Reevaluation Hepatitis B Core Antikörper negativer Serumproben von Patienten mit chronischer Hepatitis B

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Kantelhardt, Vera Christin
aus Gießen

Gießen 2010

Aus dem Institut für Medizinische Virologie
der Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH
Standort Gießen
Leiter des Instituts: Prof. Dr. W. H. Gerlich / Prof. Dr. J. Ziebuhr

Gutachter: Prof. Dr. M. Kann

Gutachter: Prof. Dr. E. Domann

Tag der Disputation: 22.12.2010

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 6

1.1 Hepatitis-B-Virus 8

1.1.1 Klassifikation 8
1.1.2 Struktur 9
1.1.2.1 Äußere Hülle 9
1.1.2.2 Nucleocapsid / Core-Partikel 10
1.1.2.3 HBV-Genom und virale Polymerase 13
1.1.3 Nichtstrukturproteine 15
1.1.3.1 HBs oder HBsAg 16
1.1.3.2 HBe oder HBeAg 16
1.1.3.3 HBx 17
1.1.4 Replikationszyklus 18
1.1.4.1 Adsorption und Penetration 18
1.1.4.2 Kernimport und Transkription der viralen DNA 20
1.1.4.3 Assemblierung und Genomreifung 20
1.1.4.4 Verpackung und Sekretion 22

1.2 Hepatitis B 23

1.2.1 Akute Infektion 24
1.2.2 Chronische Infektion 25
1.2.3 Ungewöhnliche serologische Profile 27
1.2.4 Okkulte Infektion 27

1.3 HBc als Antigen 27

1.3.1 Anti-HBc 28

1.4 Anti-HBc-Test 30

1.5 Zielsetzung dieser Arbeit und experimentelle Ansätze 31

2. Material und Methoden 33

2.1 Material 33

2.1.1 Chemikalien 33
2.1.2 Lösungen und Puffer 34
2.1.3 Enzyme 36
2.1.4 Molekulargewichtsmarker 36
2.1.5 Antikörper und Dynabeads 36
2.1.6 Seren 37
2.1.7 rHBc 38
2.1.8 Zelllinien 38
2.1.9 Verbrauchsmaterialien 38
2.1.10 Geräte 39

2.2 Methoden 40

2.2.1 Native Agarose-Gel-Elektrophorese (NAGE) 40
2.2.1.1 Ethidiumbromidfärbung 41
2.2.1.2 Kapillarblot nach Southern 41
2.2.2 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (PAGE) 41
2.2.2.1 Proteinnachweis mit SyproRed 42
2.2.2.2 Elektroblot 42
2.2.2.3 Trocknen von SDS-PAGE-Gelen 42
2.2.3 Immunologischer HBcAg-Nachweis (Western Blot) 43
2.2.3.1 Mit Kaninchen-anti-HBc 43
2.2.3.2 Mit dem mAb3105 43
2.2.4 Radioaktive Markierung von in *E. coli*-exprimierten Capsiden 44
2.2.4.1 Bestimmung der Einbaurate und der spezifischen Aktivität 44
2.2.4.2 Nachweis radioaktiver Banden im Gel und Auswertung 45
2.2.5 Anti-HBc-Test durch Immunpräzipitation (IP) von radioaktiv markiertem Capsid 45
2.2.5.1 Kompetition mit nicht-markiertem Capsid 46
2.2.6 Mikropartikel-Enzym-Immunoassay (MEIA) 46
2.2.7 Herstellung von eHBc und iHBc 47
2.2.7.1 Eukaryonte Zellkultur (Hep.G2.2.15) 47
2.2.7.2 Isolierung von HBV-Core-Partikeln aus HepG2.2.15 Zellen 47
2.2.7.3 Isolierung von HBV-Core-Partikeln aus Zellkulturüberstand 48

3. Ergebnisse 49

3.1 Radioaktive Markierung von Capsiden für die Immunpräzipitation 49

3.1.1 Einbaurate und spezifische Aktivität 49
3.1.2 Darstellung der radioaktiven Capside 50

3.2 Nachweis von anti-HBc-Antikörpern mit einem radioaktiven Assay 51

3.2.1 Angabe des Testergebnisses 51
3.2.2 Optitimierung der Testbedingungen 52
3.2.2.1 Menge der eingesetzten biomagnetischen beads 52
3.2.2.2 Eingesetztes Serumvolumen 53
3.2.2.3 Zeitdauer der Inkubation 53
3.2.3 Reproduzierbarkeit 54
3.2.3.1 Reproduzierbarkeit der Immunpräzipitation 54
3.2.3.2 Reproduzierbarkeit der ^{32}P-Quantifikation mit ImageQuant und Excel 55
3.2.4 Spezifität 56
3.2.4.1 Präzipitationen mit strukturell modifizierten Capsiden 56
3.2.4.2 Kompetition durch unmarkierte Capside 57
3.2.4.3 Test von anti-HBc negativen Seren 58
3.2.5 Sensitivität 60

3.3 Anti-HBc negative, HBsAg positive Seren 66

3.3.1 Seren vom CHU in Bordeaux, Frankreich (F1 - F10) 66
3.3.2 Seren vom Universitätsklinikum Gießen (D1 - D5) 68
3.3.3 Seren vom Nationalen Konsilarlabor für HBV in Gießen (K1 - K11) 70

4. Diskussion 74

4.1 Anti-HBc-Test durch IP von radioaktiv markiertem Capsid 74

4.2 Anti-HBc negative, HBsAg positive Patienten 76

4.2.1 Mögliche Ätiologie des ungewöhnlichen serologischen Profils 76
4.2.1.1 Mutation des HBcAg 79
4.2.2 Test mit einem sensitiveren anti-HBc-Test 81

5. Anhang 83

5.1 Daten zum Sensitivitätsvergleich (IP/MEIA) 83

5.1.1 Ergebnisse aus zusätzlichen Tests zu den Seren P1 - P9 83
5.1.2 Messwerte der Verdünnungsreihen (IP und MEIA) 84

5.2 Daten zu den HBsAg positiven, anti-HBc negativen Seren 84

5.2.1 Ergebnisse aus zusätzlichen Tests 85
5.2.1.1 Seren vom CHU in Bordeaux, Frankreich (F1 - F10) 85
5.2.1.2 Seren vom Universitätsklinikum in Gießen (D1 - D5) 86
5.2.1.3 Seren vom Konsiliarlabor für Hepatitis B in Gießen (K1 - K11) 87
5.2.2 Anti-HBc (IP und MEIA im Vergleich) 87
5.2.2.1 Seren vom CHU in Bordeaux (F1 - F10) 88
5.2.2.2 Seren vom Universitätsklinikum in Gießen (D1 - D5) 89
5.2.2.3 Seren vom Konsiliarlabor für Hepatitis B in Gießen (K1 - K11) 90

Literaturverzeichnis 91

Abkürzungen und Einheiten 107

Zusammenfassung 110

Summary 111

Danksagung 112

1. Einleitung

Man kann prä-, intra- und posthepatische Ursachen eines Ikterus (Gelbsucht durch Hyperbilirubinämie) unterscheiden. Zu den intrahepatischen Ursachen zählt neben angeborenen Störungen der Bilirubinglukuronidierung und des Bilirubintransports die große Gruppe der Hepatitiden. Auslöser einer Hepatitis (griechisch: hepar = Leber, -itis = Entzündung) können Autoimmunprozesse, Alkohol, Medikamente, sonstige Toxine, Bakterien, Parasiten und Viren sein.

Bei den viralen Auslösern einer Hepatitis kann man wiederum zwischen Erregern, die nur im Rahmen einer systemischen Infektion eine Begleithepatitis hervorrufen, und den primär hepatotropen Viren unterscheiden. Beispiele für Erreger einer Begleithepatitis sind die Herpesviren Epstein-Barr und Cytomegalie oder das Gelbfiebervirus.

Das epidemische Auftreten des Ikterus war schon den Babyloniern bekannt. Die ätiologische Aufklärung folgte erst Jahrtausende später. 1885 beschrieb Lürmann eine Ikterusepidemie nach einer Impfung gegen Pocken, wobei der Impfstoff menschliche Lymphflüssigkeit enthalten hatte (Lürmann 1885). Zunächst unterschied man eine Typ A-Hepatitis, die fäkal-oral übertragen wurde, und eine Typ B-Hepatitis (sog. „Serumhepatitis“), die parenteral übertragen wurde. In den siebziger Jahren gab es Hinweise auf weitere Erreger (Nicht-A- / Nicht-B-Hepatitis). Inzwischen sind Hepatitis-A-/B-/C-/D- und E-Viren (HAV-HEV) als Hepatitiserreger bekannt. Für das Hepatitis-G-Virus (HGV) ist keine Erkrankung belegt. HAV-HEV gehören nicht nur unterschiedlichen Virusfamilien an, sondern sie unterscheiden sich auch im Infektionsmodus, in der Inkubationszeit, im klinischen Verlauf und in der Epidemiologie.

HAV und HEV werden fäkal-oral übertragen. Die Infektionen verlaufen je nach Alter und Risikofaktoren entweder asymptomatisch oder es manifestiert sich eine akute Hepatitis; chronische Infektionen kommen hingegen nicht vor. HAV und HEV kommen in Ländern mit mangelhaften hygienischen Verhältnissen endemisch vor, in Industrieländern eher sporadisch als Ausbrüche in Gemeinschaftseinrichtungen oder bei Urlaubsrückkehrern aus Endemiegebieten. HAV ist die häufigste Ursache einer Hepatitis weltweit.

HBV wird parenteral durch Blut oder Blutprodukte, kontaminierte Instrumente und Nadeln, sexuell oder perinatal übertragen. Bei immunkompetenten Erwachsenen

verläuft die Infektion meistens asymptomatisch oder als akute Hepatitis, wobei die Verlaufsform stark von der inkorporierten Virusmenge abhängt. Nur in ca. 5 % kommt es zu einer chronischen Infektion und der Mensch bleibt Virusträger. Bei der perinatalen Infektion Neugeborener kommt es hingegen in über 90 % zur Viruspersistenz. Ca. ein Drittel der Menschheit hatte Viruskontakt und ca. 5 % sind chronische Virusträger (WHO 2002). In Deutschland findet sich hingegen eine anti-HBc-Seroprävalenz (serologischer Marker für einen HBV-Viruskontakt) von 7,0 %; 0,6 % der Bevölkerung sind chronisch infiziert (RKI 2010). Dabei handelt es sich vor allem um Personen aus Risikogruppen (Alter 2003) - wie i.v.-Drogenabhängige, promiskuitive Hetero- und Homosexuelle, Empfänger von Blutprodukten und Dialysepatienten.

HDV ist ein inkomplettes Virus, viroidähnlich, das die Hüllproteine des HBV für die Virusmorphogenese benötigt (Lai 1995). Die Superinfektion eines chronisch HBV-Infizierten führt oft zu einem akuten Schub und einem ernsteren Verlauf der chronischen Hepatitis. Bei der Simultaninfektion kommt es meist zu einer Ausheilung. Weltweit sind ca. 5 % der Hepatitis-B-Virusträger HDV koinfiziert. HDV ist in Deutschland sehr selten, im Jahr 2009 wurden z.B. nur 7 Fälle gemeldet (RKI 2010).

Auch HCV wird, wie HBV und HDV, parenteral, sexuell oder perinatal übertragen. Die sexuelle und auch die perinatale Übertragung sind allerdings seltener und erfolgen vor allem bei hoher Viruslast. Der Infektionsweg bleibt oft unbekannt. Die HCV-Infektion verläuft in 85 % asymptomatisch, aber chronisch, in 15 % kommt es zu einer akuten Hepatitis, aber auch hierbei in 50 % zu einer Viruspersistenz. Weltweit sind ca. 3 % der Menschheit Virusträger (WHO 2002). In Deutschland sind 0,4 % anti-HCV positiv und davon auch 84 % HCV-PCR positiv (RKI 2010).

Diagnostisch unspezifisch für die Ätiologie einer Hepatitis ist der Anstieg der Transaminasen bei Leberzellschädigung, die allerdings für eine Infektion nicht obligat ist. Für die Diagnostik der unterschiedlichen viralen Hepatitiden eignet sich stattdessen neben dem direkten Nachweis des viralen Genoms oder viraler Antigene im Blut der Nachweis der vom Körper gebildeten Antikörper. Der in seltenen Fällen fehlende Nachweis eines bestimmten Antikörpers (anti-HBc) bei einer chronischen HBV-Infektion ist Thema dieser Arbeit.

1.1 Hepatitis-B-Virus

Die Entdeckung des Hepatitis-B-Virus begann eher zufällig, als Blumberg 1965 auf der Suche nach besonderen genetischen Merkmalen bei der Blutuntersuchung von Aboriginis auf ein neues Antigen stieß (Blumberg et al. 1965). Dieses Antigen wurde zunächst „Australia-Antigen“ getauft (Blumberg et al. 1967) und ist heutzutage als Hepatitis-B-surface-Antigen (HBsAg) bekannt. Es befindet sich sowohl in der Membran der subviralen Partikel, die bei einer HBV-Infektion in großem Überschuss gebildet werden, als auch in der Hülle des Virus. Das Virus selbst wurde von Dane 1970 in der Elektronenmikroskopie identifiziert (Dane et al. 1970).

