA- und anti-HBc-negativ. Insgesamt wurden 25 der 111 Neugeborenen im Alter von 6 Monaten nachuntersucht. Bei 4 dieser Kinder war im Serum der Mutter mit der PCR 6 Monate zuvor, zum Zeitpunkt der Geburt, HBV-DNA nachgewiesen worden. Nur eins der 25 nachuntersuchten Kinder war jedoch mit HBV infiziert worden und serologisch sowohl HBV-DNA- als auch HBsAg- und HBeAg-positiv. Hierbei handelte es sich um das Kind der einzigen HBeAg-positiven Mutter, das als Neugeborenes im Nabelschnurblut noch HBV-DNA-negativ gewesen war.

Tabelle 4

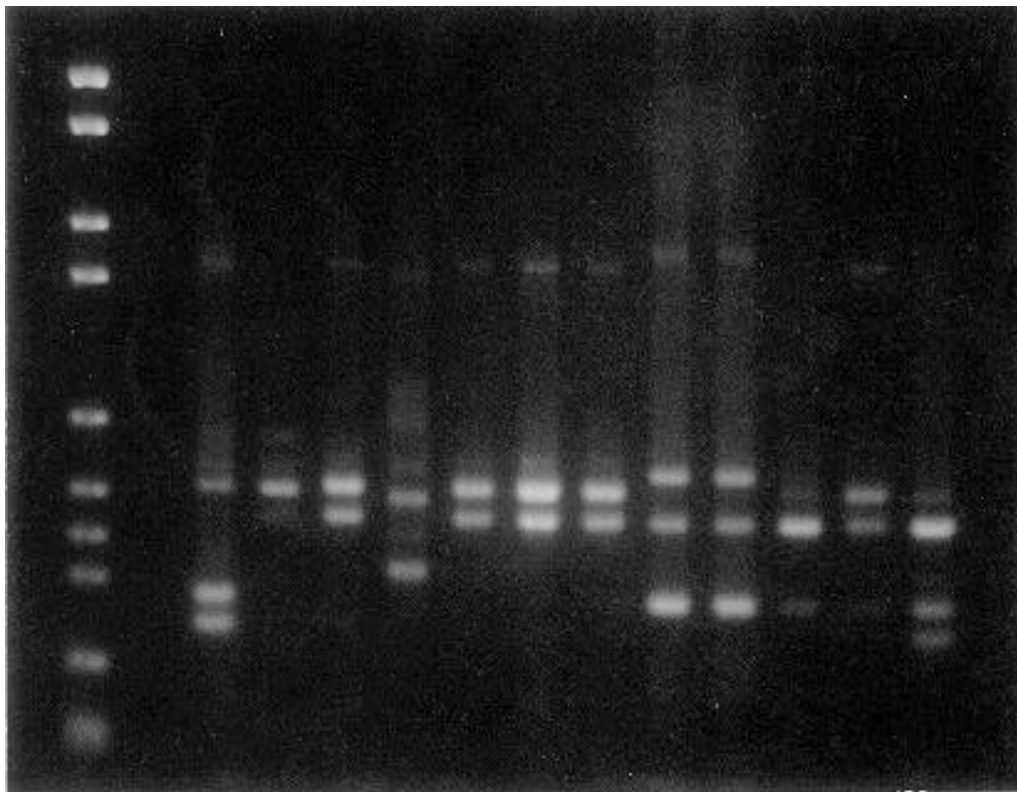
Anteil HBV-DNA-positiver (PCR) Kinder, bezogen auf den serologischen Nachweis von HBeAg, HBsAg und anti-HBc

HBeAg bei Geburt	HBsAg bei Geburt	anti-HBc	Anzahl	HBV-DNA pos. bei Geburt	HBV-DNA pos. mit sechs Monaten
+	+	+	0/111	0/111	
-	+	+	0/111	0/111	
+	-	+	1/111 (0,9%)	0/1	1/25 (4%) der
-	-	+	70/111 (63,1%)	4/70 (6%)	nachuntersuchten
-	-	-	40/111 (36%)	2/40 (5%)	Säuglinge

4.2 HBV-Genotypisierung mittels Multiplex-Polymerase-Kettenreaktion

Die 25 mütterlichen und 6 kindlichen Seren, bei denen mit der Polymerase Kettenreaktion HBV-DNA nachgewiesen wurde, wurden von Repp et al. mit einer speziellen Multiplex Polymerase Kettenreaktion zur Bestimmung des HBV-Genotyps getestet (Repp et al. 1993). Dabei wurden vier Referenzseren eingesetzt. Die HBsAg-Subtypen der Referenzseren waren adw (R1), adw4 (R2), ayw (R3) und adr (R4).

In 71 % (22 von 31) zeigten die getesteten Seren im Agarosegelbild das Bandenmuster des Referenzserums R3, das dem HBsAg-Subtyp ayw und dem HBV-Genotyp D entspricht. Dies steht in Einklang mit dem Vorherrschen dieses Subtyps in Kamerun (Couroucé-Pauty et al. 1976; Okamoto et al. 1988). Daneben wurden drei andersartige Genotypen beobachtet. Ein Bandenmuster wie M70 wurde in vier Fällen (13%) gesehen und ein B96-ähnliches Muster wurde bei drei Serumproben (10%) gefunden. Kind B61 und seine Mutter M61 (6%) zeigten ein einzigartiges Muster, das sich von allen anderen in der Studie untersuchten Proben unterscheidet (siehe Abb.9).



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

Abb.9: HBV-Genotypisierung mittels Multiplex-PCR

Ethidiumbromidfärbung von PCR-Produkten, die über ein 2,5%-Agarosegel aufgetrennt wurden.

- 1 Längenmarker
- 2 negatives Kontrollserum
- 3-6 Referenzseren R1-R4:
 - 3: R1 → Genotyp A
 - 4: R2 → Genotyp F
 - 5: R3 → Genotyp D
 - 6: R4 → Genotyp C
- 7-9 onkologische Studienpatienten
- 10 HbeAg-positive Mutter (M61) aus Kamerun
- 11 Kind (B61) dieser HbeAg-positiven Mutter
- 12-14 mütterliche (M70,M94) bzw. kindliche (B96) Seren aus Kamerun

4.3 Sequenzanalyse der Prä-S-Region eines einzelnen Virusisolats

Da die von einer Mutter und ihrem Kind entnommenen Serumproben M61 und B61 in der HBV-Genotypisierung in der multiplex-PCR ein bei allen anderen für HBV-DNA positiven Serumproben nicht vorkommendes Muster erbrachten, wurde versucht dieses Virusisolat genetisch genauer zu charakterisieren. Dazu wurde die Prä-S-Region des HBV-Genoms aus der

Serumprobe M61, wie oben beschrieben, mittels PCR amplifiziert und in dem E. coli-Plasmidvektor pUC19 kloniert. Die Prä-S-Region wurde zur genetischen Charakterisierung ausgewählt, da in diesem Abschnitt des HBV-Genoms die Variabilität zwischen den einzelnen Genotypen am größten ist. Jeweils drei Klone von zwei getrennten PCR-Ansätzen wurden sequenziert. **Abbildung 10** zeigt die Nukleotidsequenz und den Vergleich mit der dazu ähnlichsten HBV-Sequenz der US-Genbank, welche dem Genotyp E entspricht (Takahashi et al. 2000). Die erhaltene Sequenz wies eine 98,7 prozentige Homologie zu der von Takahashi et al. (2000) publizierten HBV-Genomsequenz auf. Mit Hilfe des Computerprogramms "PCGene" (Fa. Oxford Molecular, Oxford, England) wurde die erhaltene Prä-S-Sequenz der Probe M61 mit der homologen Genomregion anderer HBV-Genotypen verglichen. **Abbildung 11** zeigt das entsprechende Dendrogramm.

Kamerun-61: 21 gggtcacccatattcttgggaacaagagctacatcatggggctttcttggacgggtccctct
 |||
 HBV/E-Ch195:2814 gggtcacccatattcttgggaacaagagctacatcatggggctttcttggacgggtccctct
 PräS/S-ORF: 1 M G L S W T V P L
 Polymerase: 170 G S P Y S W E Q E L H H G A F L D G P S

Kamerun-61: 81 cgaatgggggaagaatcattccaccaccaatcctctgggattttttcccgaccaccagtt
 |||
 HBV/E-Ch195:2874 cgaatgggggaagaatcattccaccaccaatcctctgggattttttcccgaccaccagtt
 PräS/S-ORF: 10 E W G K N H S T T N P L G F F P D H Q L
 Polymerase: 190 R M G E E S F H H Q S S G I F S R P P V

Kamerun-61: 141 ggatccagcattcagagcaaacaccagaaatccagattgggaccacaatccaacaaga
 |||
 HBV/E-Ch195:2934 ggatccagcattcagagcaaacaccagaaatccagattgggaccacaatccaacaaga
 PräS/S-ORF: 30 D P A F R A N T R N P D W D H N P N K D
 Polymerase: 210 G S S I Q S K H Q K S R L G P Q S Q Q R

Kamerun-61: 201 ccactggacagaagccaacaaggtaggagtgggagcattcgggcccggggttcactcccc
 |||
 HBV/E-Ch195:2994 ccactggacggaagccaacaaggtaggagtgggagcattcgggcccggggttcactcccc
 PräS/S-ORF: 50 H W T E A N K V G V G A F G P G F T P P
 Polymerase: 230 P L D G S Q Q G R S G S I R A G V H S P

Kamerun-61: 261 acacggaggccttttggggtggagccctcagggtcaaggcatgctaaaaatgttaccagc
 |||
 HBV/E-Ch195:3054 acacggaggccttttggggtggagccctcagggtcaaggcatgctaaaaacattgccagc
 PräS/S-ORF: 70 H G G L L G W S P Q A Q G M L K T L P A
 Polymerase: 250 T R R P F G V E P S G S R H A K N I A S

Kamerun-61: 321 agatccgcctcctgcctccaccaatcggcagtcaggaaggcagcctaccccaatcactcc
 |||
 HBV/E-Ch195:3114 agatccgcctcctgcctccaccaatcggcagtcaggaaggcagcctaccccaatcactcc
 PräS/S-ORF: 90 D P P P A S T N R Q S G R Q P T P I T P
 Polymerase: 270 R S A S C L H Q S A V R K A A Y P N H S