1.1.1 Klassifikation

Das Hepatitis-B-Virus ist ein umhülltes DNA-Virus und gehört zur Familie der Hepadnaviridae (griechisch: hepar = Leber, dna = Desoxyribonukleinsäure).

Innerhalb der Capside dieser Familie befindet sich eine DNA-Polymerase (Kaplan et al. 1973), die eine DNA vom zunächst verpackten RNA-Prägenom revers transkribiert (Summers and Mason 1982) und anschließend den DNA-Zweitstrang (inkomplet). D.h. es handelt sich um eine RNA- und DNA-abhängige DNA-Polymerase, welche die Hepadnaviridae nur mit den Caulimo- und Badnaviridae und den Retroviridae gemeinsam haben (Toh et al. 1983). Während die Erstgenannten ein DNA-Genom besitzen und Pararetrovirus genannt werden, besitzen die Retroviridae ein RNA-Genom und sind sogenannte Orthoretroviren.

Hepadnaviridae haben eine hohe Zelltyp- und Wirtsspezifität. Es gibt den Genus Orthohepadnavirus mit Viren, die die Leber definierter Säugetiere, wie z.B. den Menschen, infizieren, und den Genus Avihepadnavirus mit Viren, die eine Hepatitis bei Vögeln hervorrufen.

Genus	Virus	Wirt
Orthohepadnavirus	Hepatitis B Virus (HBV)	Mensch
	Woodchuck Hepatitis Virus (WHV)	Waldmurmeltier
	Ground Squirrel Hepatitis Virus (GSHV)	Erdhörnchen
	Artic Ground Squirrel Hepatitis Virus (ASHV)	Arktisches Erdhörnchen
	Chimpanzee Hepatitis B Virus (ChHBV)	Schimpanze
	Gibbon Hepatitis B Virus (GiHBV)	Gibbon
	Orangutan Hepatitis B Virus (OuHBV)	Orang-Utan
	Woolly Monkey Hepatitis Virus (WMHBV)	Wollaffe
	Gorilla Hepatitis B Virus (GoHBV)	Gorilla

Avihepadnavirus	Duck Hepatitis B Virus (DHBV)	Pekingente
	Heron Hepatitis B Virus (HHBV)	Graureiher
	Ross Goose Hepatitis Virus (RGHBV)	Ross Gans
	Grey Teal Hepatitis B Virus (GTHBV)	Weißkehlente
	Maned Duck Hepatitis B Virus (MDHBV)	Mähnenente
	Stork Hepatitis B Virus (STHBV)	Weißstorch
	Snow Goose Hepatitis Virus (SGHBV)	Schneegans

Tabelle 1: Übersicht bisher bekannter Hepadnaviren und ihrer Wirte

HBV lässt sich in 8 Genotypen (A-H) und weiter in 24 Subtypen mit unterschiedlicher geographischer Verteilung unterteilen (Schaefer 2007). So findet sich z.B. A1 in Afrika, Brasilien und Indien, A2 vor allem in Europa und den USA. Die Genotypen unterscheiden sich in ca. 8 - 15 % der Sequenz (Norder et al. 2004).

1.1.2 Struktur

Das Hepatitis-B-Virus ist ein doppelt umhülltes, ca. 42-45 nm großes DNA-Virus. Im Folgenden werden die äußere und die innere Hülle und das sich mit der viralen Polymerase im Inneren der beiden Hüllen befindende Genom beschrieben.

1.1.2.1 Äußere Hülle

Die äußere Hülle besteht aus Hepatitis-B-Oberflächen(Surface)-Proteinen (HBs bzw. HBsAg) und zellulärer Lipidmembran. Es gibt drei unterschiedliche Surface-Proteine, das S(mall), M(iddle) und das L(arge)HBs. Da die HBs-Proteine an einer oder zwei Positionen glykosiliert sein können, unterscheidet man insgesamt sechs Proteine. Die Proteine sind carboxyterminal (C-terminal) identisch und variieren hinsichtlich des aminoterminalen (N-terminalen) Endes durch zusätzliche Domänen. SHBs besteht nur aus der sog. S-Domäne, MHBs besitzt zusätzlich die PräS2-Domäne und LHBs die PräS1- und die PräS2-Domäne. Diese HBs-Proteine werden im Vergleich zur HBc- und Genomproduktion in 100-1000fachem Überschuss synthetisiert. Die Proteine assemblieren zu 20 nm Sphären und subviralen Filamenten unterschiedlicher Länge, die aus den infizierten Zellen sekretiert werden. HBsAg gehört also auch zu den Nichtstrukturproteinen des HBV und lässt sich im Serum infizierter Patienten nachweisen.

Die Prä-S-Domäne des LHBs hat eine duale Topologie und kann sich außer- oder innerhalb der Virushülle befinden (Bruss et al. 1994; Lambert and Prange 2003; Seitz et al. 2007).

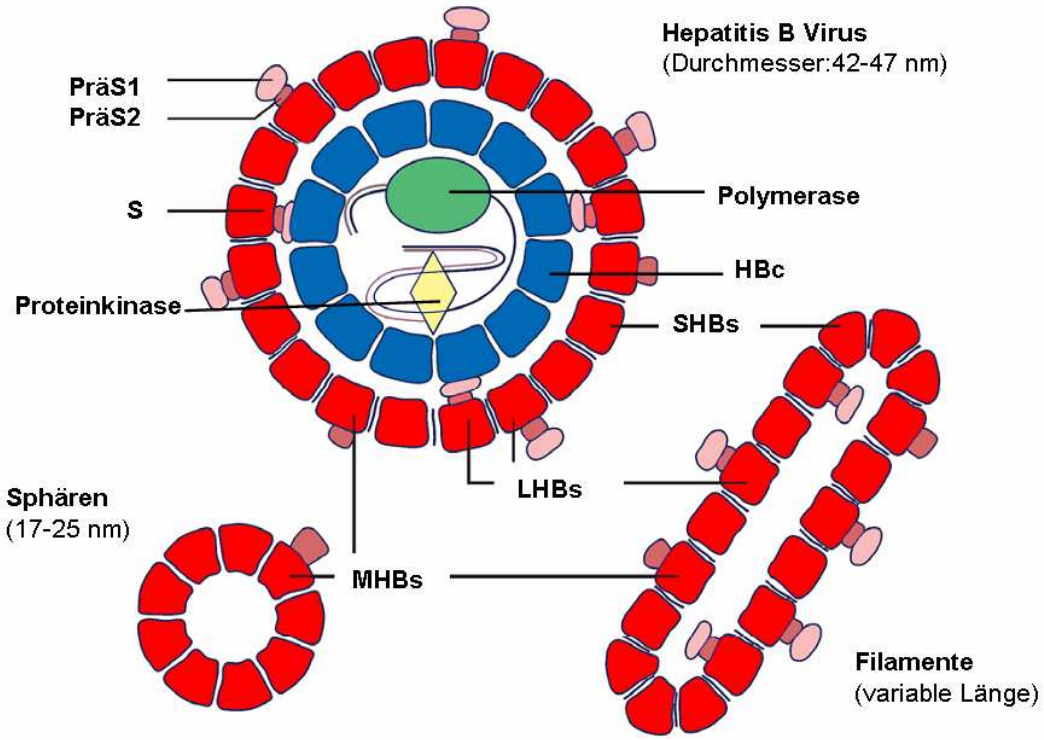


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Hepatitis B Virus und der subviralen Partikel
HBc: Hepatitis B Core-Protein
SHBs/MHBs/LHBs: Small-/Middle-/Large- Hepatitis B Surface-Protein
S: S-Domäne; PräS1: PräS1-Domäne; PräS2: PräS2-Domäne
(modifiziert nach Kann, 2002)

1.1.2.2 Nucleocapsid / Core-Partikel

Im Inneren der Hüllproteine befindet sich das virale Capsid, welches auch als Nucleocapsid oder Core-Partikel bezeichnet wird. Es besteht aus Hepatitis-B-Core-Protein (HBc bzw. HBcAg). Die Core-Proteine interagieren mit den nach innen weisenden Prä-S-Domänen des LHBs (Bruss 1997; Ponsel and Bruss 2003).

HBc besteht aus einer einzelnen Polypeptidkette von 183 (bzw. 185 bei Genotyp A) Aminosäuren und hat eine Masse von ca. 21,5 kDa. Unterteilt wird in die N-terminale Assemblierungsdomäne von ca. 140 AS, notwendig für die Assemblierung und spätere Gestalt der Capside, und eine C-terminale, stark basische, Protamin-ähnliche Domäne variabler Lokalisation (Carboxyterminus), notwendig u.a. für die Bindung von Nukleinsäure (Gallina et al. 1989; Nassal 1992). Die Assemblierungsdomäne bildet fünf α-Helices. α1, α2, α4b und α5 bilden einen hydrophobischen Kern, der eine wichtige Rolle bei der Stabilität der Tertiärstruktur

des HBc spielt. α3 (AS 50-73) und α4a (AS 79-110) die sog. Haarnadel (Wynne et al. 1999).

Die meisten Viruscapside sind ikosaedrisch, d.h. aus gleichschenkeligen Dreiecken aufgebaute Körper, so auch die Capside von HBV. Beim Aufbau des Capsids lagern sich zunächst zwei Core-Proteine zu Dimeren zusammen (Zhou and Standring 1992), dabei bilden die beiden Haarnadeln der Monomere Vierhelixbündel, die „Stacheln“ des HBV-Capsids. In oxidierender Umgebung – wie zum Beispiel im endoplasmatischen Reticulum (ER), im Golgi-Kompartiment oder extrazellulär - werden die Dimere durch Disulfidbrücken verbunden (Jeng et al. 1991). Die Bildung ist aber nicht essentiell für die Assemblierung (Nassal 1992). Von den vier Cysteinresten des HBc (Cys 48, Cys 61, Cys 107 und Cys 183) sind Cys 48 und Cys 61 im Bereich der Dimerzusammenlagerungsfläche (Nassal et al. 1992) verbunden, wobei Cys 48 manchmal und Cys 61 häufig Disulfidbrücken ausbilden (Zheng et al. 1992). Cys 183 formt nach Expression in eukaryonten Zellen Disulfidbrücken mit dem Cys 183 des benachbarten Core-Protein-Monomers (Seifer and Standring 1994), wohingegen nach Expression in E. coli undefinierte Disulfidbrücken zu den Cys 183 anderer Core-Proteine ausgebildet werden. Die Dimere wiederum bilden Trimere und durch Anlagerung weiterer Dimere entstehen schließlich die Ikosaeder (Zlotnick et al. 1999). Die Capside haben einen Durchmesser von 32 bzw. 36 nm und bestehen aus 180 bzw. 240 Core-Proteinen (Untereinheiten), d.h. sie bestehen aus einem Vielfachen von 60 Untereinheiten und zeigen entweder eine T=3 bzw. T=4 Symmetrie (Crowther et al. 1994; Kenney et al. 1995).

Die sog. Assemblierung läuft spontan, wird aber durch die Anwesenheit von RNA unterstützt (Seifer and Standring 1994), denn am Carboxyterminus des HBc befinden sich Arginin-reiche Cluster, die mit RNA interagieren, wenn sich der Carboxyterminus an der Capsidinnenseite befindet (Zlotnick et al. 1997).

Bei *in vitro* Studien an carboxyterminal trunkierten Core-Proteinen (AS 1-149) erwiesen sich die Anziehungskräfte zwischen den Untereinheiten als schwach (Ceres and Zlotnick 2002). Untereinheiten können dissoziieren, HBV-Capside „atmen“. Diese Flexibilität ermöglicht *in vivo* - wie an Digitionin-permeabilisierten Zellen gezeigt werden konnte -, dass das HBV-Capsid im Gegensatz zu den Capsiden anderer Viren (z.B. Adenoviren oder HSV), um das Freiwerden des Genoms für die Replikation zu ermöglichen, nicht durch irreversibele Strukturänderungen zerstört wird. Assemblierung und Deassemblierung sind reversible Prozesse. Speziell die

Kernpore führt zur Deassemblierung reifer Capside in Dimere und damit zum Freiwerden des Genoms. Im Cytoplasma und im Kern findet in Anwesenheit von RNA eine (Re-)Assemblierung statt (Rabe et al. 2009).

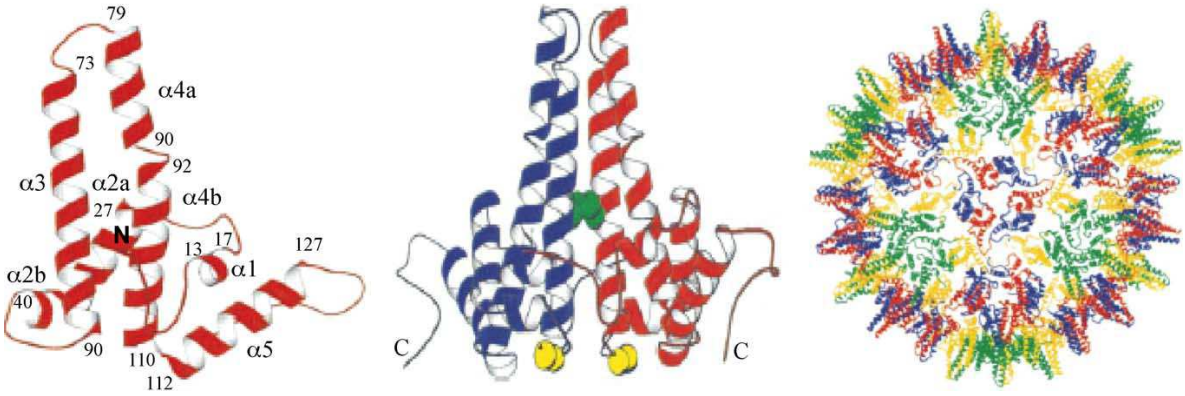


Abbildung 2: Aufbau des HBV-Capsids

Links: HBc-Monomer

- N-terminale Assemblierungsdomäne: 5 α-Helices
- hydrophobischer Kern (α1, α2, α4b und α5)
- Haarnadel (α3 und α4a)

Mitte: HBc-Dimer

- Vierhelixbündel (gebildet aus den beiden Haarnadeln der Monomere)
- Grün: Cys 61 und Gelb: Cys 48
- C-terminale, Protamin-ähnliche Domäne (=Carboxyterminus) variabler Lokalisation

Rechts: Capsid

- 240 Untereinheiten (T=4), Durchmesser 36nm
- 120 Stacheln (Vierhelixbündel)

(nach (Wynne et al. 1999))

Bei der Assemblierung werden zelluläre Proteinkinasen eingepackt (Albin and Robinson 1980; Gerlich et al. 1982). Um welche Proteinkinasen es sich handelt, wird noch diskutiert. So wurde eine GAPD-Proteinkinase (Duclos-Vallee et al. 1998), eine Ribosom-assozierte-Serin-Kinase (Kau and Ting 1998), SRPK-1 und SRPK-2 Kinasen (Daub et al. 2002) und Proteinkinase Cα (Kann et al. 1993; Kann and Gerlich 1994; Wittkop et al. 2010) nachgewiesen. Für Letzte wurde gezeigt, dass sie unabhängig vom Ursprung der Capside (Serum, Zellkultur) verpackt wird und die Capside durch Phosphorylierung destabilisiert analog zu Befunden am Capsid des DHBV (Kock et al. 2003). Serinreste (AS 157, AS 164 und AS 172) im Carboxyterminus werden in unbekanntem Maße phosphoryliert (Lan et al. 1999), was für verschiedene Schritte des Replikationszyklus essentiell ist: Durch die C-terminale Phosphorylierung wird ein sog. nuclear localisation signal (NLS) exponiert, was den Kernimport ermöglicht (Kann et al. 1999). Bei der Assemblierung wird spezifisch die

prägenomische RNA eingeschlossen (Gazina et al. 2000). Schließlich scheint die PKC Phosphorylierung essentiell für die Verpackung der Capside in die Hüllproteine zu sein (Wittkop et al. 2010).

1.1.2.3 HBV-Genom und virale Polymerase

Das HBV ist ein Pararetrovirus, welches zunächst ein RNA-Prägenom verpackt, das dann in DNA umgeschrieben wird. Diese Genomreifung wird durch die virale Polymerase vermittelt, die erst nach dem Verpacken in das virale Capsid – zusammen mit dem RNA-Prägenom und zellulären Faktoren, dem Hitzeschockprotein 90 und weiteren Chaperonen (Hu et al. 1997; Beck and Nassal 2001; Hu et al. 2002) – aktiviert wird. Die Polymerasen (reversen Transkriptasen) der Pararetroviren weisen eine N-terminale Domäne auf, die als Primer dient. Die reverse Transkriptase-Domäne schreibt die RNA in DNA um. Eine C-terminal lokalisierte RNase H degradiert die RNA des entstehenden RNA-DNA-Hybrids. Weil die virale Polymerase im Gegensatz zu den Polymerasen der Orthoretroviridae keine Integrase enthält, wird das virale Genom nach Infektion der Wirtszelle nicht in deren Genom integriert, sondern bleibt als sog. episomales Minichromosom im Zellkern bestehen (Bock et al. 2001).

Das reife HBV-Genom besteht aus einer zirkulären, teilweise doppelsträngigen DNA, der sog. relaxed circular DNA (rcDNA) (Robinson et al. 1974). Der komplete negative Strang ist ca. 3200 nt lang, hat eine terminale Redundanz von 8-10 nt an den Enden (Will et al. 1987) und das 5´-Ende ist kovalent an die Primer-Domäne der viralen Polymerase gebunden (Gerlich and Robinson 1980). Der kürzere positive Strang hat hingegen nur eine Länge zwischen 1700 und 2800 nt (Landers et al. 1977). Daraus resultiert eine einzelsträngige Lücke, je nachdem wie weit die virale Polymerase mit der Transkription fortgeschritten ist. Die zirkuläre Struktur ist durch die Basenpaarung des negativen Stranges mit dem positiven Strang bedingt (Charnay et al. 1979).

Ein 18 nt langes, nicht degradiertes Stück der ursprünglichen prägenomischen RNA, welches das mit Cap versehene 5`Ende repräsentiert, befindet sich am 5`-Ende des positiven DNA-Stranges und diente als Primer für die Synthese desselben (Zweitstrangsynthese).

Auf dem Minusstrang befinden sich vier offene, sich überlappende Leserahmen (open reading frame = ORF) für HBc/HBe, die Polymerase, HBs und HBx (Schlicht and Schaller 1989).

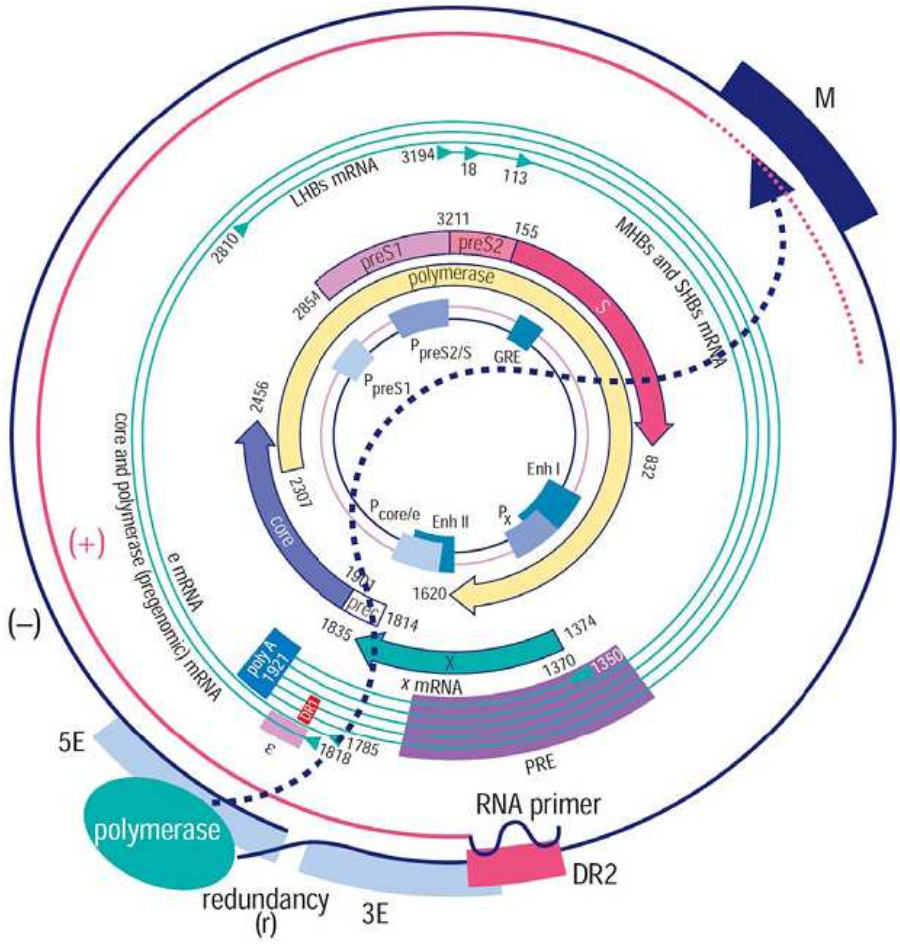


Abbildung 3: Genomstruktur von HBV

Äußere Kreise: Darstellung des Genoms mit der viralen Polymerase, wie sie innerhalb der Virionen vorliegt
Blaue Linie: Minusstrang Rote Linie: Plusstrang
Gestrichelte Linie: „tether"-Domäne zwischen Primer-Domäne am 5´-Ende des Minusstrangs und reverser Transkriptase am 3´-Ende des Plusstrangs
5E, 3E und redundancy: „circularisation elements", verantwortlich für Kreisbildung der DNA
RNA primer: 18 nt langer Rest der prägenomischen RNA gepaart mit dem Minusstrang (direct repeat DR2)
M: M-Region, unterstützt die Translokation der Polymerase für die Plusstrangsynthese

Mittlere Kreise (dünne türkise Linien): Darstellung der verschiedenen mRNAs
- Core und Polymerase mRNA (prägenomische RNA)
- HBe mRNA
- LHBs mRNA
- MHBs und SHBs mRNA
- HBx mRNA

Poly A: gemeinsames Ende der mRNAs durch Polyadenylierungssignal
ε: ε-Signal, Bindestelle für die virale Polymerase
PRE: „posttranscriptional regulatory element", verhindert das Splicen der mRNA

Innere Kreise (dicke Pfeile): Darstellung der offenen Leserahmen und der Transkription regulierenden Elemente
türkis: HBx-ORF, blau: Core-ORF, rot: HBs-ORF, gelb: Polymerase-ORF
P: Promotor, Enh: Enhancer, GRE: Glucocorticoid-responsibles Element

(modifiziert nach (Jilbert et al. 2002))

Die Expression wird von mindestens vier Promotoren (P(core/e), P(preS1), P(preS2/S) und P(x)) initiiert; von zwei Enhancern und dem Glucocorticoid-responsiblen Element verstärkt und von einem Element inhibiert (NRE: negative regulating element).

Die Promotoren bewirken die Transkription von mindestens fünf mRNAs unterschiedlicher Länge mit einem gemeinsamen 3´-Ende am einzigen Polyadenylierungssignal des HBV-Genoms (Cherrington et al. 1992).

Man kann mRNAs sub- und supergenomischer Länge unterscheiden. Die kürzeste mRNA mit ca. 700 nt ist die HBx mRNA, die unter Kontrolle des Promotors P(x) transkribiert wird. Sie kodiert für das Protein HBx, ein Nichtstrukturprotein. Am häufigsten transkribiert wird *in vivo* durch den Promotor P(preS2/S) die ca. 2100 nt lange MHBs und SHBs mRNA. Je nachdem welches Startcodon bei der Translation verwendet wird, entsteht MHBs mit der PräS2-Region oder SHBs. 2400 nt lang ist die LHBs mRNA, die zusätzlich auch noch die PräS1-Region enthält und die unter Kontrolle eines eigenen leberspezifischen Promotors (P(preS1)) transkribiert wird.

Die beiden mRNAs supergenomischer Länge verwenden denselben Promotor P(core/e). Sie sind ca. 3300 nt lang. Deshalb muss bei einer HBV-Genomlänge von 3200 nt beim ersten Durchlauf der Transkription das Polyadenylierungssignal ignoriert werden. Wie von Cherrington gezeigt wurde, führt erst das Vorhandensein von 5´-wärts vom Polyadenylierungssignal gelegener Sequenzen auf den RNAs zur Verwendung des Signals. Die um ca. 30 nt längere HBe mRNA kodiert für HBe, ein Nichtstrukturprotein, das sich durch die zusätzliche PräC-Domäne von HBc unterscheidet. Die kürzere HBc und Polymerase mRNA hat mehrere Funktionen. Sie dient zum einen der Translation von HBc, zum anderen in einem anderen Leserahmen der Translation von der viralen Polymerase. Außerdem wird sie als RNA-Prägenom bei der Assemblierung verpackt.

1.1.3 Nichtstrukturproteine

Es gibt auch Proteine, wie HBe und HBx, die nicht für die Struktur von HBV benötigt werden, und Proteine, wie HBs (SHBs, MHBs und LHBs), die in großem Überschuss hergestellt werden. Letztere Proteine assemblieren zu subviralen Partikeln und lassen sich wie auch HBe im Blut Infizierter nachweisen.

1.1.3.1 HBs oder HBsAg

Aus den im Überschuss gebildetem HBs bilden sich entweder Sphären mit einem Durchmesser von 17-25 nm oder Filamente unterschiedlicher Länge, die im Blut Infizierter nachgewiesen werden können. Sie haben eine längere Halbwertszeit (8 d statt 3 d) als die Viren (Chulanov et al. 2003). Sogar bei hochvirämischen Trägern übersteigt die Zahl der leeren HBs-Partikel die der Viren um ein Tausendfaches. Konzentrationen von bis zu 1 g/l können so erreicht werden. Bei niedrigvirämischen Trägern, wenn die HBV-DNA mittels PCR kaum noch nachzuweisen ist, lässt sich häufig noch HBsAg nachweisen.