Kamerun-61: 381 acctttgagagacactcatcctcaggccatgcagtggaa 419
 |||
 HBV/E-Ch195:3174 acctttgagagacactcatcctcaggccatgcagtggaa 3212
 PräS/S-ORF: 110 P L R D T H P Q A M Q W N

```

Polymerase: 290   T F E R H S S S G H A V E

Kamerun-61: 420   ttccacaacattccaccaagctctgcaggatcccagagtaagaggcctgtattttcctgc
                  |||
HBV/E-Ch195:1    ttccacaacatttcaccaagctctgcaggatcccagagtaagaggcctgtattttcctgc
PräS/S-ORF: 123   S T T F H Q A L Q D P R V R G L Y F P A
Polymerase: 303   F H N I S P S S A G S Q S K R P V F S C

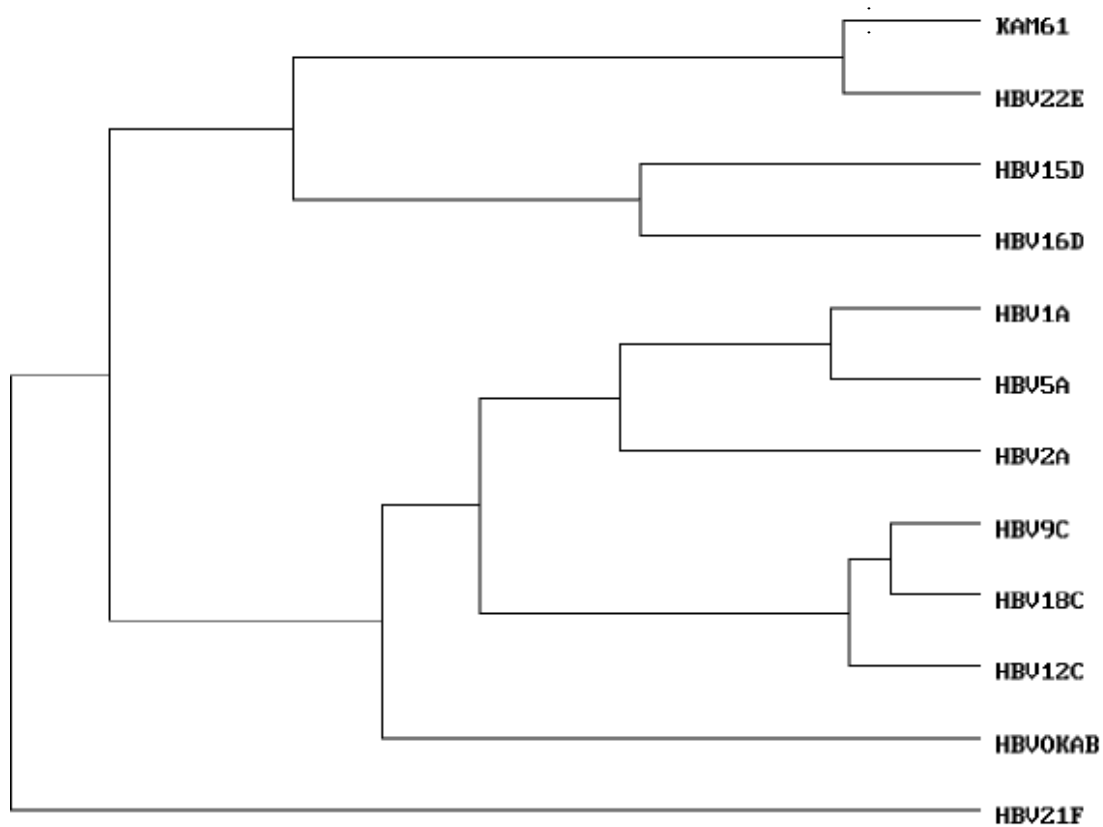
Kamerun-61: 480   tggtaggctccagttccggaacagtgaaccctgttccgactactgcctcactcatctcgtc
                  |||
HBV/E-Ch195:61   tggtaggctccagttccggaacagtgaaccctgttccgactactgcctcactcatctcgtc
PräS/S-ORF: 143   G G S S S G T V N P V P T T A S L I S S
Polymerase: 323   W W L Q F R N S E P C S D Y C L T H L V

Kamerun-61: 540   aatcttctcgaggattggggaccctgcgctgaac 573
                  |||
HBV/E-Ch195:121  aatcttctcgaggattggggaccctgcaccgaac 154
PräS/S-ORF: 163   I F S R I G D P A P N
Polymerase: 343   N L L E D W G P C T E

```

Abb.10: Nukleotidsequenz der Prä-S-Region eines einzelnen Virusisolats

Die von der Serumprobe M61 erhaltene Prä-S-Sequenz (Kamerun-61) wurde mit allen auf der US-Genbank verfügbaren HBV-Sequenzen verglichen. Die dazu ähnlichste Sequenz stammte von einem HBV-Isolat eines natürlich infizierten Chimpansen (HBV/E-Ch-1995) und entsprach dem Genotyp E. Sie war erst im Jahr 2000 publiziert worden. In beiden Sequenzen identische Nukleotide sind durch einen Strich verbunden. Unterhalb der beiden Sequenzen sind die von dem Isolat HBV/E-Ch195 kodierte Aminosäuren im internationalen Einbuchstabencode dargestellt. PräS/S-ORF bezeichnet den PräS/S Leserahmen; Polymerase den Leserahmen, der für die virale Nukleinsäurepolymerase kodiert.



Dendrogram of the alignment.

Abb.11

Der letzte Buchstabe in der Bezeichnung entspricht dem HBV-Genotyp.

- KAM61: HBV-Isolat aus Kamerun, Serum Mutter bzw. Kind M61/B61
- HBV22E: Norder,H. et al., Virology 198489-503 (1994)
- HBV15D: Galibert,F. et al., Nature 281, 646-650 (1979)
- HBV16D: Bichko,V. et al., FEBS Lett. 185, 208-212 (1985)
- HBV1A: Valenzuela,P. et al., in: Fields et al. (eds.) Animal Virus Genetics, 57-70; Academic Press (1980)
- HBV5A: Koechel,H.G., Schueler,A., Lottmann,S., Thomssen,R., unpublished
- HBV2A: Ono,Y. et al., Nucleic Acids Res. 11, 1747-1757(1983)
- HBV9C: Ono,Y. et al., Nucleic Acids Res. 11, 1747-1757 (1983)
- HBV18C: Okamoto,H. et al., J.Gen.Virol. 67, 2305-2314 (1986)
- HBV12C: Fujiyama,A. et al., Nucleic Acids Res. 11, 4601-4610 (1983)
- HBVOKAB: Okamoto,H. et al., J.Gen.Virol. 69, 2575-2583 (1988)
- HBV21F: Naumann,H., et al., J.Gen.Virol. 74, 1627-1632 (1993)

5 Diskussion

5.1 Serologische Befunde bei der chronischen HBV-Infektion

Bei der chronischen Infektion mit dem Hepatitis-B-Virus läßt sich in der Regel im Blut der Virusträger dauerhaft das virale Oberflächenprotein (HBsAg) nachweisen. Bei vielen dieser chronischen HBsAg-Träger kann man hohe Titer von infektiösem HBV im Blut finden, bei anderen sind sehr geringe oder überhaupt keine Titer nachweisbar. Die Unterscheidung dieser beiden Gruppen von HBsAg-Trägern hat klinische und epidemiologische Bedeutung, da virämische Träger eine schlechte Prognose haben und zudem eine bedeutende Infektionsquelle darstellen.

Das lösliche HBeAg ist ein indirekter Marker der persistierenden HBV-Sekretion. (Zyzik et al. 1986; Gerlich et al. 1991; Gerlich et al. 1987; Heijntink et al. 1984; Liaw et al. 1991; Lai et al. 1994). Hochvirämische HBsAg-Träger haben in der Regel hohe HBeAg-Titer von über 1:1000 im ELISA (Zyzik et al. 1986). Bei asymptomatischen HBsAg-Trägern mit negativem HBeAg-Befund ist eine niedrige oder fehlende Virämie wahrscheinlich (Gerlich et al. 1987). Bei einer akuten oder chronischen Hepatitis B kann jedoch auch bei HBeAg-negativen HBV-Trägern mit Serokonversion zu anti-HBe eine deutliche Virämie vorliegen, die dann meist von HBeAg-negativen HBV-Varianten ausgeht. Bei diesen Patienten kann im HBV-Genom ein Stopkodon im PräC-Bereich vorliegen, das die Synthese des löslichen Antigens unmöglich macht (Carman et al. 1993, Ishikawa et al. 1998).

Ein zuverlässigerer Marker für das Ausmaß der Virämie bei HBV-Trägern ist das virale Genom selbst. Untersuchungen zum HBV-DNA-Nachweis zeigen, daß das HBV in einem höheren Prozentsatz der Fälle als ursprünglich angenommen in Leberzellen HBsAg-positiver Patienten selbst nach Serokonversion von HBeAg zu anti-HBe repliziert. Dies deutet darauf hin, daß die Serokonversion von HBeAg zu anti-HBe mehr eine quantitative Änderung des Replikationslevels ist als eine qualitative Änderung oder eine absolute Klärung von replizierendem HBV (Zyzik et al. 1986; Kaneko et al. 1990; Heijntink et al. 1984; Cacciola et al. 2000).

Bei hochvirämischen Personen findet man Viruspartikelzahlen von 10^8 - 10^9 /ml Serum (Shikata et al. 1977; Gerlich et al. 1987). Die dot-blot-Hybridisierung als gängiges Verfahren des HBV-DNA-Nachweises hat eine untere Nachweisgrenze von etwa 0,3 pg/ml, was etwa dreimal 10^5 Viruspartikeln/ml entspricht (Zyzik et al. 1986; Gerlich et al. 1994). Ein negativer Befund schließt somit eine beträchtliche Virämie aus. Mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) kann die

Nachweisgrenze um $5 \log_{10}$ verbessert werden, d.h. es können bereits 1 - 10 Virusgenome/ml Serum nachgewiesen werden. Aufgrund ihrer hohen Empfindlichkeit konnte mit der PCR in einigen Fällen sogar bei ansonsten für alle HBV-Marker negativen Personen im Serum HBV-DNA nachgewiesen werden (Thiers et al. 1988; Brechot et al 1985; Scotto et al. 1983; Wang et al 1991). Es stellt sich die Frage, inwieweit diese Personen als infektiös einzustufen sind, da neben dem Ausmaß der Virämie die Wahrscheinlichkeit der Freisetzung und Inokulation infizierter Körperflüssigkeiten in der jeweiligen Situation eine entscheidende Rolle spielt. Hier ist sicher das Risiko der vertikalen Virusübertragung bei der Geburt eines Kindes anders zu beurteilen als das Infektionsrisiko in Alltagssituationen, wie z.B. in Kindergarten oder Schule (Fry, 2000; Regan et al. 2000; Ballard et al. 1999).