Die Bedeutung dieser Überexpression konnte noch nicht abschließend geklärt werden. Sie könnte für die, für eine chronische Infektion notwendige, Immuntoleranz eines Trägers mitverantwortlich sein. Außerdem könnten die subviralen Partikel dazu dienen HBV-Rezeptoren abzusättigen, wodurch intakte Viren im Blut nachweisbar werden und die Infektion einer anderen Person möglich wird (Kann and Gerlich 2005).

1.1.3.2 HBe oder HBeAg

HBeAg wurde 1972 im Blut HBsAg positiver Blutspender entdeckt (Magnius and Espmark 1972). Es ist insbesondere bei hochinfektiösen HBsAg Trägern (Shikata et al. 1977) nachzuweisen. Niedrigvirämische Virusträger sind häufig HBeAg negativ und weisen stattdessen Antikörper (anti-HBe) auf.

Wie beschrieben dient die längste HBV-mRNA als Matritze für das HBe. Die PräC-Domäne - ein Sekretionssignal - führt hierbei zur Translokation ins endoplasmatische Retikulum der Wirtszelle. Dort wird das Signal bis auf 10 Aminosäuren am N-Terminus des Core-Proteins abgespalten. Diese 10 AS erlauben die Dimerisierung des prozessierten Proteins, verhindern aber eine Assemblierung, wie die der Core-Proteine. Bei der Passage durch den Golgi-Apparat der Zelle entsteht durch Proteasen, die den C-Terminus des Proteins spalten, schließlich ein Protein mit einer Masse von ca. 16-18 kDa (HBc 21,5 kDa).

HBe ist nicht für die Virusreplikation essentiell. Es wird aber vermutet, dass HBe im Serum eine wichtige Rolle bei der Immunregulation und der Entwicklung einer chronischen Infektion spielt (Milich and Liang 2003).

HBe von der HBeAg-positiven Mutter wird über die Plazenta auf den Fetus übertragen und ist dort auch ohne Infektion des Babys bis zu sechs Monate

nachweisbar (Wang et al. 2003). Die bei perinataler Infektion besonders häufige chronische Infektion könnte u.a. durch diese plazentare Übertragung und Exposition des sich entwickelnden Immunsystems mit viralem Antigen vermittelt werden. Die Bedeutung von HBe bei der Entwicklung einer chronischen Infektion wird durch weitere Arbeiten an Tiermodellen unterstützt: Bei HBe-exprimierenden transgenen Mäusen lies sich in der Konsequenz eine T-Zell-Toleranz für HBeAg und HBcAg nachweisen. Anti-HBc konnte aber produziert werden (Milich et al. 1990). Dieser immunologische Befund entspricht dem von perinatal infizierten Neugeborenen. Außerdem entwickelten neugeborene Waldmurmeltiere bei einer Infektion mit einer HBe-negativen Mutante lediglich eine akute und nicht wie meistens bei einer Wildtyp-Infektion eine chronische Hepatitis (Chen et al. 1992).

1.1.3.3 HBx

HBx ist für die Virusreplikation in transfizierten Zelllinien nicht essentiell (Yaginuma et al. 1987). *In vivo* ist hingegen HBx für die WHV-Hepatitis eines Waldmurmeltiers notwendig (Chen et al. 1993; Zoulim et al. 1994). In transgenen Mäusen konnte demonstriert werden, dass HBx für die HBV-Replikation nicht essentiell ist, sondern sie lediglich verstärkt (Xu et al. 2002). Nach Exposition mit der HBx-negativen Mutante liegt, selbst wenn es nicht zu einer messbaren Serokonversion gekommen ist, ein gewisser Schutz auch gegen Wildtyp-Infektion vor. Zhang et al. bezeichnen HBx-negative Mutanten deshalb als attenuiertes Virus (Zhang et al. 2001).

HBx aktiviert die HBV-Genexpression durch Aktivierung viraler und zellulärer Enhancer (Spandau and Lee 1988; Zahm et al. 1988; Xu et al. 2002). Außerdem ist HBx auch ein Koaktivator multipler zellulärer Gene und spielt somit evtl. eine Rolle bei der Entwicklung des hepatozellulären Karzinoms (Wu et al. 2002). Da HBx-negative Mutanten vor allem bei immundefizienten Menschen nachgewiesen werden können (Repp et al. 1992), kann auch eine Immuntoleranz steigernde Wirkung von HBx vermutet werden.

HBxAg bzw. anti-HBx lassen sich bei Infektion zwar evtl. im Blut nachweisen und scheinen einen Hinweis auf die Entwicklung einer Leberzirrhose bzw. eines HCC zu geben (Zhang et al. 2009), spielen aber in der Routinediagnostik keine Rolle.

1.1.4 Replikationszyklus

Viren sind obligat intrazelluläre Parasiten, d.h. sie benötigen eine Wirtszelle mit ihrem Biosyntheseapparat für die Replikation. Der Replikationszyklus besteht aus Adsorption an eine suszeptible Zelle, welche Signalkaskaden aktiviert, die die nachfolgende Aufnahme des Virus ermöglichen, der Aufnahme in die Zelle durch Fusion mit der Zellmembran oder Endozytose (Penetration), Vermehrung des Virusgenoms, mRNA-Synthese, Translation der viralen Proteine, Zusammenbau und schließlich Sekretion des infektiösen Virus.

Für die Replikation und Transkription muss das Genom aller DNA-Viren (Ausnahme Pox- und Vacciniaviren) in den Zellkern transportiert werden.

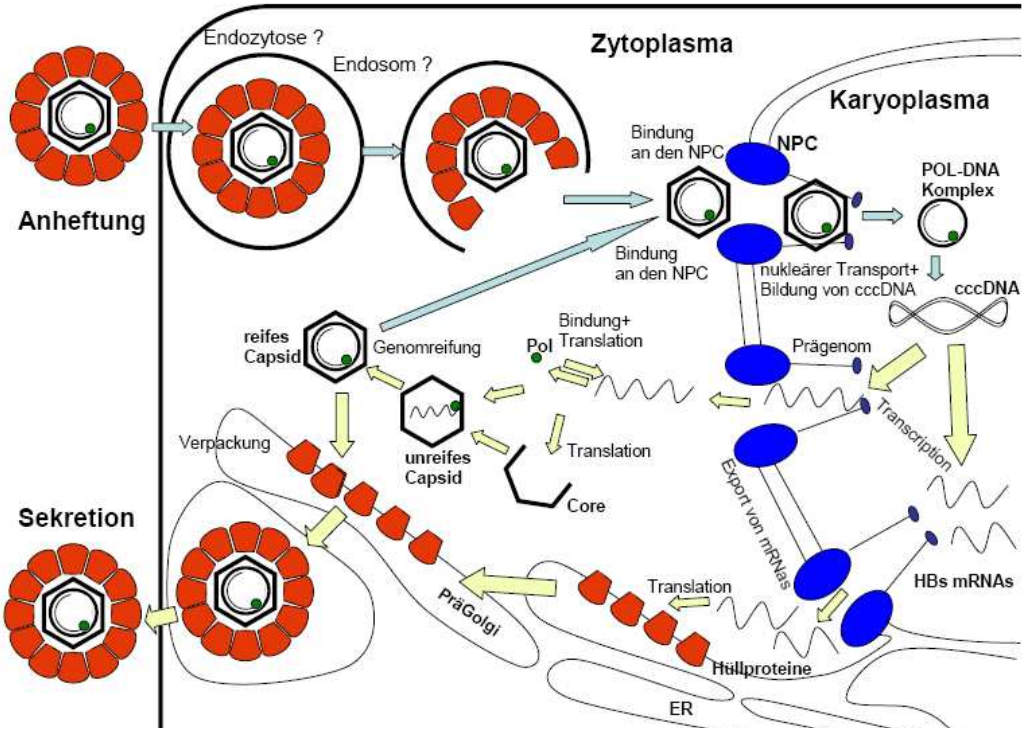


Abbildung 4: Replikationszyklus des HBV
NPC: nuclear pore complex; ER: Endoplasmatisches Retikulum; Pol: Polymerase; PräGolgi: PräGolgi-Kompartment.
(nach (Wittkop 2007))

1.1.4.1 Adsorption und Penetration

Der erste Schritt zur erfolgreichen Infektion einer Zelle ist die Adsorption oder Anheftung, indem virale Liganden mit zellulären Rezeptoren interagieren.

Wahrscheinlich handelt es sich bei den viralen Liganden von HBV um LHBs und SHBs. SHBs allein reicht für eine Adsorption nicht aus (Glebe et al. 2005). Antikörper

gegen die PräS1-Sequenz bzw. kompetierende Proteine können die Bindung von HBV an menschliche Hepatozyten blockieren (Neurath et al. 1986; Pontisso et al. 1989) und zumindest in primärer menschlicher Hepatozytenkultur eine Infektion verhindern (Maeng et al. 2000). Neben primärer Menschen- und Primatenhepatozytenkultur lässt sich auch eine Hepatozytenkultur von Tupaia belangeri mit HBV infizieren (Kock et al. 2001). Mit diesem Modell gelang der Nachweis, dass Antikörper gegen die PräS1-Region und gegen SHBs HBV komplett neutralisieren, während Antikörper gegen die PräS2-Region nur teilweise wirken (Glebe et al. 2003). Der Fund von PräS2-negativen Mutanten in Patienten belegt ebenfalls die untergeordnete Rolle von MHBs (Fernholz et al. 1993).

Für HBV wird ein zweistufiger Adsorptionsprozess beschrieben. In der frühen Phase der Adsorption erfolgt die Bindung an den sog. low affinity rezeptor. Diese Adsorption kann durch Heparin inhibiert werden, was auf heparansulfatierte Proteoglykane als primären Rezeptor hinweist (Leistner et al. 2008). In der späteren Phase kann die Infektion noch immer durch PräS1-Lipopeptide, aber nicht mehr durch Heparin verhindert werden. Die Identität dieses zweiten, des sog. high affinity rezeptor ist noch unklar. So wurden für HBV u.a. der Asialoglycoprotein-Rezeptor (Treichel et al. 1994; Owada et al. 2006) und der Interleukin-6-Rezeptor, da HBV Interleukin 6 als Mediator zu binden scheint (Neurath et al. 1992), als PräS1-Liganden beschrieben. Für SHBs wurden z.B. Apolipoprotein H (Mehdi et al. 1994) und Endonexin II (Hertogs et al. 1993) als mögliche Rezeptoren beschrieben.

Für DHBV konnte Carboxypeptidase D als für die Infektion verantwortlicher zellulärer Rezeptor identifiziert werden (Kuroki et al. 1995; Urban et al. 2000). Diese Carboxypeptidase wandert zwischen Plasmamembran und Golgi-Apparat und könnte den Virus auf diesem Weg mitnehmen (Breiner et al. 1998).

Für die Penetration der Hepadnaviridae wird, durch Untersuchungen am HBV-Modell DHBV, Endozytose mit anschließendem Mikrotubuli-abhängigem, Aktin-unabhängigem Transport (Funk et al. 2004) angenommen. Auch für HBV konnte inzwischen ein Mikrotubuli-abhängiger Transport von Capsiden zum Kern gezeigt werden (Rabe et al. 2006).

Das Freiwerden des Capsids aus dem Endosom ist für den Kernimport essentiell und scheint nicht von einer Ansäuerung abhängig zu sein (Kock et al. 1996). Im SHBs befindet sich eine kurze hydrophobische Sequenz, die den Fusionsproteinen von

anderen umhüllten Viren ähnelt und im Falle von Influenza das Fusionsprotein sogar ersetzen kann (Berting et al. 2000).

1.1.4.2 Kernimport und Transkription der viralen DNA

Der Import der Capside in den Zellkern folgt weitgehend dem klassischen Weg karyophiler Proteine. Die freien Capside exponieren mit der C-terminalen Phosphorylierung des HBc ein sog. nuclear localisation signal (NLS) (Kann et al. 1999). Importin α und β binden an das NLS, danach kommt es zur Bindung des Capsids an den Kernporenkomplex (NPC = nuclear pore complex) und zur Translokation in den nukleären Korb auf der Innenseite der Kernmembran. Aufgrund der geringen Größe der Capside ist ein Transport des intakten Capsids durch die Kernpore möglich (Pante and Kann 2002) und es kommt bei gereiftem Genom im nukleären Korb zur Dissoziation des Capsids mit Freigabe des Genoms in das Karyoplasma (Schmitz et al.; Rabe et al. 2003).

Die virale rcDNA wird dann in eine vollständige kovalent verbundene, zirkuläre DNA (die sog. cccDNA = covalently closed circular DNA) umgewandelt. Dies beinhaltet das Lösen der viralen Polymerase und der Primer, die Vollendung des Plusstrangs und die kovalente Verbindung der 5´- und 3´-Enden durch eine DNA-Ligase. Die an diesen Prozessierungen beteiligten Enzyme und die Abfolge der Reaktionen sind jedoch unbekannt. Die cccDNA wird durch Histone und Nicht-Histone zu einem sog. episomales Minichromosom organisiert und bleibt in dieser Form im Zellkern bestehen (Bock et al. 2001).

Durch die zelluläre Polymerase II werden dann die oben beschriebenen fünf unterschiedlichen mRNAs transkribiert. Sie haben am 5´-Ende eine CAP-Struktur und sind am 3´-Ende polyadenyliert. Das Spleißen wird durch das posttranscriptional regulatory element (PRE) inhibiert (Huang and Liang 1993).

1.1.4.3 Assemblierung und Genomreifung

Bei der *In vitro*-Assemblierung von *E. coli* generierten Capsiden wird unspezifisch RNA mitverpackt. Bei der Assemblierung *in vivo* kommt es hingegen spezifisch zur Verpackung der prägenomischen RNA (pgRNA), die dann im Capsid zur rcDNA reift. Die Assemblierung wird dabei durch einen Ribonukleoproteinkomplex gefördert. Dieser besteht aus der viralen Polymerase (Bartenschlager et al. 1990; Hirsch et al. 1990), welche mit der stem-loop-Sekundärstruktur des sog. Epsilonsignals am 5´-

Ende der pgRNA (Junker-Niepmann et al. 1990) interagiert, und zellulären Hitzeschockproteinen (Hu et al. 1997). Auch die Phosphorylierung der Core-Proteine an Serin 164 ist für die spezifische Verpackung der prägenomischen RNA notwendig (Gazina et al. 2000).
Die Reifung des Genoms ist möglich, da Löcher von 12-15 Å im Capsid die Diffusion von kleinen Molekülen, z.B. Nukleotiden, ins Lumen erlauben.

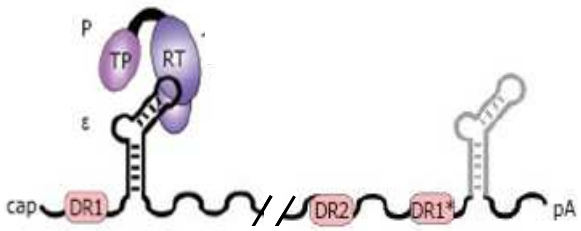


Abbildung 5: Bindung der viralen Polymerase an das Epsilonsignal

P: virale Polymerase
RT: reverse Transkriptase
TP: Terminales Protein
cap: 5´-Ende der pgRNA
DR: direct repeat
pA: 3´-Ende der pgRNA

(nach (Beck and Nassal 2007))

Am Epsilonsignal beginnt die Synthese des DNA-Negativstrangs mit zunächst nur drei Nukleotiden (bzw. bei DHBV mit vier Nukleotiden). Es kommt zur Translokation der Polymerase und des gebildeten Oligonukleotides zum DR1* (direct repeat 1) am 3´-Ende der pgRNA (Wang and Seeger 1993).

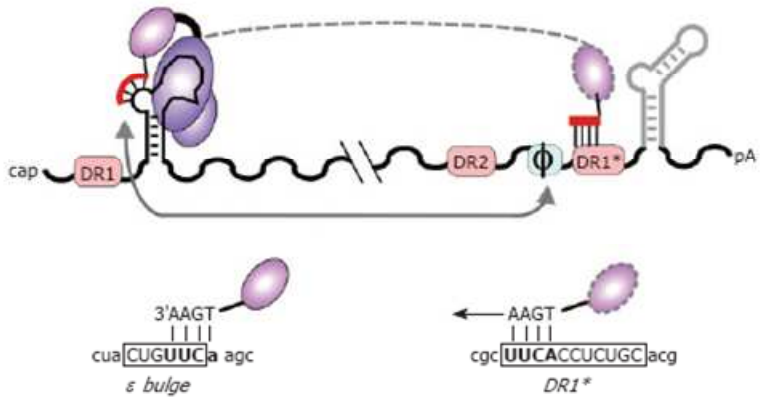


Abbildung 6: Translokation des Oligonukleotid-Polymerase-Komplexes

Rot: erste Nukleotide des DNA-Negativstranges

(nach (Beck and Nassal 2007))

Von hier aus wird die Synthese des Negativstranges in Richtung des 5`-Endes der RNA fortgesetzt. Die zum entstehenden Strang komplementäre RNA wird durch die RNaseH-Aktivität der Polymerase abgebaut. Lediglich ein 18 nt langes Stück am Ende, welches den DR1 enthält, bleibt erhalten. Dieses dient nach seiner

Translokation zum DR2 des Negativstranges als Primer für die Synthese des DNA-Plusstrangs.

Die Synthese des Plusstrangs verläuft zunächst von diesem DR2 in Richtung des 5´-Endes des Negativstranges. Die weitere Elongation des Positivstranges wird durch den Wechsel der Polymerase vom 5´-Ende zum DR1 am 3´-Ende des Negativstranges ermöglicht. Dieser Wechsel führt zur zirkulären Struktur der rcDNA. Die Synthese des Positivstranges wird im Inneren des Capsids nicht vollendet, sondern erst im Karyoplasma der infizierten Zelle.

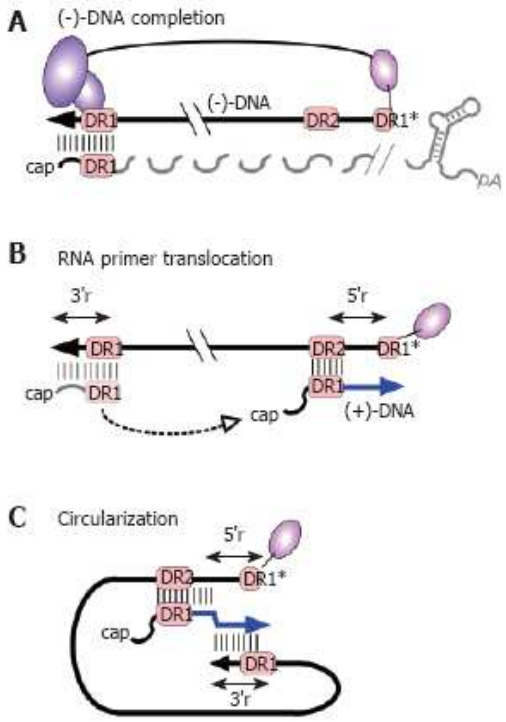


Abbildung 7: Genomreifung im Inneren des Capsids

A: Vollendung des DNA-Negativstranges in Richtung des 5´-Endes der RNA und Abbau der RNA

B: Translokation der Polymerase und des 5´-Endes der RNA als Primer für die DNA-Positivstrangsynthese zum DR2 des DNA-Negativstranges

C: Zirkularisation des Genoms durch Wechsel der Polymerase vom 5´-Ende zum 3´-Ende des DNA-Negativstranges während der Synthese des DNA-Plusstrangs

(nach (Beck and Nassal 2007))

1.1.4.4 Verpackung und Sekretion

Nach der Assemblierung und der Genomreifung zur rcDNA werden die Capside am PräGolgi-Apparat in die äußere Hülle verpackt. Die reverse Transkription ist hierbei Vorraussetzung für die Interaktion zwischen Capsid und Hüllprotein (Gerelsaikhan et al. 1996). Ferner ist eine Phosphorylierung durch zelluläre Proteinkinase Cα erforderlich, die sich auch in den Capsiden findet (Wittkop et al. 2010). Die Viren werden dann vermutlich durch Exocytose über sog. multivesicular bodies sekretiert (Watanabe et al. 2007).

Besonders in der Anfangsphase der Infektion eines Hepatozyten – wenn nur geringe Mengen an Hüllprotein synthetisiert werden - binden die Capside mit gereiftem

Genom wieder an Kernporen und die rcDNA wird in das Karyoplasma entlassen. Hierdurch entsteht ein Pool an cccDNA, wodurch sich die Infektion stabilisiert. Ein infizierter Hepatozyt kann über 50 Kopien cccDNA enthalten (DHBV (Tuttleman et al. 1986)). Die Angaben für HBV sind sehr viel heterogener und variieren zwischen 5 und 50 Kopien.

1.2 Hepatitis B

HBV selbst ist nicht zytopathogen. Die Erkrankung ist Folge der Reaktionen des Immunsystems des Infizierten auf die viralen Antigene (Immunpathogenese). So führen aktivierte zytotoxische T-Zellen zum Untergang infizierter Hepatozyten (Chisari and Ferrari 1995).

HBV-Infektionen haben weltweit eine hohe Inzidenz und Prävalenz und damit eine nicht zu unterschätzende Bedeutung für die Morbidität und Mortalität der Menschheit: Geschätzte zwei Milliarden Menschen hatten Viruskontakt. Über vier Millionen erkranken jedes Jahr an einer akuten Hepatitis B. Ca. 350 Millionen sind chronisch infiziert. Ca. 25 % der Träger, d.h. über eine Million Menschen jährlich, sterben an einer chronischen HBV-Infektion und ihren Folgen (WHO 2002). Die Ursache von 30 % aller Fälle von Leberzirrhose und von 53 % aller Fälle von hepatozellulärem Karzinom (HCC) ist eine HBV-Infektion (Perz et al. 2006).

Weltweit gesehen ist die perinatale Infektion oder die Infektion in der frühen Kindheit am häufigsten. Regionen mit einer hohen Prävalenz, d.h. 70 - 90 % der Bevölkerung hatten Viruskontakt und > 8 % sind chronisch infiziert, sind Südostasien, Afrika südlich der Sahara, die Pazifik-Region (ausgenommen Japan, Australien und Neuseeland), das Amazonas-Becken und Teile des Mittleren Ostens, Zentralasiens und Osteuropas. Gegenden mit einer niedrigen Prävalenz, d.h. < 20 % der Bevölkerung hatten Viruskontakt und < 2 % sind chronisch infiziert, sind Nordamerika, Teile Südamerikas, West- und Nordeuropa.

Es existiert ein sicherer und effektiver Impfstoff aus rekombinant hergestelltem HBsAg gegen eine HBV-Infektion. Mindestens 85 – 90 % der HBV-assoziierten Todesfälle wären durch diese Impfung zu verhindern (WHO 2002).

Der Infektionsverlauf ist sehr unterschiedlich und hängt u.a. von der Infektionsdosis, dem Alter und der Immunkompetenz der infizierten Person ab.

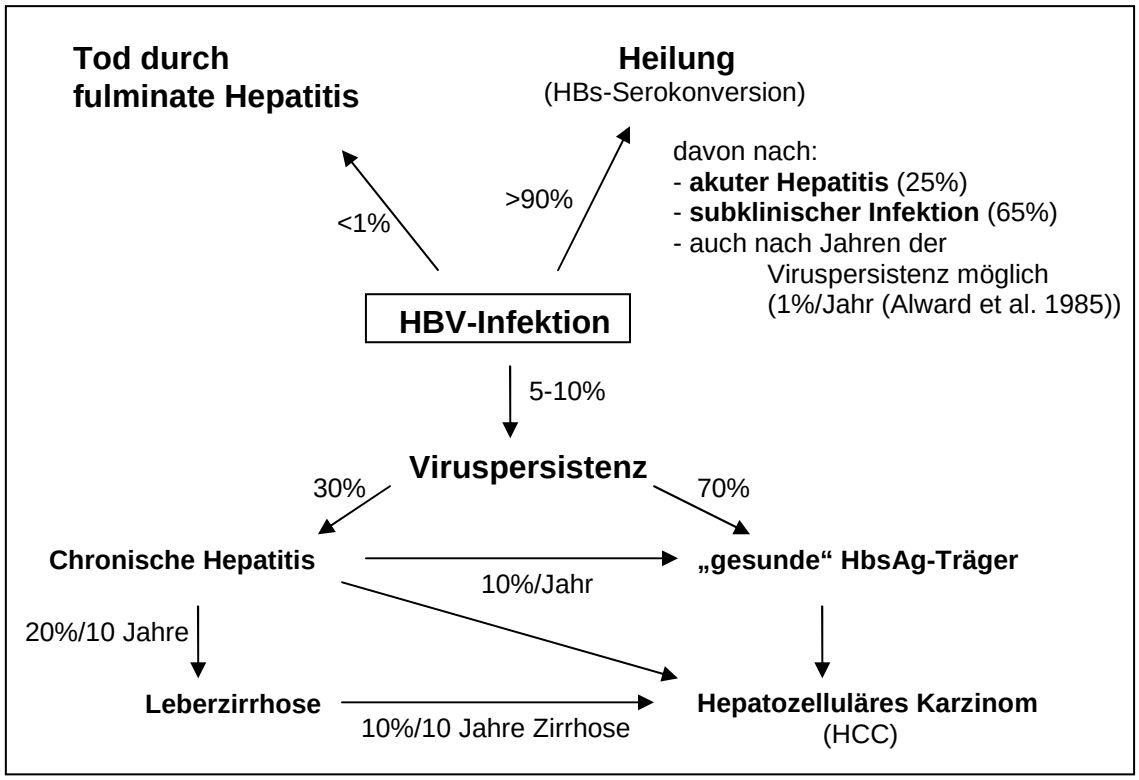


Abbildung 8: Verlaufsmöglichkeiten der HBV-Infektion bei gesunden Erwachsenen
(modifiziert nach (Herold 2005))

1.2.1 Akute Infektion

Bei kleiner Infektionsdosis und / oder immunkompetenten Erwachsenen kommt es meist nur zu einem subklinischen Verlauf der Infektion. Bei hoher Infektionsdosis kommt es dagegen eher zu einer akuten Hepatitis mit Symptomen wie Müdigkeit, Schmerzen im rechten Oberbauch durch Leberkapselspannung, Appetitlosigkeit, Übelkeit, hellem Stuhl, dunklem Urin und Ikterus (Herold 2005). Die Inkubationszeit liegt zwischen 45 und 180 Tagen wiederum in Abhängigkeit von der Infektionsdosis (Gerlich 2002). Die akute Hepatitis B heilt meistens aus (Abbildung 9A). Ein Übergang in eine chronische Form ist äußerst selten, ist aber zu befürchten, wenn HBV-DNA über die achte Woche hinaus nachweisbar ist (Herold 2005).