5.1.1 HBV-Marker im Serum der Mütter

Die mittels ELISA erhobenen Hepatitis B assoziierten serologischen Befunde ergaben folgendes Bild: Anti-HBc als Marker durchgemachten HBV-Infektion lies sich bei 82 der 109 untersuchten Schwangeren nachweisen, entsprechend einer Rate von 75,2%. HBsAg-Positivität als Marker einer persistierenden oder akuten HBV-Infektion fand sich bei 15 Personen entsprechend 13,7%. Da bei keiner untersuchten Schwangeren klinische Zeichen einer akuten Hepatitis vorlagen, sollte dieser Wert etwa der HBsAg-Trägerrate innerhalb der untersuchten Gruppe entsprechen. Dieser Wert läßt sich mit Studien anderer Autoren und den Daten der Centers for Disease Control and Prevention (CDC) der USA vereinbaren, wo für das zentrale und südliche Afrika eine HBsAg-Prävalenz der Bevölkerung von über 8% angegeben wird (Centers for Disease Control and Prevention (CDC) 1998; Marinier et al 1985, Roingeard et al 1993, Niu et al 1992). Dabei ist besonders zu erwähnen, daß außer einer Schwangeren alle HBsAg positiven Frauen jünger waren als 25 Jahre. Anhand der Altersverteilung läßt sich für die Altersgruppe von 15 - 25 Jahre eine Konversionsrate von HBsAg positiv zu HBsAg negativ entsprechend etwa 1 %/Jahr abschätzen (**siehe Tab.1, Abb.8**). Danach scheint es mit zunehmendem Alter zu einem sehr deutlichen Rückgang der HBsAg-Trägerrate zu kommen, die sich jedoch wegen der geringen Zahl von nur noch einer positiven Schwangeren bei den über 25-jährigen nicht verlässlich berechnen läßt. Diese Daten stehen im Widerspruch zu einer Untersuchung bei Schwangeren in Simbabwe, bei der eine Korrelation der HBsAg-Trägerrate zum Alter nicht nachgewiesen werden konnte (Madzime et al. 1999). Andere Studien in HBV-Endemiegebieten zeigen jedoch einen ähnlichen Abfall der HBsAg-Trägerrate mit zunehmendem Alter (Chang et al 1989, Hsu et al 1986, Prince 1990).

Auffällig ist weiterhin die sehr niedrige Rate von HBeAg-positiven unter den HBsAg-Trägerinnen (1 von 15). Dieser Befund steht im Einklang zu mehreren serologisch-epidemiologischen Untersuchungen, die für das zentrale Afrika eine im Vergleich zu anderen Endemiegebieten, wie z.B. Südostasien, deutliche niedrigere Rate an HBeAg-Positivität unter den HBsAg Trägern belegen. Als Ursache wird meist der in Afrika in der Regel spätere Infektionszeitpunkt im frühen Säuglings- und Kleinkindesalter vermutet, im Gegensatz zur deutlich höheren Rate konnataler Infektionen in Südostasien (Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 1998; Kiire, 1996; Gust, 1996; Lansang, 1996; Chang, 1996; Chen, 1996). Die geringere Infektiosität und die niedrigere HBeAg-Prävalenz afrikanischer HBsAg-Träger-Mütter könnte aber auch auf geographischen oder genetischen Unterschieden der Virus-Zell-Interaktion beruhen (Vall Mayans et al. 1990; McCarthy et al. 1989; Grathwohl et al. 1991; Özsoylu, 1993; Hyams et al 1989, Prince 1990, Kiire, 1996). Insgesamt stehen die bei den Schwangeren mittels ELISA erhobene HBV-assoziierten serologischen Befunde im Einklang mit mehreren Untersuchungen anderer Autoren zur HBV-Prävalenz in Zentralafrika (Kew, 1992; Krause, 1992; Dazza et al. 1993; Tabor et al. 1993; Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 1998).

5.1.2 HBV-Marker im Serum der Neugeborenen

Von den untersuchten Neugeborenen waren 71 positiv für anti-HBc. Nur eines davon war gleichzeitig positiv für HBeAg, das Neugeborene der HBeAg positiven Mutter. Alle anderen Neugeborenen waren ausschließlich positiv für anti-HBc und sowohl für HBeAg als auch für HBsAg negativ. Alle Mütter der anti-HBc positiven Neugeborenen waren für anti-HBc positiv, so daß hier bei den Neugeborenen von intrauterin übertragenen Antikörpern ausgegangen werden kann. Auch der positive HBeAg-Befund bei einem Neugeborenen spricht für eine intrauterine Übertragung dieses Antigens und nicht für eine intrauterine Infektion, da kein HBsAg im Serum des Kindes nachgewiesen werden konnte. Der negative Befund für HBV-DNA in der PCR paßt zu dieser Vorstellung. Hinweise für eine intrauterine Infektion ergaben sich aufgrund der ELISA-Befunde bei keinem Neugeborenen, da alle für HBsAg negativ waren, ein virales Antigen, das nicht passiv intrauterin übertragen wird.

Der fehlende Nachweis von intrauterinen HBV-Infektion mittels ELISA steht im Einklang zu Berichten anderer Autoren, nach denen eine pränatale Übertragung des Virus auch bei hochvirämischen Müttern sehr selten ist (Matsumoto et al. 1997; Michielsen et al. 1999).

5.2 Eignung der Polymerase-Kettenreaktion zur Beurteilung des Risikos einer perinatalen HBV-Übertragung

Der Nachweis von HBV-DNA im Serum gilt als verlässlichster Marker zur Beurteilung der Infektiosität, da er direkt die Zahl der infektiösen Viruspartikel widerspiegelt. Im Gegensatz hierzu ist das häufig bei dieser Frage bestimmte HBeAg nur ein indirekter Marker mit einer Korrelation von etwa 0,9 zur einer ausgeprägten Virämie ($> 10^5$ Virusgenome / ml Serum) (Zyzik et al. 1986; Gerlich et al. 1987; Gerken et al. 1992). Insbesondere beim Vorliegen sogenannter Prä-Core-Mutanten, die durch eine Mutation im Prä-C-Abschnitt des Prä-C/C-Leserahmens keine HBeAg kodieren, können hohe Konzentrationen infektiöser Partikel auch bei negativen HBeAg-Befund im Serum vorliegen (Okamoto et al. 1994).

Die Gefahr der Virusübertragung von einem HBV-Träger auf einen anderen Menschen hängt neben dem Ausmaß der Virämie beim HBV-Träger ganz entscheidend von dem situationsspezifischen Risiko zur Freisetzung und Inokulation infektiöser Körperflüssigkeiten ab. Im täglichen Umgang hat sich gezeigt, daß von HBV-Trägern, die eine Viruskonzentration von unter 10^5 infektiösen Partikeln/ml Serum aufweisen, nur ein geringes Infektionsrisiko für ihre Umgebung ausgeht. Ganz anders stellen sich Situationen dar, in denen sehr große Mengen infizierter Körperflüssigkeiten parenteral übertragen werden können, wie z.B. bei Bluttransfusionen. Hierbei kann auch von Virusträgern mit sehr gering ausgeprägter Virämie eine Infektionen ausgehen (Gerlich et al. 1994).

Bei der Frage inwieweit der HBV-DNA Nachweis mittels Polymerase-Kettenreaktion bei Schwangeren dazu geeignet ist, das Risiko für eine perinatale Infektion des Neugeborenen zu ermitteln, müssen mehrere Faktoren berücksichtigt werden. Zunächst ist zu beurteilen, ob die Polymerase-Kettenreaktion hinsichtlich ihrer Sensitivität und Spezifität überhaupt dafür geeignet ist, HBV-Genome im Serum von Schwangeren verlässlich nachzuweisen. Die Sensitivität der Methode wurde an seriellen Verdünnungsreihen ermittelt und lag bei 10^3 Genomen/ml. Aufgrund der sehr hohen Sensitivität ist die Gefahr falsch positiver Resultate bei der PCR grundsätzlich sehr hoch. Dies liegt in der Regel nicht an der Technik selbst - so weisen die eingesetzten Oligonukleotidprimer aufgrund ihrer Länge eine hohe Spezifität für die Zielsequenz auf - sondern an den Abläufen der gesamten Probenbearbeitung im Labor. Die Möglichkeit falsch positiver

Resultate ist bei unseren Untersuchungen auch deshalb besonders zu prüfen, da die Rate HBV-DNA-positiver Mütter innerhalb des untersuchten Kollektivs mit 23 % überraschend hoch liegt. Dabei muß die Vielzahl positiver HBV-DNA-Befunde bei Fehlen weiterer serologischer Marker wie HBeAg, HBsAg oder anti-HBc hervorgehoben werden, obwohl bereits aus Asien ähnliche Befunde vorliegen, die in HBV-Endemiegebieten gerade bei HBsAg-negativen Patienten mit der PCR häufiger HBV-DNA nachweisen konnten als bei HBsAg-Trägern (Pereira et al. 1994; Luo et al. 1992). Die Resultate innerhalb der Gruppe von Säuglingen, die im Alter von sechs Monaten nachuntersucht wurden zeigen, daß hier keine falsch-positiven Ergebnisse vorliegen, da der einzige in der PCR positive HBV-DNA-Befund durch den gleichzeitigen Nachweis von HBsAg und HBeAg bestätigt wird. Hieraus kann man folgern, daß bei der technischen Durchführung der PCR im Labor keine Kontaminationen auftraten.

Leider konnte nur eine geringe Anzahl der Kinder im Alter von sechs Monaten nachuntersucht werden, da nur wenige Eltern den bei der Entbindung mitgeteilten Termin zur Nachuntersuchung wahrgenommen haben und diese auch nicht zuhause aufgesucht werden konnten, da sie z.T. von weit her waren und auch keine Straßennamen existieren. So sind die Resultate der Neugeborenen-Untersuchungen weniger eindeutig, da in dieser Gruppe keiner der 6 positiven HBV-DNA-Befunde im Nabelschnurblut durch die Nachuntersuchungen im Alter von 6 Monaten bestätigt werden konnte. Zwei dieser Kinder waren bei der Nachuntersuchung negativ, 4 wurden nicht nachuntersucht. Falsch-positive Resultate, möglicherweise durch Kontaminationen bei der Blutentnahme im Kreißsaal bedingt, sind deshalb nicht völlig auszuschließen. Gegen eine hohe Rate falsch positiver PCR-Befunde sprechen jedoch auch die Daten der HBV-Genotypisierung mittels multiplex-nested-PCR (Repp et al. 1993), die reproduzierbare und der Verteilung der HBV-Genotypen in der Region entsprechende Bandenmuster aufzeigen (Okamoto et al. 1988; Norder et al. 1992; Norder et al. 1993; Norder et al. 1994; Magnius et al. 1995).