In weniger als einem Prozent der Fälle kommt es zu einer dann aber häufig letal verlaufenden, fulminanten Hepatitis mit Versagen der Lebersyntheseleistung (u.a. Zusammenbruch der Blutgerinnung) und des Lebermetabolismus (u.a. Ammoniakanstieg und hepatische Enzephalopathie). Der frühzeitige Einsatz von Lamivudin, einem Inhibitor der reversen Transkriptase, kann in solchen Fällen die Mortalität senken. In einer Studie von 2006 konnte dadurch das transplantationsfreie

Überleben von 20 % auf über 80 % der Fälle von schwerer bzw. fulminanter Hepatitis gesteigert werden (Tillmann et al. 2006).

Im Anschluss an eine akute, ausgeheilte Infektion sind im Serum sowohl anti-HBc- als auch anti-HBs-Antikörper nachweisbar. Es liegt eine Immunität gegen eine erneute Infektion vor. Nach Jahren kann evtl. nur noch anti-HBc nachweisbar sein. In solchen Fällen zeigt aber die schnelle anti-HBs-Antikörperbildung nach Probe-Impfung (Aoki et al. 1993), dass noch Gedächtniszellen vorliegen, die vor einer Reinfektion schützen. Bei der üblichen Impfung gegen eine HBV-Infektion mit rekombinant hergestelltem HbsAg ist hingegen nur anti-HBs nachweisbar. Nach Impfung gilt ein anti-HBs-Titer von über 10 mIU/ml als Zeichen einer Immunität.

1.2.2 Chronische Infektion

Von einer chronischen Hepatitis spricht man definitionsgemäß bei einer Hepatitis, die nach über 6 Monaten nicht ausgeheilt ist. Bei immunkompetenten Erwachsenen sind die Viruspersistenz und die Entwicklung einer chronischen Hepatitis bei einer HBV-Infektion sehr selten. Häufiger ist sie bei Kindern und hier insbesondere bei perinataler Infektion (> 90 %). Auch Drogenabhängige, Hämodialysepatienten oder aus anderen Gründen Immunsuppremierte sind häufiger betroffen.

Die klinischen Symptome sind entsprechend vom Immunstatus des Infizierten abhängig. Sollten sich Symptome im Rahmen einer chronischen Hepatitis ausbilden, so sind diese milde und unspezifisch (Leistungsminderung, Müdigkeit und uncharakteristische Oberbauchbeschwerden). Evtl. kommt es in Phasen höherer Krankheitsaktivität zu Symptomen ähnlich einer akuten Hepatitis B. Möglicherweise kommt es aber auch erst zu Krankheitsmanifestationen, wenn die Leber bereits zirrhotisch umgebaut ist, d.h. Lebergewebe durch Bindegewebe ersetzt und damit irreversibel zerstört wurde. Dann kommt es zur Dekompensation mit Versagen der Lebersyntheseleistung sowie des Lebermetabolismus und mit portaler Hypertension samt ihren Folgen (u.a. Aszites, Ösophagusvarizen). Eine Gefahr ist die Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms (HCC). Das Risiko an einem HCC zu erkranken ist bei chronisch Infizierten ca. 100fach erhöht gegenüber der Normalbevölkerung (Beasley et al. 1981).

Man unterscheidet auch serologisch unterschiedliche Gruppen einer chronischen HBV-Infektion. Es gibt den Zustand der Immuntoleranz mit hoher Viruslast aber geringer Aktivität des Immunsystems und damit auch geringer Krankheitsaktivität

(immuntoleranter HBV-Träger). Dieser Zustand wird z.B. nach perinataler Infektion beobachtet. Patienten ohne Reaktivität des Immunsystems zeigen keine Symptome, haben jedoch auch ohne die Entwicklung einer Zirrhose das Risiko ein HCC zu entwickeln (Carey 2009). Mit zunehmender Aktivität des Immunsystems nimmt zwar die Viruslast ab aber die Krankheitsaktivität zu. Man spricht dann auch von chronisch aktiver Hepatitis B. Zu jedem Zeitpunkt der Infektion ist es durch eine verstärkte Immunreaktion (oft einhergehend mit einem Krankheitsschub) doch noch möglich, dass die Virusreplikation bis unter die Nachweisgrenze gedrückt wird. HBeAg verschwindet dann, stattdessen wird anti-HBe nachweisbar (Abbildung 9B). Der Status des sog. „gesunden“ HBsAg-Trägers ist damit erreicht. Im Spontanverlauf tritt diese sog. HBe-Serokonversion in ca. 10 % / Jahr auf (Alward et al. 1985). Durch eine Behandlung mit Interferon α lässt sich eine HBe-Serokonversionsrate von 40 % erreichen (Niederau et al. 1996). Entsprechend ist der Nachweis von HBeAg im Serum mit einer hohen Viruslast und damit höheren Infektionsgefahr assoziiert.

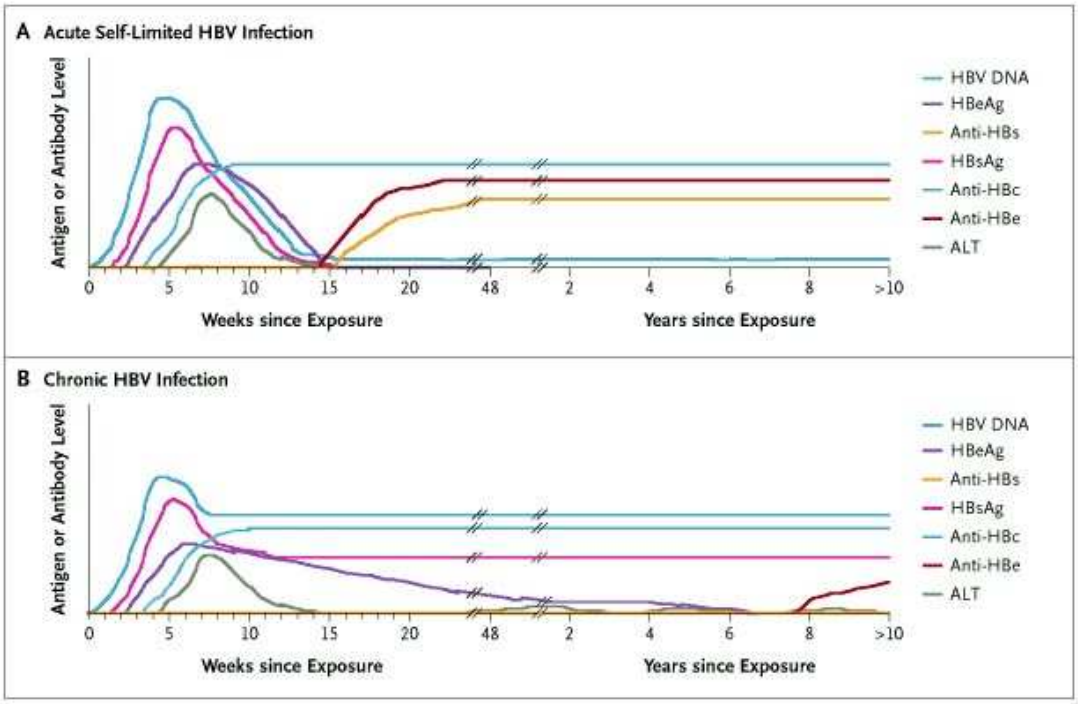


Abbildung 9: Verlauf der Serummarker bei HBV-Infektion

A: akute selbstlimitierende Infektion
B: chronische Infektion – beispielhaft dargestellt mit HBe-Serokonversion nach 7 Jahren

(nach (Ganem and Prince 2004))

1.2.3 Ungewöhnliche serologische Profile

Neben den oben beschriebenen und abgebildeten serologischen Profilen (Abbildung 9) kann es auch untypische Befunde geben: Anti-HBc als einziger positiver Befund, sog. „Anti-HBc alone“ (Ponde et al.), kann z.B. bei nicht vollständiger Ausheilung, aber bereits bei Verlust des HBsAg, auftreten. Anti-HBs als einziger positiver Marker bei nichtgeimpften Personen kann Folge von passivem Transfer (Verlust nach einigen Monaten) sein oder bei ausgeheilter Hepatitis B und Verlust von anti-HBc über die Jahre auftreten. Der sehr seltene Fall von positivem HBsAg, aber negativem anti-HBc soll in dieser Arbeit näher untersucht werden.

1.2.4 Okkulte Infektion

Auch bei „ausgeheilter“ Infektion, Serokonversion von HBsAg zu anti-HBs kann HBV persistieren (Rehermann et al. 1996). Von einer sog. Okkulten Infektion (Raimondo et al. 2007) spricht man, wenn HBsAg negativ ist, aber HBV-Genome (z.B. in einer Leberbiopsie) nachweisbar sind. Kommt es in solchen Fällen zu einer Einschränkung des Immunsystems, kann es zum Verlust der Antikörper (reverse Serokonversion) und durch Zusammenbruch der T-Zell-Immunität zu erneuter Virusvermehrung kommen (Awerkiew et al. 2007). Da HBV nicht zytopathogen ist, ist diese Vermehrung zunächst asymptomatisch. Bei Rekonstitution des Immunsystems kann es dann aber zur fulminanten Hepatitis kommen (Westhoff et al. 2003). Ein weiteres Problem sind Blutspender mit einer solchen okkulten Infektion. Hier sind Infektionen der Empfänger möglich, wenn nur auf HBsAg getestet wird oder der HBV-DNA-Test nicht sensitiv genug ist (Allain 2004). Auch scheint eine okkulte Infektion ein Risiko für die Progression einer Leberfibrose und die Entstehung eines HCC zu sein (Raimondo et al. 2007).

In seltenen Fällen kann auch eine Mutation des Virus für das trotz Infektion negative Ergebnis im HBsAg-Test verantwortlich sein (Zuckerman and Zuckerman 2003).

1.3 HBc als Antigen

Der Kontakt des Immunsystems des Infizierten mit den viralen Antigenen löst die Hepatitis aus. Nach der Reaktion des angeborenen Immunsystems (Natürliche

Killerzellen (NK) und NK-T-Zellen (Bertoletti and Gehring 2006)) führt erst das adaptive Immunsystem mit seinem Netz von T-Helferzellen (Kalams and Walker 1998), Zytokinen, B-Zellen und vor allem zytoxischen T-Zellen (Thimme et al. 2003) zur Viruselimination. So führen zytotoxische T-Zellen, wenn sie mit ihrem T-Zell-Rezeptor Fragmente der HBV assozierten Proteine (8-12 Aminosäuren lange sog. Epitope) auf den Haupthistokompatibilitätskomplexen (MHC) Klasse I der infizierten Hepatozyten erkennen, zum Untergang dieser Hepatozyten. Die zweite Methode der zytotoxischen T-Zellen ist die Sekretion von Interferon gamma (INFγ) und Tumornekorsefaktor alpha (TNFα), welche die Expression und Replikation von HBV verhindern (Guidotti and Chisari 1996; Guidotti and Chisari 2001). B-Zellen hingegen eliminieren über die Antikörperproduktion zirkulierende Viren und verhindern so die (Re-)Infektion.

Unter den viralen Proteinen ist die Fähigkeit von HBcAg eine Immunreaktion zu aktivieren herausragend. Es führen schon wenige Nanogramm HBcAg zur Antikörperbildung in der Maus (Vanlandschoot et al. 2003). HBcAg ist im Gegensatz zu HBeAg in der Lage T-Zell-unabhängig B-Zellen zur Antikörperbildung zu aktivieren (Milich and McLachlan 1986), außerdem sind viele CD4-Epitope vorhanden (Ferrari et al. 1991; Jung et al. 1995), was auch eine starke T-Zell-abhängige Aktivierung ermöglicht. HBcAg kann von B-Zellen aufgenommen, prozessiert und damit T-Zellen bedeutend effektiver präsentiert werden als dies durch die klassischen Antigen präsentierenden Zellen der Fall wäre (Milich et al. 1997). Neben der außergewöhnlichen Struktur von HBcAg aktiviert das Vorhandensein von mitverpackter Nukleinsäure die Immunreaktion zusätzlich (Vanlandschoot et al. 2003).

Während HBcAg vor allem eine Th1-Antwort und damit die Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen stimuliert, führt HBeAg eher zu einer für die Elimination des Virus ungünstigeren Th2-Antwort mit Betonung der Antikörperbildung, was wiederum für die Rolle des HBeAg bei der Entwicklung einer chronischen Hepatitis spricht (Milich et al. 1997).