Insgesamt läßt sich die Eignung der Polymerase-Kettenreaktion als Screeningverfahren bei Schwangeren zur Erfassung des Risikos für eine perinatale Virusübertragung auf das Neugeborene mit unserer Studie nicht definitiv beantworten. Dies liegt vor allem an der geringen Nachuntersuchungsrate der Säuglinge im Alter von 6 Monaten. Unsere Untersuchungen zeigen, daß Untersuchungen mit der PCR auch in Ländern mit schlechter medizinischer Infrastruktur grundsätzlich durchführbar sind, die hohen Kosten der Probenanalyse lassen jedoch ein damit durchgeführtes Screening auf HBV-DNA gerade in Ländern mit hoher Durchseuchung nicht sinnvoll erscheinen. Der sicherste Weg zur Elimination des Virus besteht in der Impfung aller Neugeborenen sofort nach Geburt (Shapiro et al. 1990; Gust, 1991; Hoofnagle, 1989; Mitsuda et al. 1989; 1991; Forsyth et al. 1995; Milne et al. 1995; McIntyre, 1995; Theppisai et al. 1990). Die

WHO nahm deshalb die Hepatitis-B-Impfung in das "Expanded Program on Immunization" auf und empfiehlt die Einführung der generellen Impfung aller Neugeborenen in die nationalen Impfprogramme (EPI 1992; Ghendon, 1990). Die Impfung ist dort auch in Kombination mit anderen Impfungen wie z.B. Masern (in Kamerun im Alter von 4 Wochen) oder DPT durchführbar (Schoub 1991). In Kamerun wird derzeit in Impfstudien die Effizienz verschiedener Impfschemata geprüft. Die in den Industrieländern bei Neugeborenen HBeAg-positiver Mütter empfohlene Simultanimpfung bei der ersten Dosis ist zum Schutz vor einer perinatalen Infektion nicht unbedingt erforderlich. Die geringe Verschlechterung des Impferfolges ist in Anbetracht der hohen Kostenersparnis vertretbar (Ghendon, 1990; Wheeley et al 1991, Schödel, 1994).

Niedrige HBV-DNA-Titer, die nur mit der Polymerase-Kettenreaktion nachzuweisen sind, können bei der Übertragung großer Mengen von Blut, wie z.B. durch Transfusionen, ein beträchtliches Infektionsrisiko darstellen (Wang et al. 1991; Kaneko et al. 1990; Kaneko et al. 1990; Jackson, 1991; Baker et al. 1991). Weitere Anwendungsbereiche der PCR liegen in der Diagnostik unklarer serologischer Konstellationen, der Verlaufskontrolle bei Lebertransplantationen und in der Verlaufsbeobachtung antiviraler Therapien (Carman et al 1993.; Carman et al. 1990; Gerken et al. 1991). Eine weitere Indikation stellt die Verlaufsuntersuchung bei Personen mit "isolierter anti-HBc-Konstellation" dar. Hier ist in 25-30% der Fälle HBV-DNA niedrigtitrig und somit nur mit der PCR nachweisbar (Marinos et al. 1994). Bei der Interpretation der PCR-Resultate sollte man immer das Gesamtbild der klinischen, biochemischen und serologischen Befunde berücksichtigen.

6 Zusammenfassung

In Kamerun, einem HBV-Endemiegebiet Zentralafrikas, wurden 109 Mütter und ihre Neugeborenen mittels ELISA (anti-HBc, HBsAg, HBeAg) und PCR (HBV-DNA) auf Marker einer HBV-Infektion untersucht. Obwohl etwa 2/3 der Mütter eine HBV-Infektion durchgemacht hatten und die HBsAg-Trägerrate bei 13,7% lag, konnte nur eine einzige perinatale Infektion nachgewiesen werden und zwar bei der einzigen Mutter mit positivem HBeAg-Befund. Auch die Säuglingsnachuntersuchungen im Alter von 6 Monaten zeigen, wie mehrere Berichte anderer Autoren, daß es in der untersuchten Region nur selten zu einer perinatalen Infektion kommt (Ndumbe et al. 1989). Hiernach scheinen niedrige HBV-DNA-Titer im Serum der Mütter, die mit Hilfe der PCR jedoch noch erfaßt werden können, nur mit einem sehr geringen Risiko für eine perinatale Infektion des Neugeborenen einherzugehen. Ein PCR-Screening auf HBV-DNA ist

somit, ganz abgesehen von den hohen Kosten des Verfahrens, für afrikanische Endemiegebiete nicht geeignet, um Mütter mit hohem Risiko für die Übertragung des Hepatitis B-Virus bei der Geburt eines Kindes zu identifizieren. Aus diesen Gründen ist die PCR auch in Regionen mit niedriger HBV-Durchseuchung kein geeignetes Screeningverfahren bezüglich des Risikos einer perinatalen Virusübertragung.

Die HBV-Subtypisierung mittels multiplex-PCR bzw. DNA-Sequenzierung zeigte in 71% der Fälle den HBV-Genotyp D, was mit dem Vorherrschen dieses Genotyps in dieser Gegend übereinstimmt (Okamoto et al. 1988). In 6% der Fälle wurde der Genotyp E nachgewiesen.

Zudem konnten in 13% bzw. 10% der untersuchten Personen zwei neue Muster in der Multiplex-PCR nachgewiesen werden, die keine Ähnlichkeit mit den bisher bekannten Subtypen aufweisen.

7 Literaturverzeichnis

Ahmed A, Keeffe EB (1999): Lamivudine therapy for chemotherapy-induced reactivation of hepatitis B virus infection. *Am J Gastroenterol* 94:249-251.

Ashton-Rickardt PG, Murray K (1989): Mutations that change the immunological subtype of hepatitis B virus surface antigen and distinguish between antigenic and immunogenic determination. *J Med Virol* 29:204-214.

Aufiero B, Schneider RJ (1990): The hepatitis B virus X-gene product *trans*-activates both RNA polymerase II and III promoters. *EMBO J* 9:497-504.

Baker BL, Di Bisceglie AM, Kaneko S, Miller R, Feinstone SM, Waggoner JG, Hoofnagle JH (1991): Determination of hepatitis B virus DNA in serum using the polymerase chain reaction: Clinical significance and correlation with serological and biochemical markers. *Hepatology* 13:632-636.

Baker JR,Jr. (1992): The immune response in chronic hepatitis B virus infection: The "core" of the problem. *Hepatology* 16:498-500.

Ballard AL, Boxall EH (1999): Assessing the infectivity of hepatitis B carriers. *Commun Dis Public Health* 2:178-183.

Ballardini G, Groff P, Zoli M, Bianchi G, Giostra F, Francesconi R, Lenzi M, Zauli D, Cassani F, Bianchi F (1994): Increased risk of hepatocellular carcinoma development in patients with cirrhosis and with high hepatocellular proliferation. *J Hepatol* 20:218-222.

Barnaba V, Balsano F (1992): Immunologic and molecular basis of viral persistence. The hepatitis B virus model. *J Hepatol* 14:391-400.

Bartenschlager R, 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* 7:4185-4192.

Bartenschlager R, Schaller H (1992): Hepadnaviral assembly is initiated by polymerase binding to the encapsidation signal in the viral RNA genome. *EMBO J* 11:3413-3420.

Bayer ME, Blumberg BS, Werner B (1968): Particles associated with Australia antigen in sera of patients with leukemia, Down's syndrome and hepatitis. *Nature* 218:1057-1059.

Beasley RP, Hwang LY, Lin CC, Chien CS (1981): Hepatocellular carcinomas and hepatitis B virus. A prospective study of 22,707 men in Taiwan. *Lancet* ii:1129-1133.

Beath SV, Boxall EH, Watson RM, Tarlow MJ, Kelly DA (1992): Lesson of the Week: Fulminant hepatitis B in infants born to anti-HBe hepatitis B carrier mothers. *BMJ* 304:1169-1170.

Bichko V, Dreilina D, Pushko P, Pumpen P, Gren E (1985): Subtype ayw variant of hepatitis B virus. *FEBS Lett* 185:208-212.

Blumberg BS, Alter HJ, Visnich S (1965): A "new" antigen in leukemia sera. *JAMA* 191:101-106.

Blumberg BS, Gerstley BJS, Hungerford DA (1967): A serum antigen (Australia antigen) in Down's syndrome, leukaemia, and hepatitis. *Ann Intern Med* 66:924-931.

Blumberg BS, Hesser JE (1975): Viral transmission and the role of the carrier. In: Greenwalt TJ, Janieson GA: *Transmissible diseases and blood transfusion*. Grune and Stratton, New York 67-79.

Bortolotti F, Crivellaro C, Brunetto MR, Cadrobbi P, Bertolini A, Alberti A (1993): Selection of a precore mutant of hepatitis B virus and reactivation of chronic hepatitis B acquired in childhood. *J Pediatr* 123:583-585.

Brechot C, Degos F, Lugassy C, Thiers V, Zafrani S, Franco D, Bismuth H, Trepo C, Tiollais P, Berthelot P (1985): Hepatitis B virus DNA in patients with chronic liver disease and negative tests for hepatitis B surface antigen. *N Engl J Med* 312:270-276.

Cacciola I, Pollicino T, Squadrito G, Cerenza G, Villari D, De Franchis R, Santantonio T, Brancatelli S, Colucci G, Raimondo G (2000): Quantification of intrahepatic hepatitis B virus (HBV) DNA in patients with chronic HBV infection. *Hepatology* 31:507-512.

Carman WF, Zanetti AR, Karayiannis P, Waters J, Manzillo G, Tanzi E, Zuckerman AJ, Thomas HC (1990): Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus. *Lancet* 336:325-329.

Carman WF, Thomas HC (1993): Implication of genetic variation on the pathogenesis of hepatitis B virus infection. *Arch Virol* 8:143-154.

Casserly LF, Reddy SM, Rennke HG, Carpinito GA, Levine JS (1999): Reversible bilateral hydronephrosis without obstruction in hepatitis B-associated polyarteritis nodosa. *Am J Kidney Dis* 34:e11.

Cattaneo R, Will H, Hernandez N, Schaller H (1983): Signals regulating hepatitis B surface antigen transcription. *Nature* 305:336-338.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (1998): Health Information for International Travel 1996-97 (Yellow Book). U.S. Department of Health and Human Services,

Chang MH, Chen D-S, Hsu H-C, Hsu H-Y, Lee C-Y (1989): Maternal transmission of hepatitis B virus in childhood hepatocellular carcinoma. *Cancer* 64:2377-2380.

Chang MH (1996): Hepatitis B virus infection in children: epidemiology, natural course and prevention in Taiwan. *J Formos Med Assoc* 95:593-598.

Chernesky M (1987): Virusdiagnostik. *Diag Lab* 37:32-44

Chen DS (1996): Viral hepatitis in East Asia. *J Formos Med Assoc* 95:6-12.

Colombo M (1992): Hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 15:225-236.

Crowther RA, Kiselev NA, Bottcher B, Berriman JA, Borisova GP, Ose V, Pumpens P (1994): Three-dimensional structure of hepatitis B virus core particles determined by electron cryomicroscopy. *Cell* 77(6):943-50.