1.3.1 Anti-HBc

Aufgrund der oben beschriebenen immunologischen Potenz von HBcAg kommt es im Rahmen einer HBV-Infektion immer zur Produktion von Antikörpern (anti-HBc).

Antikörper erkennen entweder konformationale Epitope, die nur in der natürlichen Konformation des Proteins vorhanden sind, oder lineare Epitope, die sich auch noch bzw. nur (sog. kryptische Epitope) im denaturierten Protein z.B. mit der Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nachweisen lassen.

Während auf der T-Zell-Ebene eine hohe Kreuzreaktivität von HBcAg und HBeAg besteht (Milich et al. 1987), sind die gebildeten Antikörper zum großen Teil verschieden, d.h. eine Unterscheidung ist serologisch möglich (Salfeld et al. 1989).

Untersuchungen über die Lokalisation der B-Zell-Epitope von HBcAg zeigten, dass abhängig vom Stadium der Infektion unterschiedliche Antikörper gebildet werden (Tordjeman et al. 1993) und dass hauptsächlich konformationale Sequenzen im Bereich der sog. Immunodominaten Schleife (AS 78-83) am Stachel der Capside erkannt werden (Salfeld et al. 1989; Pushko et al. 1994; Conway et al. 1998). Die Zahl der vorhandenen B-Zell-Epitope wurde auf ca. 20 geschätzt (Harris et al. 2006).

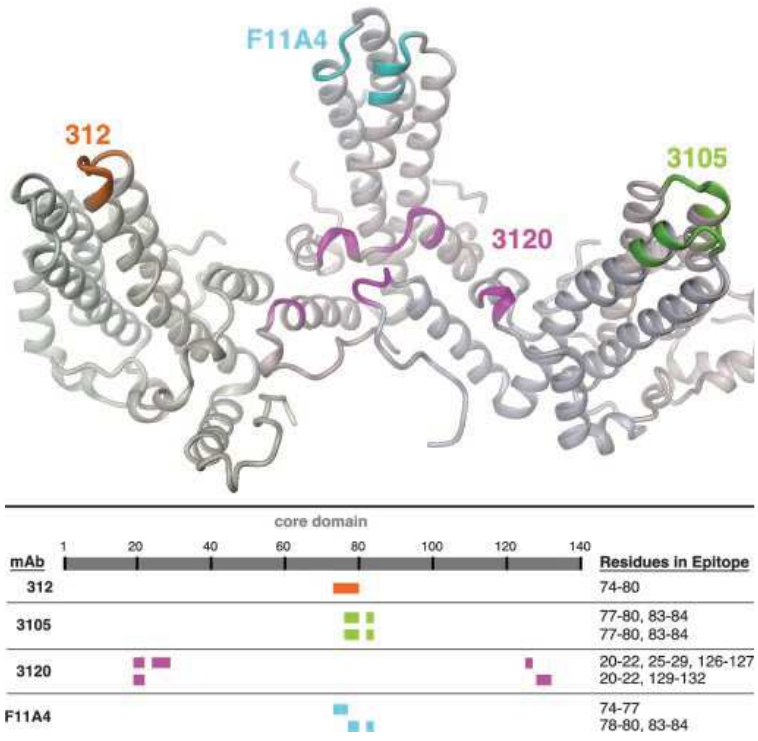


Abbildung 10: Beispielhafte Darstellung von Epitopen unterschiedlicher anti-HBc-Antikörper

Oben: Darstellung von drei Stacheln eines HBV-Capsids

Unten Darstellung der Aminosäuresequenz eines Core-Proteins

– farbig markiert sind jeweils die Anteile, die von den entsprechenden Antikörpern erkannt werden

Orange: mAb 312
Grün: mAb 3105
Lila: mAb 3120
Hellblau: mAb F11A4

Lineare Epitope: mAb 312
Konformationale Epitope: mAb 3105, mAb 3120, mAb F11A4

(nach (Belnap et al. 2003))

1.4 Anti-HBc-Test

Der Test auf anti-HBc hat eine hohe klinische Relevanz, denn es lässt sich mit einem positiven anti-HBc-Titer zunächst am einfachsten ein Viruskontakt nachweisen. So eignet sich der anti-HBc-Test z.B. als Screening-Untersuchung, ob bei einer akuten Hepatitis HBV als auslösendes Agens in Frage kommt. Zur weiteren Unterscheidung, ob eine akute, chronische oder ausgeheilte Infektion vorliegt, sind aber weitere Tests notwendig.

Der Test von anti-HBc-IgM im Speziellen eignet sich zur Unterscheidung von akuter und chronischer Infektion (unterschiedliche Titerhöhe) und zum Monitoring der aktuellen Aktivität einer bekannten HBV-Infektion.

Als alleiniger Test bei Blutspendern um eine Infektionsgefahr für den Empfänger auszuschließen ist der Anti-HBc-Test nicht geeignet, da in seltenen Fällen anti-HBc trotz bestehender Infektion negativ ist (siehe Kapitel 1.2.3 Ungewöhnliche serologische Profile und z.B. Allain 2004).

Nach Entdeckung des HBcAg-anti-HBc-Antigen-Antikörpers-Systems (Almeida et al. 1971) wurde anti-HBc zunächst mit der Komplementbindungsreaktion (Hoofnagle et al. 1973) nachgewiesen. Der Antikörpernachweis bei der Komplement-bindungsreaktion basiert auf dem Verbrauch von Komplement durch die zugegebenen Antikörper. Das nicht verbrauchte Komplement wird anschließend durch die Lyse von Antikörper-beladenen Erythrozyten nachgewiesen. Werden noch alle zugegebenen Erythrozyten lysiert, hat vorher keine Komplementbindung stattgefunden, der Antikörpernachweis ist negativ. Ein Problem war zunächst die Knappheit an HBcAg, das anfangs noch aus Leber aufgereinigt werden musste. Erst die Möglichkeit HBcAg in großen Mengen in *E. coli* zu synthetisieren (Stahl et al. 1982) führte zur Verfügbarkeit von anti-HBc-Tests.

Heutzutage wird üblicherweise ein Enzym-Immunoassy (EIA) zum Test von anti-HBc verwendet (Westh et al. 1996; Gerlich 2002). Dabei ist rekombinant hergestelltes HBcAg an die feste Phase gebunden und die Bindung von markiertem anti-HBc wird durch evtl. im Serum vorhandenes anti-HBc inhibiert. Ein Beispiel ist der AxSymCORE der Firma Abbott. Außerdem gibt es sog. Sandwich-Assays wiederum mit HBcAg an der festen Phase und markiertem anti-IgG, das das gebundene anti-HBc aus dem Serum markiert.

Anti-HBc-IgM-Titer werden meistens ebenfalls über einen EIA bestimmt. Die Antikörper werden dabei über anti-μ-Antikörper an die feste Phase gebunden. Dann

werden die gebundenen anti-HBc-Antikörper über markiertes HBcAg sichtbar gemacht.

Anti-HBc-Tests gehören zu den *in vitro*-Diagnostika (IVD). Um in Europa in der Diagnostik angewendet werden zu dürfen, müssen sie der EG-Richtlinie 98/79 (IVD-Richtlinie) ensprechen und mit einer CE-Kennzeichnung versehen werden. In Deutschland werden IVDs durch das Paul-Ehrlich-Institut (PEI) geprüft. Die Prüfungen umfassen Produktbewertungen im Rahmen des Konformitätsbewertungsverfahren und Chargenprüfungen (PEI 2009).

Zur Prüfung der Sensitivität von serologischen Tests werden üblicherweise Serokonversionspanel verwendet. Dabei handelt es sich um Folgeproben kürzlich infizierter Spender. Um die Sensitivität beurteilen zu können, sollten die ersten Proben für den zu untersuchenden Parameter noch negativ sein und die Folgeproben sollten in möglichst kurzen Zeitintervallen entnommen worden sein (PEI 2009). Der sensitivste Test wird als Bezugsgröße verwendet. Die Angabe der Sensitivität des geprüften Tests erfolgt dann als „nicht erkannte Proben / Serokonversionspanel“ bzw. „nicht erkannte Tage / Serokonversionspanel“.

Im Falle von anti-HBc ist seit 2008 ein Internationaler Standard (NIBSC 95/522) zur Qualitätskontrolle und Vergleichbarkeit zwischen unterschiedlichen Tests eingeführt worden (WHO 2008). So konnte das PEI zur Sicherung von Qualitätsstandards von IVD im Blutspendewesen im Januar 2010 eine analytische Sensitivität von < 1,40 Internationalen Einheiten pro ml (IE/ml) als Mindeststandard für anti-HBc-Tests fordern. Eine Forderung die der AxSymCORE der Firma Abbott, der in dieser Arbeit zum Vergleich eingesetzt wurde, erfüllt.

1.5 Zielsetzung dieser Arbeit und experimentelle Ansätze

Ein Ziel dieser Arbeit war es Häufigkeit und evtl. Ätiologie des HBsAg positiven, anti-HBc negativen Profils im Rahmen der Hepatitis B näher zu untersuchen. Um dieser Frage nachzugehen wurden entsprechende Seren aus drei Quellen, dem Nationalen Konsilarlabor für HBV in Gießen und den Serumverwaltungen der virologischen Diagnostiken des Gießener Uniklinikums und des Centre Hospitalier Universitaire (CHU) in Bordeaux, Frankreich zusammengetragen und untersucht.

Es wurde versucht über weitere diagnostische Tests (z.B. Genotypisierung und Sequenzierung), über Vorläufer- oder Folgeseren und über zusätzlich erhältliche klinische Informationen zu den Patienten Näheres zur Ätiologie des fehlenden anti-HBc herauszufinden.

Der Hauptteil der Arbeit war es einen neuen anti-HBc-Test zu entwickeln. So konnte geprüft werden, ob eine erhöhte Sensitivität doch noch zum positiven Nachweis führt. Außerdem handelt es sich bei den meisten kommerziell erhältlichen anti-HBc-Tests um EIAs auf der Basis einer Kompetition des evtl. im Serum vorhandenen anti-HBc mit dem markierten Test-anti-HBc. Dies könnte den Nachweis wenig avider anti-HBc-Antikörper aus dem Serum verhindern. Bereits 1984 wurde ein nicht-kompetitiver Radioimmunoassay für anti-HBc beschrieben (Wolff and Gerlich 1984), der viele Seren aus einer HBV-Hochrisikopopulation positiv testete, die zuvor im Inhibitionsassay negativ gewesen waren. Damals wurde aus Leber aufgereinigtes HBc, das durch die endogene Proteinkinase in den Capsiden mit ^{32}P markiert worden war, als Antigen verwendet. Durch die inzwischen zur Verfügung stehenden Methoden konnten in dieser Arbeit *E. coli*-exprimierte Capside, die durch *in vitro*-Phosphorylierung mittels Proteinkinase C mit ^{32}P markiert worden waren (Kann and Gerlich 1994), als Antigen eingesetzt werden. Dies hat den Vorteil einer deutlich besseren Verfügbarkeit des benötigten Antigens. Um unspezifisch-positive Ergebnisse ausschließen zu können, wurde ein Assay verwendet bei dem später die Spezifität durch Inhibition mit unmarkiertem Capsid kontrolliert werden konnte.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Adenosintriphosphat (ATP)	ROCHE Diagnostics, Mannheim
Agarose (Seakem)	BIOZYM, Oldendorf
Antioxidanz (NuPAGE)	INVITROGEN, Carlsbad, CA, USA
β-Mercaptoethanol (β-ME)	ROTH, Karlsruhe
Bovines Serum Albumin (BSA)	ROTH, Karlsruhe
Bromphenolblau	SIGMA-ALDRICH, Taufkirchen
[γ ^{32}P] ATP	GE-Healthcare, München
Dimethylsulfoxid (DMSO)	SIGMA-ALDRICH, Taufkirchen
Dithiothreit (DTT)	SIGMA-ALDRICH, Taufkirchen
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	SIGMA-ALDRICH, Taufkirchen
Ethylenglycoltetraessigsäure (EGTA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethanol	FLUKA, Taufkirchen
Ethidiumbromid	SERVA,Heidelberg
Fetales Kälberserum (FKS)	PANSYSTEMS, Aidenbach
Glycin	ROTH, Karlsruhe
Magermilchpulver	FREMA, Lüneburg
2(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES)	ROTH, Karlsruhe
Methanol	FLUKA, Taufkirchen
Nonidet P-40 (NP-40)	FLUKA, Taufkirchen
Phosphatidylserin	SIGMA-ALDRICH, Taufkirchen
Saccharose	SIGMA-ALDRICH, Taufkirchen
Tween-20	MERCK, Darmstadt
Trichloressigsäure (TCA)	ROTH, Karlsruhe
Trifluoressigsäure (TFA)	ROTH, Karlsruhe

Alle Chemikalien, Salze und organischen Lösungsmittel wurden, soweit im Text nicht anders vermerkt, in der Qualität “reinst“ oder “pro analysi“ von MERCK, Darmstadt bezogen.