Cotonat T, Quiroga JA, Lopez Alcorocho JM, Clouet R, Pardo M, Manzarbeitia F, Carreno V (2000): Pilot study of combination therapy with ribavirin and interferon alfa for the retreatment of chronic hepatitis B e antibody-positive patients. *Hepatology* 31:502-506.

Couroucé-Pauty AM, Holland PV, Muller JY, Soulier JP (1976): HBs antigen subtypes. In: *Bibliotheca Haematologica*, No. 42, Karger AG, Basel.

Dane DS, Cameon CH, Briggs M (1970): Virus-like particles in serum of patients with australia antigen associated hepatitis. *Lancet* 1:695-698.

Davis BD, Dulbecco R, Eisen HN, Ginsberg HS (1980): *Microbiology*. 3rd ed. Harper & Row, Philadelphia

Dazza MC, Trebucq A, Gaudebout C, Jarretou A, Le Hesran JY, Josse R, Delaporte E, Bréchet C, Larouze B (1993): Population-based study of serum hepatitis B virus DNA in Gabon. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 87:539-540.

Eddleston ALWF, Mondelli M (1986): Immunopathological mechanisms of liver injury in chronic hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 3,suppl.2:17-23.

Expanded Program on Immunization (1992): Program Report, WHO/EPI/GEN 93:1-58

Feitelson M (1992): Hepatitis B virus infection and primary hepatocellular carcinoma. *Clin Microbiol Rev* 5:275-301.

Forsyth JRL, Darlington R, Thompson S (1995): Hepatitis B vaccination. *S Afr Med J* 85:793-794.

Fry DE (2000): Hepatitis: risks for the surgeon. *Am Surg* 66:178-183.

Galibert F, Chen TN, Mandart E (1982): Nucleotide sequence of a woodchuck hepatitis virus genome: comparison with the hepatitis B virus sequence. *J Virol* 41:51-65.

Galibert F, Mandart E, Fitoussi F, Tiollais P (1979): Nucleotide sequence of the hepatitis B virus genome (subtype ayw) cloned in *E. coli*. *Nature* 281:646-650.

Ganem D, Varmus HE (1987): The molecular biology of the hepatitis B virus. *Ann Rev Biochem* 56:651-693.

Gavilanes F, Gomez-Gutierrez J, Aracil M, Gonzalez-Ros JM, Ferragut JA, Guerrero E, Peterson DL (1990): Hepatitis B surface antigen. Role of lipids in maintaining the structural and antigenic properties of protein components. *Biochem J* 265:857-864.

Gerken G, Gerlich WH, Br  chet C, Thomas HC, Bonino F, De Moura C, Meyer zum B  schenfelde K-H (1992): Biological standards for hepatitis B virus assays. *J Hepatol* 15:251-255.

Gerken G, Paterlini P, Manns M, Housset C, Terre S, Dienes H-P, Hess G, Gerlich WH, Berthelot P, Zum B  schenfelde K-HM, Brechet C (1991): Assay of hepatitis B virus DNA by polymerase chain reaction and its relationship to pre-S- and S-encoded viral surface antigens. *Hepatology* 13:158-166.

Gerlich WH, Caspari G, Uy A, Thomssen R (1991): A critical appraisal of anti-HBC, HBV DNA, and anti-HCV in the diagnosis of viral hepatitis. *Biotest Bull* 4:283-293.

Gerlich WH, Feitelson MA, Marion PL, Robinson WS (1980): Structural relationships between the surface antigens of ground squirrel hepatitis virus and human hepatitis B virus. *J Virol* 36:787-795.

Gerlich WH, Heermann KH, Bruss V, Höhne M, Krone B, Schaefer S, Seifer M (1989): Structure, expression, and potential oncogenicity of hepatitis B virus proteins. In: *Liver cell carcinoma*, P Bannasch, D Keppler, G Weber, eds. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 139-163.

Gerlich WH, Heermann KH, Uy A, Zyzik E, Thomssen R (1987): Beurteilung der Infektiosität von Hepatitis B-Antigentägern mit Hilfe des Virus-DNA-Nachweises. *Öff Gesundheitswes* 49:359-384.

Gerlich WH, Repp R (1994): Abschätzung der Infektiosität von Hepatitis B-Virusträgern durch serologische und molekularbiologische Methoden. In: *Virushepatitis A bis E - Diagnose, Therapie, Prophylaxe*, G Maass, B Stück, eds. Deutsches Grünes Kreuz, Marburg, pp. 77-91.

Gerlich WH, Robinson WS (1980): Hepatitis B virus contains protein attached to the 5' terminus of its complete DNA strand. *Cell* 21:801.

Ghendon Y (1990): WHO strategy for the global elimination of new cases of hepatitis B. *Vaccine* 8 Suppl.:S129-S133.

Goudeau A, European Regional Study Group (1990): Epidemiology and eradication strategy for hepatitis B in Europe. *Vaccine* 8 Suppl.:S113-S116.

Grathwohl J, Ndumbe P, Ajuk-Takem J, Repp R, Uy A, Gerlich WH, Wolf H (1991): Mode of hepatitis B virus transmission in Cameroon. *Trop Med Parasitol* 42:448.

Guerrero E, Gavilanes F, Peterson DL (1988): Model for the protein arrangement in HbsAg particles based on physical and chemical studies. In: *Viral hepatitis and liver disease*, AJ Zuckerman, ed. Alan R. Liss, New York, pp. 606-613.

Gurakan F, Kocak N, Ozen H, Yuce A (2000): Comparison of standard and high dosage recombinant interferon alpha 2b for treatment of children with chronic hepatitis B infection. *Pediatr Infect Dis J* 52-56.

Gust I (1991): Public health control of HBV: Worldwide HBV vaccination programme. *Prog Clin Biol Res* 364:333-342.

Gust ID (1996): Epidemiology of hepatitis B infection in the Western Pacific and South East Asia. *Gut* 38 Suppl. 2:S18-S22.

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

Heijntink RA, Boender PJ, Scham SW, Masurel N (1984): Hepatitis B virus DNA in serum of pregnant women with HBsAg and HBeAg or antibodies to HBe. *J Infect Dis* 150:462.

Helling RB, Goodman HM, Boyer HW (1974): Analysis of R.EcoRI fragments of DNA from lamdoid bacteriophages and other viruses by agarose-gel electrophoresis. *J Virol* 14: 1235-1244

Hirsch RC, Lavine JE, Chang L, Varmus HE, Ganem D (1990): Polymerase gene products of hepatitis B viruses are required for genomic RNA packaging as well as for reverse transcription. *Nature* 344:552-555.

Ho NK (1998): Perinatal infections-problems in developing countries. *Singapore Med J* 39:266-270.

Hohn T, Hohn B, Pfeiffer P (1985): Reverse transcription in CaMV. *Trends Biochem Sci* 5:205-209.

Hoofnagle JH (1989): Toward universal vaccination against hepatitis B virus. *N Engl J Med* 321:1333-1334.

Hoofnagle JH, Gerety RJ, Smallwood LA, Barker LF (1977): Subtyping of hepatitis B surface antigen and antibody by radioimmunoassay. *Gastroenterology* 72:290-296.

Höhne M, Schaefer S, Seifer M, Feitelson MA, Paul D, Gerlich WH (1990): Malignant transformation of immortalized transgenic hepatocytes after transfection with hepatitis B virus DNA. *EMBO J* 9:1137-1145.

Hsu HY, Chang MH, Chen DS (1986): Baseline seroepidemiology of hepatitis B virus infection in children in Taipei. *J Med Virol* 18:301-307.

Hu K-Q, Siddiqui A (1991): Regulation of the hepatitis B virus gene expression by the enhancer element I. *Virology* 181:721-726.

Huan B, Siddiqui A (1993): Regulation of hepatitis B virus gene expression. *J Hepatol* 17 Suppl. 3:S20-S23.

Hyams KC, Al-Arabi MA, Al-Tagani AA, George JF (1989). Epidemiology of hepatitis B in the Gezira region of Sudan. *Am J Trop Med Hyg* 40:200-206.

Ishikawa T, Takagi H, Kinoshita M, Shimoda R, Nagamine T, Mori M (1998): Quantitative analysis of hepatitis B virus precore mutant in hepatitis type B. *Tohoku J Exp Med* 186:323-333.

Ishikawa T, Kakumu S, Yoshioka K, Yamada M, Tanaka K, Higashi Y, Takayanagi M, Okumura A, Kojima A, Tamura T (1993): Relative immunogenicity of hepatitis B virus-encoded antigens as targets for cytotoxic T-cell response. *Immunology* 80:313-318.

Jackson JB (1991): Polymerase chain reaction assay for detection of hepatitis B virus. *Am J Clin Pathol* 95:442-444.

Kaboth U (1982): Akute Virushepatitis. Ätiologie und Epidemiologie, Diagnostik und Verlauf. *Tägl Prax* 23:647-654.

Kaneko S, Kobayashi K, Miller RH (1990): Detection of hepatitis B virus DNA using the polymerase chain reaction technique. *J Clin Lab Anal* 4:479-482.

Kaneko S, Miller RH, Di Bisceglie AM, Feinstone SM, Hoofnagle JH, Purcell RH (1990): Detection of hepatitis B virus DNA in serum by polymerase chain reaction. Application for clinical diagnosis. *Gastroenterology* 99:799-804.

Kew MC, Reis P, Macnab GM, Seftel HC, Bersohn I (1973): The witch-doctor and tribal scarification of the skin and hepatitis B antigen. *S Afr Med J* 47:2419-2420

Kew MC (1992): Chronic hepatitis B virus infection and hepatocellular carcinoma in Africa. *S Afr J Sci* 88:524-528.

Kiire CF (1996): The epidemiology and prophylaxis of hepatitis B in sub-Saharan Africa: a view from tropical and subtropical Africa. *Gut* 38 Suppl 2:S5-12.

Koff RS (1993): Hepatitis B today: Clinical and diagnostic overview. *Pediatr Infect Dis J* 12:428-432.

Krause DS (1992): Prevalence of hepatitis B in pregnant women. *JAMA* 267:1919.

Krogsgaard K (1994): Does corticosteroid pretreatment enhance the effect of alfa interferon treatment in chronic hepatitis B. *J Hepatol* 20:159-162.

Lai CL, Chien RN, Leung NW, Chang TT, Guan R, Tai DI, Ng KY, Wu PC, Dent JC, Barber J, Stephenson SL, Gray DJ (1998): A one-year trial of lamivudine for chronic hepatitis B. Asia Hepatitis Lamivudine Study Group. *N Engl J Med.* 339 (2):61-68.

Lai FM-M, Lai KN, Tam JS, Lui SF, To KF, Li PKT (1994): Primary glomerulonephritis with detectable glomerular hepatitis B virus antigens. *Am J Surg Pathol* 18:175-186.

Lansang MAD (1996): Epidemiology and control of hepatitis B infection: A perspective from the Philippines, Asia. *Gut* 38 Suppl. 2:S43-S47.

Larzul D, Chevrier D, Thiers V, Guesdon J-L (1990): An automatic modified polymerase chain reaction procedure for hepatitis B virus DNA detection. *J Virol Methods* 27:49-60.

Lau JYN, Wright TL (1994): Emerging viral mutants in hepatitis B. Reply. *Lancet* 343:355-356.

Lee CY, Huang LM, Chang MH, Hsu CY, WU SJ, Sung JL, Safary A (1991): The protective efficacy of a recombinant hepatitis b vaccine in newborn infants of hepatitis B e antigen-positive hepatitis B surface antigen carrier mothers. *Pediatr Infect Dis J* 10:299-303

Liaw Y-F, Sheen I-S, Chen T-J, Chu C-M, Pao C-C (1991): Incidence, determinants and significance of delayed clearance of serum HBsAg in chronic hepatitis B virus infection: A prospective study. *Hepatology* 13:627-631.

Lin C-G, Lo SJ (1992): Evidence for involvement of a ribosomal leaky scanning mechanism in the translation of the hepatitis B virus *pol* gene from the viral pregenome RNA. *Virology* 188:342-352.

Lingao AL, Torres NT, Muñoz N, Lansang MA, West SK, Bosch FX, Domingo EO (1989): Mother to child transmission of hepatitis B virus in the Philippines. *Infection* 17:275-279.

Luo K-X, Zhou R, Liang Z-S, Jiang S (1992): Correlation between the prevalence of serum HBV DNA and immunoserologic HBV markers in the subjects with or without hepatitis. *Immunol Invest* 21:275-281.

Lürman A (1855): Ein Icterus epidemicus. *Berl Klein Wochenschr* 22:20-25

Madzime S, Adem M, Mahomed K, Woelk GB, Mudzamiri S, Williams MA (1999): Hepatitis B virus infection among pregnant women delivering at Harare Maternity Hospital, Harare Zimbabwe, 1996 to 1997. *Cent Afr J Med* 45:195-198.

Magnius LO, Norder H (1995): Subtypes, genotypes and molecular epidemiology of the hepatitis B virus as reflected by sequence variability of the S-gene. *Intervirology* 38:24-34.

Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J (1982): *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York,

Margolis HS, Shapiro CN (1993): Considerations for the development of recommendations for the use of hepatitis A vaccine. *J Hepatol* 18 Suppl. 2:S56-S60.

Marinier E, Barrois V, Larouze B, London WT, Blumberg BS (1985): Lack of perinatal transmission of hepatitis B virus infection in Senegal, West Africa. *J Pediatr* 106:843-849.

Marinos G, Smith HM, Naoumov NV, Williams R (1994): Quantitative assessment of serum IgM anti-HBc in the natural course and during interferon treatment of chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology* 19:303-311.

Marion PL, Oshiro L, Regnery DC, Scullard GH, Robinson WS (1980): A virus in Beechy and ground squirrels that is related to hepatitis B virus of man. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:2941-2945.

Mason WS, Seal G, Summers J (1980): Virus of Pekin ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus. *J Virol* 36:829-836.

Matsumoto T, Nakata K, Hamasaki K, Daikokoku M, Nakao K, Yamashita Y, Shirahama S, Kato Y (1997): Efficacy of immunization of high-risk infants against hepatitis B virus evaluated by polymerase chain reaction. *J Med Virol* 53:255-260.

Maynard JE (1990): Hepatitis B: Global importance and need for control. *Vaccine* 8 Suppl.:S18-S20.

Mazzur S, Burgert S, Blumberg BS (1974): Geographical distribution of Australia antigen determinants d, y and w. *Nature* 247:38-40.

McCarthy MC, Hyams KC, El-Tigani El-Hag A, El-Dabi MA, El-Sadig El-Tayeb M, Khalid IO, George JF, Constantine NT, Woody JN (1989): HIV-1 and hepatitis B transmission in Sudan. *AIDS* 3:725-729.

McGlynn E, Reutener S, Matter A, Wildner G, Will H, Lydon NB (1992): Hepatitis B virus polymerase gene: Expression of the long open reading frame using the baculovirus expression system. *J Gen Virol* 73:1515-1519.

McIntyre PG (1995): Hepatitis B vaccination follow-up. *Lancet* 345:1575.

McMahon BJ, Alward WLM, Hall DB (1984): Acute hepatitis B virus infection: relation of age to the clinical expression of the disease and subsequent development of carrier state. *J Infect Dis* 151:599-603.

Messing J (1983): New M13 vectors for cloning. *Methods Enzymol* 101:20-78.

Michielsens PP, Van Damme P (1999): Viral hepatitis and pregnancy. *Acta Gastroenterol Belg* 62:21-29.

Milich DR (1991): Immune response to hepatitis B virus proteins: Relevance of the murine model. *Semin Liver Dis* 11:93-112.

Milich DR, Jones JE, Hughes JL, Price J, Raney AK, McLachlan A (1990): Is a function of the secreted hepatitis B e antigen to induce immunologic tolerance *in utero*. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:6599-6603.

Miller RH, Kaneko S, Chung CT, Girones R, Purcell RH (1989): Compact organization of the hepatitis B virus genome. *Hepatology* 9:322-327.

Milne A, Rodgers E, Hopkirk N (1995): Hepatitis B vaccination of babies in Melanesia. *Lancet* 346:318.

Mitsuda T, Yokota S, Mori T, Ibe M, Ookawa N, Shimizu H, Aihara Y, Yoshida N, Kosuge K, Matsuyama S (1989): Demonstration of mother-to-infant transmission of hepatitis B virus by means of polymerase chain reaction. *Lancet* 2:886-888.

Mutimer D, Pillay D, Shields P, Cane P, Ratcliffe D, Martin B, Buchan S, Boxall L, O'Donnell K, Shaw J, Hubscher S, Elias E (2000): Outcome of lamivudine resistant hepatitis B virus infection in the liver transplant recipient. *Gut* 46:107-113.

Nagaya T, Nakamura T, Tokino T, Tsurimoto M, Mayumi T, Kamino K, Yamamura K, Matsubara K (1987): The mode of hepatitis B virus DNA integration in chromosomes of human hepatocellular carcinoma. *Genes Dev* 1:773-782.

Nakatake H, Chisaka O, Yamamoto S, Matsubara K, Koshy R (1993): Effect of X protein on transactivation of hepatitis B virus promoters and on viral replication. *Virology* 195:305-314.

Nassal M, Schaller H (1993): Hepatitis B virus replication. *Trends Microbiol* 6:221-228.

Ndumbe P, Njie TK (1989): Hepatitis A and B infections in Yaoundé, Cameroon. *Res Virol* 140:253-261.

Nedjar S, Mitchell F, Biswas R (1994): Simultaneous amplification and detection of specific hepatitis B virus and hepatitis C virus genomic sequences in serum samples. *J Med Virol* 42:212-216.

Neurath AR, Kent SBH, Strick N, Parker K (1986): Identification and chemical synthesis of a host cell receptor binding site on hepatitis B virus. *Cell* 46:429-438.

Niesert ST, Fritsch U, Schneider J (1994): Hepatitis B Screening in der Schwangerschaft und Immunprophylaxe der Neugeborenen. *Päd prax* 46:273-279.

Niu TM, Targonski PV, Stoll BJ, Margoils HS (1992): Prevention of perinatal transmission of the hepatitis B virus. *AJDC* 146:793-796.

Norder H, Couroucé A-M, Magnius LO (1994): Complete genomes, phylogenetic relatedness, and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes. *Virology* 198:489-503.

Norder H, Hammas B, Lee S-D, Bile K, Couroucé AM, Mushahwar IK, Magnius LO (1993): Genetic relatedness of hepatitis B viral strains of diverse geographical origin and natural variations in the primary structure of the surface antigen. *J Gen Virol* 74:1341-1348.

Norder H, Hammas B, Löfdahl S, Couroucé AM, Magnius LO (1992): Comparison of the amino acid sequences of nine different serotypes of hepatitis B surface antigen and genomic classification of the corresponding hepatitis B virus strains. *J Gen Virol* 73:1201-1208.

Norkrans G (1990): Epidemiology of hepatitis B virus (HBV) infections with particular regard to current routes of transmission and development of cirrhosis and malignancy. *Sex Transm Dis Suppl.* 69:43-47.

Okamoto H, Tsuda F, Akahane Y, Sugai Y, Yoshida M, Moriyama K, Tanaka T, Miyakawa Y, Mayumi M (1994): Hepatitis B virus with mutations in the core promoter for an e antigen-negative phenotype in carriers with antibody to e antigen. *J Virol* 68:8102-8110.

Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, Sastrosoewingno R, Imai M, Miyakawa Y, Mayumi M (1988): Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: Comparison of surface antigen subtypes. *J Gen Virol* 69:2575-2583.

Okuda K (1992): Hepatocellular carcinoma: Recent progress. *Hepatology* 15:948-963.

Ou J, Laub O, Rutter WJ (1986): Hepatitis B virus gene function: the precore region targets the core antigen to cellular membranes and causes the secretion of e antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:1578-1582.

Özsoylu S (1993): Prevention of perinatal transmission of hepatitis B virus infection. *Am J Dis Child* 147:610-611.

Pape GR (1994): Therapie der Virushepatitiden mit Interferon. *Dtsch Ärztebl* 91:2683-2695.

Patzer EJ, Nakamura GR, Simonsen CC, Levinson AD, Brands R (1986): Intracellular assembly and packaging of hepatitis B surface antigen particles occur in the endoplasmic reticulum. *J Virol* 58:884-892.

Pereira LMMB, Melo MCV, Lacerda C, Spinelli V, Domingues ALC, Massarolo P, Mies S, Saleh MG, McFarlane IG, Williams R (1994): Hepatitis B virus infection in schistosomiasis mansoni. *J Med Virol* 42:203-206.

Perillo RP (1993): Antiviral therapy of chronic hepatitis B: past, present and future. *J Hepatol* 17:56-63.

Pol S, Michel ML, Brechot C (2000): Immune therapy of hepatitis B virus chronic infection. *Hepatology* 31:548-549.

Porter-Jordan K, Rosenberg EI, Keiser JF, Gross JD, Ross AM, Nasim S, Garrett CT (1990): Nested polymerase chain reaction assay for the detection of cytomegalovirus overcomes false positives caused by contamination with fragmented DNA. *J Med Virol* 30:85-91.

Prince AM (1990): Control of hepatitis B virus infection in third-world countries. *Transf Med Rev* 4:187-190.

Prince AM, Maynard J (1991): Hepatitis B control in African countries. *Lancet* 337:247.

Pugh JC, Bassendine MF (1990): Molecular biology of hepadnavirus replication. *Br Med Bull* 46:329-353.

Regan FA, Hewitt P, Barbara JA, Contreras M (2000): Prospective investigation of transfusion transmitted infection in recipients of over 20 000 units of blood. TTI Study Group. *BMJ* 320:403-406.

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

Repp R, Rhiel S, Heermann KH, Schaefer S, Keller C, Ndumbe P, Lampert F, Gerlich WH (1993): Genotyping by multiplex polymerase chain reaction for detection of endemic hepatitis B virus transmission. *J Clin Microbiol* 31:1095-1102.

Robinson WS (1991): Hepadnaviridae and their replication. In: *Fundamental Virology*, 2nd Ed., BN Fields, DN Knipe, eds. Raven Press, New York, pp. 989-1021.

Robinson WS, Clayton DA, Greenman RL (1974): DNA of a human hepatitis B virus candidate. *J Virol* 14:384-391.

Robson S (1992): MRC-UCT Liver Centre: Issues for consideration in establishing a national hepatitis B (HB) immunisation programme. *S Afr Med J* 81:177-178.

Rogler CE (1991): Cellular and molecular mechanisms of hepato carcinogenesis associated with hepadnavirus infection. In: *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 168th Ed., WS Mason, C Seeger, eds. pp. 103-140.

Roingard P, Diouf A, Sankale JL, Essex M (1993): Perinatal transmission of hepatitis B virus in Senegal, West Africa. *Viral Immunol* 6:65-73.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf JS, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977): DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:5463-5467.

Schirmacher P, Rogler CE, Dienes HP (1993): Current pathogenetic and molecular concepts in viral liver carcinogenesis. *Virchows Arch B Cell Pathol* 63:71-89.

Schlicht H-J, Schaller H (1989): The secretory core protein of human hepatitis B virus is expressed on the cell surface. *J Virol* 63:5399-5404.

Schoub BD (1992): Hepatitis B vaccination in rural Africa. *Biomed Pharmacother* 46:130-131.

Schödel F (1994): Emerging viral mutants in hepatitis B. *Lancet* 343:355.

Scotto J, Hadchouel M, Hery C, Yvart J, Tiollais P, Brechot C (1983): Detection of hepatitis B virus DNA by a simple spot hybridisation technique. Comparison with results for viral markers. *Hepatology* 3:279-282.

Schoub BD (1991): Hepatitis B vaccination in rural Africa. *BMJ* 302:313-315.

Seeger C, Ganem D, Varmus HE (1986): Biochemical & genetic evidence for the hepatitis B virus replication strategy. *Science* 232:477.

Shapiro CN (1993): Epidemiology of hepatitis B. *Pediatr Infect Dis J* 12:433-437.

Shapiro CN, Margolis HS (1990): Hepatitis B epidemiology and prevention. *Epidemiol Rev* 12:221-227.

Shaul Y, Ziemer M, Garcia PD, Crawford R, Hsu H, Valenzuela P, Rutter WJ (1984): Cloning and analysis of integrated hepatitis virus sequences from a human hepatoma cell line. *J Virol* 51:776-787.

Sherlock S (1990): Hepatitis B: The disease. *Vaccine* 8 Suppl.:S 6-S9.

Shikata T, Karasawa T, Abe K, Uzawa T, Suzuki H, Oda T, Imai M, Mayumi M, Moritsugu Y (1977): Hepatitis B e antigen and infectivity of hepatitis B virus. *J Infect Dis* 136:571-576.

Soussan P, Garreau F, Zylberberg H, Ferray C, Brechot C, Kremsdorf D (2000): In vivo expression of a new hepatitis B virus protein encoded by a spliced RNA. *J Clin Invest* 105:55-60.

Sperotto A, Silvestri F, Fanin R, Damiani D, Geromin A, Cerno M, Stocchi R, Patriarca F, Baccarani M (2000): Feasibility of autologous stem cell transplantation in chronic carriers of hepatitis B and hepatitis C virus. *Leuk Lymphoma* 36:323-330.

Sprenkel R, Kaleta EF, Will H (1988): Isolation and characterization of a hepatitis B virus endemic in herons. *J Virol* 62:3832-3839.

Stevens CE (1979): HbeAg and anti-Hbe detection by radioimmunoassay: Correlation with vertical transmission of hepatitis B virus in Taiwan. *J Med Virol* 3:237-241.

Stibbe W, Gerlich WH (1982): Variable protein composition of hepatitis B surface antigen from different donors. *Virology* 123:436-424.

Stibbe W, Gerlich WH (1983): Structural relationships between minor and major proteins of hepatitis B surface antigen. *J Virol* 46:626-628.

Su H, Yee JK (1992): Regulation of hepatitis B virus gene expression by its two enhancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:2708-2712.

Summers J, Mason WS (1982): Replication of the genome of a hepatitis B-like virus by reverse transcription of an RNA intermediate. *Cell* 29:403-415.

Summers J, Smolec JM, Snyder R (1978): A virus similar to human hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks. *Proc Natl Acad Sci USA* 75:4533-4537.

Summers, J (1981): Three recently described animal virus models for human hepatitis B virus. *Hepatology* 1: 179-83.

Szmunes W, Much MI, Prince AM, Hoofnagle JH, Cherubin CE, Harley EJ, Block GH (1975): On the role of sexual behaviour in the spread of hepatitis B infection. *Ann Intern Med* 83:489-495.

Szmunes W, Stevens CE, Harley EJ (1980): Hepatitis B vaccine: demonstration of efficacy in a controlled clinical trial in a high-risk population in the United States. *N Engl J Med* 303:835-841.

Tabor E, Cairns J, Gerety RJ, Bayley AC (1993): Nine-year follow-up study of a plasma-derived hepatitis B vaccine in a rural African setting. *J Med Virol* 40:204-209.

Takahashi K, Brotman B, Usuda S, Mishiro S, Prince AM (2000): Full-genome sequence analyses of hepatitis B virus (HBV) strains recovered from chimpanzees infected in the wild: implications for an origin of HBV. *Virology* 267:58-64.

Theppisai U, Thanuntaseth C, Chiewsilp P, Siripoonya P (1990): Prevention of hepatitis B infection in infants born to hepatitis B carrier mothers: Low dosage vaccination. *Int J Gynecol Obstet* 32:353-357.

Thiers V, Nakajima E, Kremsdorf D, Mack D, Schellekens H, Driss F, Goudeau A, Wands J, Sninsky J, Tiollais P, Brechot C (1988): Transmission of hepatitis B from hepatitis-B-seronegative subjects. *Lancet* ii:1273-1276.

Tiollais P, Pourcel C, Dejean A (1985): The hepatitis B virus. *Nature* 317:489-495.

Tokino T, Tamura H, Hori N, Matsubara K (1991): Chromosome deletions associated with hepatitis B virus integration. *Virology* 185:879-882.

Utili R, Sagnelli E, Gaeta GB, Galanti B, Nardiello S, Felaco FM, Pasquale G, Marrone A, Aprea L, Pizzella T, Digilio L, Cesaro G, Sardaro C, Santarpia L, Adinolfi LE, Andreana A, Russo M, Filippini P, Zampino R, Piccinino F, Ruggiero G, Giusti G (1994): Treatment of chronic hepatitis B in children with prednisone followed by alfa-interferon: A controlled randomized study. *J Hepatol* 20:163-167.

Valenzuela P, Medina A, Rutter WJ (1982): Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast. *Nature* 298:347-350

Vall Mayans M, Hall AJ, Inskip HM, Chotard J, Lindsay SW, Coromina E, Mendy M, Alonso PL, Whittle H (1990): Risk factors for transmission of hepatitis B virus to Gambian children. *Lancet* 336:1107-1109.

Wang G-H, Seeger C (1992): The reverse transcriptase of hepatitis B virus acts as a protein primer for viral DNA synthesis. *Cell* 71:663-670.

Wang JT, Wang TH, Sheu J-C, Shih L-N, Lin J-T, Chen D-S (1991): Detection of hepatitis B virus DNA by polymerase chain reaction in plasma of volunteer blood donors negative for hepatitis B surface antigen. *J Infect Dis* 163:397-399.

Wheelely SM, Jackson PT, Boxall EH, Tarlow MJ, Bissenden J (1991): Prevention of perinatal transmission of hepatitis B virus: A comparison of two prophylactic schedules. *J Med Virol* 35:212-215.

Wicki J, Olivieri J, Pizzolato G, Sarasin F, Guillevin L, Dayer JM, Chizzolini C (1999): Successful treatment of polyarteritis nodosa related to hepatitis B virus with a combination of lamivudine and interferon alpha. *Rheumatology Oxford* 38:183-185.

Wollersheim M, Debelka U, Hofschneider P.H.(1987): A transactivating function encoded in the hepatitis B virus X gene is conserved in the integrated state. *Oncogene* 3: 545-554.

Yee J-K (1989): A liver-specific enhancer in the core promoter region of human hepatitis B virus. *Science* 246:658-661.

Yuh C-H, Ting L-P (1993): Differentiated liver cell specificity of the second enhancer of hepatitis B virus. *J Virol* 67:142-149.

Zhou D-X, Yen TSB (1990): Differential regulation of the hepatitis B virus surface gene promoters by a second viral enhancer. *J Biol Chem* 265:20731-20734.

Zyzik E, Gerlich WH, Uy A, Köchel HG, Thomssen R (1986): Assay of hepatitis B virus genome titers in sera of infected persons. *Eur J Clin Microbiol* 5:330-335.

8 Material

Chemische Reagenzien

Aceton	Merck, Darmstadt
Acrylamid	Bio-Rad, München
Agarose	Bio-Rad, München
Ammoniumpersulfat	LKB, Bromma, Schweden
Aqua destillata	Braun, Melsungen
Bisacrylamid	LKB, Bromma, Schweden
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Dimethylchlorsilan	Pharmacia LKB, Freiburg
Dithiothreitol	Boehringer, Mannheim
EDTA	Sigma, Deisenhofen
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Riedel-de-Haen, Seelze
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Formamid	Merck, Darmstadt
Gamma-Metacryloxypropyltrimethoxysilan	Sigma, Deisenhofen
Glyzerin	Merck, Darmstadt
Harnstoff	Bethesda Research Lab., Gaithersburgh, USA
IPTG	Boehringer Mannheim
Isopropanol	Riedel-de-Haen, Seelze
Kaliumacetat	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Methanol	Riedel-de-Haen, Seelze
MOPS	Sigma, Deisenhofen
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
SDS - Dodecylsulfat-Na-Salz	Serva, Heidelberg
TEMED	BRL, Gaithersburgk, USA
Tris	Merck, Darmstadt
Xylencyanol FF	Merck, Darmstadt

Molekularbiologische Reagenzien

Bacto Yeast Extract	Difco, Detroit
Bacto-Tryptone	Difco, Detroit
Proteinase K	Boehringer Mannheim
Restriktionsendonukleasen	Boehringer Mannheim
Taq DNA Polymerase	Boehringer Mannheim
T4 DNA Ligase	Boehringer Mannheim

Reagenzien-Kits

Sequenase Version 2.0 Sequencing Kit	USB, Bad Homburg
--------------------------------------	------------------

Isogene Kit

WAK-Chemie Medical GmbH, Bad
Homburg

Quiagen Kit
GeneAmp Kit

Diagen, Düsseldorf
Perkin Elmer, Überlingen

Geräte

Tischzentrifuge Centrifuge 5415

Eppendorf, Hamburg

Heraeus Sepatech Biofuge A

Heraeus, Hanau

Hettich Rotanta IP

Hettich, Tuttlingen

Beckmann Ultrazentrifuge SW 60Ti Rotor

Beckmann, München

Heizblock Thermo-Dux

Thermo-Dux, Wertheim

Bakterienschüttler Certomat U+H

Braun Biotech Intern.

Plastikröhrchen

Greiner, Solingen

Kunststoff-Einmalpipetten

Tecnomara, Fernwald

Pipetten

Abimed, Langenfeld

Pipettenspitzen

Abimed, Langenfeld

Film XAR5 (Kodak)

Tecnomara, Fernwald

Medien und Nährböden

L-Broth

Bacto Tryptone 10 g

Hefeextrakt 5 g

NaCl 5 g

Ad 1000 ml H₂O dest. Steril

Die Lösung wurde autoklaviert und bei 4°C aufbewahrt. Für Agarplatten wurde zu 1 l Flüssigmedium 10 g Agar zugegeben, die Lösung nach dem Autoklavieren auf 55°C abgekühlt und dann Platten gegossen. Für Ampicillin-haltige Agarplatten wurden pro 100 ml 100µl Ampicillin (50 mg/ml) zugesetzt. Die Platten wurden nach der Polymerisation bei RT gelagert.

2YT-Medium

Bacto Tryptone 16,0 g

Hefeextrakt 10,0 g

NaCl 5,0 g

Ad 1000 ml H₂O dest. Steril

Für die Herstellung von Agarplatten wurden der Lösung 15 g Agar zugegeben.

X-Gal-haltige Agarplatten

X-Gal: 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactosid wurde in Dimethylformamid in einer Konzentration von 24 mg/ml gelöst und bei -20°C aufbewahrt.

IPTG wurde in H₂O dest. in einer Konzentration von 20 mg/ml gelöst und steril filtriert.

Für 150 ml Plattenmedium: + 150 ml Ampicillin (100 µg/ml)

+ 300 µl X-Gal (24 mg/ml)

+ 200 µl IPTG (20 mg/ml)

Antibiotika

Ampicillin
Chloramphenicol

Sigma, Deisenhofen
Aldrich-Chemie, Steinheim

Puffer

50fach TAE-Puffer	242,0 g Tris 57,1 ml Eisessig 100,0 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0 ad 1000 ml H ₂ O dest.
10fach TBE-Puffer pH 8,3	108,0 g Tris-HCl 9,3 g Na ₂ -EDTA-2H ₂ O 55,0 g Borsäure ad 1000 ml H ₂ O dest.
10fach TBE-Puffer pH 8,9	162,0 g Tris-HCl 9,5 g Na ₂ -EDTA-2H ₂ O 27,5,0 g Borsäure ad 1000 ml H ₂ O dest.
TE-Puffer pH 7,6	1,21 g Tris 2,0 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 pH-Einstellung mit HCl ad 1000 ml H ₂ O dest.
20% SDS	200 g SDS in 900 ml H ₂ O dest. Lösen pH-Wert-Einstellung mit HCl auf 7,2 ad 1000 ml H ₂ O dest.
0,5 M EDTA	186,1 g EDTA in 800 ml H ₂ O lösen pH-Wert-Einstellung mit NaOH auf 8,0 ad 1000 ml H ₂ O dest.
PBS	8,0 g NaCl 0,2 g KCl 1,44 g Na ₂ HPO ₄ in 800 ml H ₂ O dest lösen ph-Wert-Einstellung mit NaOH auf 7,4 ad 1000 ml H ₂ O dest.

10x Ligase Puffer 500 mM Tris-Cl (pH 7,6)
 100 mM MgCl₂
 500 µg BSA
 100 mM Dithiothreitol
Der Ligasepuffer muß 10 mM ATP enthalten

5x Probenpuffer für Agarosegele

0,0625 g Bromphenolblau	Endkonzentration 0,25%
28,70 ml Glycerol 87%	Endkonzentration 10,0%
0,25 g SDS	Endkonzentration 1,0%
5,0 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)	Endkonzentration 0,1%
16,3 ml H ₂ O dest. Steril	
Gesamtvolumen 50 ml	

DNA-Längenstandards für Agarosegele (Boehringer Mannheim)

Marker I

Lambda-DNA *Eco R 1

Fragmentgröße: 21226 bp
 7421 bp
 5804 bp
 5643 bp
 4878 bp
 3530 bp

Marker III

Lambda-DNA *Hin D III *EcoRI

Fragmentgröße: 21226 bp
 5148 bp
 4973 bp
 4268 bp
 3530 bp
 2027 bp
 1904 bp
 1584 bp
 1375 bp
 947 bp
 831 bp
 564 bp

Marker VI

PBR 328 DNA *Bg 1 + pBR

328 DNA * Hinf I

Fragmentgröße: 2176 bp
 1760 bp
 1230 bp
 1033 bp
 653 bp
 517 bp
 453 bp
 394 bp
 298 bp
 234 bp
 220 bp
 154 bp

Plasmide

pUC 19 (Boehringer Mannheim)

Für Klonierungen wurde das Plasmid pUC 19 verwendet. Es handelt sich um ein doppelsträngiges zirkuläres, 2686 Basenpaare umfassendes DNA-Molekül, das mit Chloramphenicol amplifiziert werden kann und eine Resistenz gegen Ampicillin überträgt. Bei Anwesenheit von X-Gal in den Kulturplatten zeigt es eine blaue Farbreaktion aufgrund der lac Z alpha-Komplementierung. Innerhalb der lac Z-Kodierungsregion liegt der 54 Basenpaare lange Oligonukleotidpolylinker von M13mp19. Die Polylinkersequenz enthält Restriktionsschnittstellen für 13 verschiedene Restriktionsenzyme.

Bakterienstämme

Folgende E.coli-Stämme wurden verwendet:

HB 101 (BOYER und ROULLAND-DUSSOIX, 1969)

JM 101 (MANIATIS et al., 1983)

JM 83 (VIEIRA und MESSING, 1982)

Restriktionsenzyme (Boehringer, Mannheim)

Folgende Restriktionsenzyme wurden verwendet und nach den Empfehlungen der Herstellerfirma eingesetzt:

BamH I, Bcl I, EcoR I und Hind III.

9 Liste der verwendeten Abkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
BamHI	Restriktionsendonuklease aus <i>Bacillus amylofaciens</i>
bp	Basenpaare
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CTP	Cytidin-5'-Triphosphat
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-Triphosphat
dCTP	2'-Desoxycytosin-5'-Triphosphat
ddNTP	2',3'-Didesoxynukleosid-5'-Triphosphat
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-Triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EcoRI	Restriktionsendonuklease aus <i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
G	Guanin
g	Gramm
GTP	Guanosin-5'-Triphosphat
h	Stunde
HBV	Hepatitis-B-Virus
HinDIII	Restriktionsendonuklease aus <i>Haemophilus influenzae</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-galactopyranosid
M	Mol
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Millimol
mm	Millimeter
μ	Mikro
ORF	Open reading frame
pUC 19	Plasmidbezeichnung
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq-DNA Polymerase	DNA-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Trisaminomethan
U	'U' (Einheit der Enzymaktivität)
UV	Ultraviolett
V	Volt

Lebenslauf

Johanna Grenzebach, geb. Grathwohl

Geburtsdatum: 15. Mai 1966
Geburtsort: Schwenningen/Baden
Familienstand: verheiratet, zwei Kinder
Staatsangehörigkeit: deutsch
Eltern: Heinrich Grathwohl, Amtmann
Margarthe Grathwohl, geb. Schwanz, Hausfrau

Schulbildung:

1972-1976 Grundschohle in Schwenningen
1976-1985 Gymnasium in Sigmaringen
Juni 1985 Erhalt der Allgemeinen Hochschulreife

Universitäre Ausbildung:

10/85-03/86 Französisch-Studium, Universität Sorbonne, Paris, Frankreich
04/86-10/92 Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität Gießen
27.10.1992 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
01/93-06/94 Ärztin im Praktikum an der Universitäts-Kinderklinik Gießen
13.07.1994 Approbation als Ärztin
07/94-02/00 Assistenzärztin an der Universitäts-Kinderklinik Gießen
seit 01.03.2000 Studienkoordinatorin der NHL-BFM-Studie, Abt. Hämatologie/Onkologie der Universitäts-Kinderklinik Gießen (Multizentrische Therapiestudie zur Behandlung von Non-Hodgkin-Lymphomen und akuter B-Zell-Leukämie bei Kindern und Jugendlichen)

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung für Hämatologie und Onkologie (Leiter: Prof. Dr. F. Lampert) des Medizinischen Zentrums für Kinderheilkunde unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. R. Repp durchgeführt.

Damit gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. R. Repp für die Überlassung des Themas und seine stete Diskussionsbereitschaft und die zahlreichen Anregungen, die das Gelingen dieser Arbeit ermöglichten. Herrn Prof. Dr. F. Lampert danke ich sehr herzlich für die immerwährende Unterstützung und das Interesse am Fortgang der Arbeit.

Desweiteren möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. P. Ndumbe, Yaoundé, Kamerun, für seine Hilfsbereitschaft und gute Betreuung während meines Gastaufenthalts in seiner Arbeitsgruppe ausdrücklich bedanken. Herrn Prof. H. Wolf gilt mein ausdrücklicher Dank dafür, daß er den Aufenthalt in Kamerun ermöglichte.

Allen, die diese Arbeit durch die gute fachliche Zusammenarbeit und hilfreiche Unterstützung im Labor gefördert haben, danke ich sehr herzlich. Mein besonderer Dank gilt Frau Claudia Keller.

Schließlich möchte ich mich sehr herzlich bedanken bei meinen Eltern, die mir diese Ausbildung ermöglichten und bei meiner Familie, die mir ein steter Rückhalt ist.

Diese Arbeit wurde unterstützt durch das "Grüne Kreuz", Marburg, die Behringwerke AG, Marburg und die "Forschungshilfe Station Peiper" (Prof. Lampert, Gießen).