2.1.2 Lösungen und Puffer

DMEM-Medium / 10 % FKS:

Dulbeccos Modified Essential Medium (DMEM) High Glucose
(in Pulverform von GIBCO / BRL, Karlsruhe)
3,7 g/l $NaHCO_3$
ad 9 l dH_2O, mit CO_2 auf pH 7,0 einstellen
ad 10 % (v/v) FKS (vor Gebrauch)

Einfriermedium:

60 % DMEM High Glucose
20 % FKS
20 % DMSO

ECL-Substratlösung:
(PERKIN-ELMER, Zaventem, Belgien)

50 %	Enhanced Luminol Reagent
50 %	Oxidizing Reagent

Ethidiumbromidbad:

2 µg/ml Ethidiumbromid
in 1x Tris Acetat EDTA (TAE)
dunkel bei 4℃ lagern

MES-Puffer (20x):

97,6 g	MES
60,0 g	Tris Base
3 g	EGTA

ad 500 ml dH_2O

Milchpuffer:

7,5 g	Magermilchpulver
150 ml	PBS

Milchwaschpuffer:

50 ml	Milchpuffer
5 ml	Tween-20 / PBS
445 ml	PBS

NuPAGE-LDS-Probenpuffer (4x):	4 g	Glyzerin
(INVITROGEN, Carlsbad, CA)	0,682 g	Tris Base
	0,666 g	Tris HCl
	0,8 g	LDS
	0,006 g	EDTA
	0,75 ml	1 % Serva Blue G250-Lsg
	0,25 ml	1 % Phenol Rot-Lsg.
	ad 10 ml dH_2O	

PBS:	136 mmM	NaCl
	3 mM	KCl
	9 mM	Na_2HPO_4
	2 mM	KH_2PO_4
	mit HCl auf pH 7,4 einstellen	

Probenpuffer (6x) für native Agarose-Gel-Elektrophorese (NAGE):

	50 % (w/v)	Saccharose
	0,25 % (w/v)	Bromphenolblau
	6x	TAE

Proteinkinase C-Puffer (10x):	100 mM	Natriumphosphatpuffer (pH 7,0)
	100 mM	$MgCl_2$
	4 mM	$CaCl_2$

SSC (10x):	1500 mM	NaCl
	150 mM	Trinatriumcitrat

SyproRed (protein gel stain)
(INVITROGEN, Oregon, USA)

Tris-Acetat-EDTA-Laufpuffer (TAE-Puffer) für NAGE (pH 7,8):

	40 mM	Tris-Acetat pH 7,8

	1 mM	EDTA
Transferpuffer (10x):	144 g	Glycin
(für Elektroblot)	30 g	Tris
	150 ml	Methanol
	ad 1 l dH_2O	
Tris-Glycin SDS-Laufpuffer (10x):	29 g	Tris Base
(ANAMED, Darmstadt)	144 g	Glycin
	10 g	SDS
	ad 1 l dH_2O	

2.1.3 Enzyme

DNase I	ROCHE Diagnostics, Mannheim
Proteinkinase C (PKC) (Gemisch aus PKC α/β und χ aus Rattenhirn)	CALBIOCHEM, Schwalbach
RNase A	ROCHE Diagnostics, Mannheim
S7-Nuklease	ROCHE Diagnostics, Mannheim
10 x Trypsin / EDTA	GIBCO BRL, Karlsruhe

2.1.4 Molekulargewichtsmarker

C^{14} Methylated proteins	AMERSHAM Biosciences, UK
1 kb DNA Ladder (DNA-Marker)	GIBCO BRL, Karlsruhe
MagicMark XP Western Protein Standard	INVITROGEN, Carlsbad, CA, USA
Rainbow high Proteinmarker	AMERSHAM Biosciences, Freiburg

2.1.5 Antikörper und Dynabeads

Esel-Anti-Kaninchen-Ak, konjugiert mit Peroxidase (POD)	DIANOVA, Hamburg
Esel-Anti-Maus-Ak, POD konjugiert	DIANOVA, Hamburg
Kaninchen-Anti-HBV-Core-AK	DAKO, Hamburg
mAb 3105	Institute of Immunology, Tokio, Japan
Protein G (konjugiert an magnetische Kügelchen (beads))	DYNAL, Hamburg

Schaf-Anti-Kaninchen-AK (konjugiert an magnetische Kügelchen (beads))	DYNAL, Hamburg
Schaf-Anti-Maus-AK (konjugiert an magnetische Kügelchen (beads))	DYNAL, Hamburg

2.1.6 Seren

N1-N32: 32 HBV-DNA und anti-HBc negative Seren von Blutspendern wurden freundlicherweise von Dr. C. G. Schüttler zur Verfügung gestellt. Die Seren waren mit dem Microparticle-Enzyme Immune Assay (MEIA, AxSymCORE von Abbott) am Institut für Medizinische Virologie, Gießen auf anti-HBc und in Minipools von 10 Seren auf HBV-DNA (HBV-PCR (Ampliscreen, Roche) in der Blutbank des Universitätsklinikums Gießen negativ getestet worden.

P1-P3 und P5–P9: Acht anti-HBc positive Seren aus dem Diagnostischen Labor des Instituts für Medizinische Virologie (IMV) in Gießen wurden freundlicherweise von Dr. W. R. Willems zur Verfügung gestellt.

P4: Das erste anti-HBc positive Serum aus einem Serokonversionspanel, dass freundlicherweise von Dr. C. G. Schüttler zur Verfügung gestellt wurde.

F1-F10: Die Seren von diesen Patienten stammen aus der virologischen Diagnostik am Centre Hospitalier Universitaire (CHU) in Bordeaux, Frankreich und wurden freundlicherweise von Frau Dr. P. Trimoulet und Herrn Prof. Dr. H. Fleury zur Verfügung gestellt.

D1-D5: Die Seren von diesen Patienten stammen aus der virologischen Diagnostik des Universitätsklinikums Gießen und wurden gesammelt und verwahrt in der Serumverwaltung des IMV und freundlicherweise von Herrn Dr. W. R. Willems ausgewählt und zur Verfügung gestellt.

K1-K11: Die Seren von diesen Patienten wurden an das IMV gesendet, weil es Nationales Konsiliarlabor ist. Sie wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. W. H. Gerlich zur Testung vorgeschlagen.

2.1.7 rHBc

E. coli exprimierte Capside (Crowther et al. 1994) wurden von Herrn Prof. Dr. P. Pumpens und Frau Dr. I. Sominskaja am Biomedical Research and Study Centre, University of Lativa, Riga, Lettland freundlicherweise für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

2.1.8 Zelllinien

Hep.G2.2.15: eine Hepatoblastomzelllinie, die stabil mit einem HBV-Genom-Plasmid transfiziert und immortalisiert wurde (Sells et al. 1987). Durch die sezernierten HBV-Partikel lässt sich bei Schimpansen eine akute Hepatitis auslösen (Acs et al. 1987).

2.1.9 Verbrauchsmaterialien

Einwegsreaktionsgefäße (500 µl; 1,5 ml; 2 ml)	EPPENDORF, Hamburg
Einwegsreaktionsgefäße (7 ml; 12 ml)	SARSTEDT, Nürnbrecht
Einwegsreaktionsgefäße (15 ml; 50 ml)	FALCON, USA
Glasfaserfilter (GF / C-Filter)	WHATMAN, UK
Kryogefäße	FISHER-SCIENTIFIC, Nidderau
Maxischalen	FISHER-SCIENTIFIC, Nidderau
Mikroliterpipetten (2 – 1000 µl)	EPPENDORF, Hamburg
Parafilm	AMERICAN National Can, Neenah, USA
Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran	VWR Inernational, Frankfurt
Röntgenfilm	AMERSHAM BIOSCIENCES, Freiburg
Saran-Folie	DOW, Michigan, USA
Szintillationsgefäße	MAGV, Rabenau
Tris-Glycin-Gele 16 %	ANAMED, Darmstadt
Whatman-Paper (weißes, dickes, saugfähiges Papier)	WHATMAN, UK
Zellkulturschalen (15cm)	Greiner Bio One, Solingen

2.1.10 Geräte

Automatischer Filmentwickler (Curix 60)	Agfa, Mortsel (Belgien)
Begasungs-Brutschrank (Cytoperm)	HERAEUS, Hanau
Blotmodul für Elektroblot	INVITROGEN, Karlsruhe
Binokularmikroskop	LEITZ, Wetzlar
Elektrophoresekammer für Agarosegele	Werkstatt der JLU, Gießen
Elektrophoresekammer für SDS-Gele	INVITROGEN, Karlsruhe
Gelkamera (CS-1)	CYBERTECH, Berlin
Heizblock	Werkstatt der JLU, Gießen
Magnetrührer [MR 3001]	Heidolph, Schwabach
Mikroliterpipetten [Research]	Eppendorf, Hamburg
Radioscreen mit Kassetten	FUJI BAS-MP, Japan
Radioscreenlöscher	RAYTEST, Isotopenmeßgeräte GmbH
Reinstwasseranlage (Ionenaustauscher)	MILLIPORE, Eschborn)
Sterilbank (LaminAir HB 2448)	HERAEUS, Hanau
Stromquelle	HOEFER scientific instruments, USA
Szintillationszähler (1209 Rackbeta)	PERKIN-ELMER WALLAC, Freiburg
Tischzentrifuge	EPPENDORF, Hamburg
Thermodrucker	MITSUBISHI, Paderborn
Typhoon 9200	MOLECULAR DYNAMICS, Sunnyvale, CA
Ultraschallgerät (Sonoplus UW 70 / HD 70)	BANDELIN, Berlin)
Ultrazentrifuge (L5-50)	BECKMAN, München
UV-Leuchttisch (TFX-20M)	VILBER-LOURMAT, Torcy, Frankreich
Vakuumpumpe Divac 2,4L	LEYBOLD, England
Vibrax [VXR-basic]	IKA Werke, Staufen
Vortexer [MS2 Minishaker]	IKA Werke, Staufen
Waage [PC 4400]	Mettler-Toledo, Gießen
Zentrifuge (Biofuge)	HERAEUS, Hanau
Zentrifuge (CR 422)	JOUAN, Unterhachingen

2.2 Methoden

2.2.1 Native Agarose-Gel-Elektrophorese (NAGE)

Um zu zeigen, dass das für die Versuche verwendete HBcAg intakt ist, es sich also um komplette Capside handelt, wurden Aliquots des Materials in der nativen, nicht-denaturierenden Agarose-Gel-Elektrophorese (NAGE) aufgetrennt und anschließend die Laufhöhe der Capsid-Partikel bestimmt. Dies geschah entweder durch einen Immunblot (Kapillarblot und dann immunologischer Nachweis) oder bei radioaktiv-phosphorylierten Capsiden über den Nachweis der Banden mit dem Phosphoimager.
Für die Herstellung des Gels wurden 2 g Agarose in 200 ml TAE-Puffer in der Mikrowelle solange aufgekocht bis keine Schlieren mehr zu sehen waren. Dann wurde die verdunstete Flüssigkeit durch destilliertes Wasser ersetzt (Gewichtsdifferenz zwischen vor und nach dem Aufkochen) und nach dem Verrühren die flüssige Agarose in eine Kassette (0,5 x 5 x 8 cm) gegossen. Nach dem Erkalten und damit dem Erhärten der Agarose wurde der Kamm für die Aussparung der Geltaschen gezogen und das Gel in die mit TAE-Laufpuffer gefüllte Gelkammer gelegt. Die Proben wurden im Verhältnis 1 zu 6 mit 6x Agarose-Probenpuffer gemischt. Durch die hohe Dichte sanken die Proben dann von der Pipette in die vorbereiteten Geltaschen. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 10 V/cm Gellänge durchgeführt und nach ca. einer Stunde beendet.
Für den Nachweis von radioaktivem Capsid wurde das Gel zum Trocken über Nacht zwischen Whatman-Paper in einen Stapel aus Papierhandtüchern gelegt, am nächsten Tag zur Vermeidung von Kontaminationen in durchsichtige Haushalts (Saran)-Folie eingeschlagen und dann auf einen Radioscreen aufgelegt (Nachweis mit dem Phosphoimager siehe Kapitel 2.2.4.2).
Bei nichtradioaktiv markierten Capsiden wurden die Proteine aus dem Agarose-Gel durch einen Kapillarblot (siehe Kapitel 2.2.1.2) auf eine PVDF-Membran überführt und dann auf der Membran immunologisch nachgewiesen.
Als Marker zur Bestimmung der Laufhöhe wurde bei den radioaktiven Capsiden ein DNA-Marker, der durch eine Ethidiumbromidfärbung sichtbar gemacht wurde, beim Immunblot ein spezieller IgG-bindender Marker (MagicMark XP Western Protein Standard) verwendet.

2.2.1.1 Ethidiumbromidfärbung

Zum Nachweis von Nukleinsäuren (z.B. DNA-Marker) im Agarose-Gel wurde eine Ethidiumbromidfärbung durchgeführt. Dazu wurde das Gel 20 min im Dunkeln bei 4℃ in ein Ethidiumbromidbad (2 µg/ml Ethidiumbromid in 1x TAE) gelegt. Auf einem Leuchttisch wurde das gefärbte Gel dann mit UV-Licht einer Wellenlänge von 260 nm angeregt. Das in die Nukleinsäuren interkalierte Ethidiumbromid fluoreszierte rot. Die derartig sichtbar gemachten Banden wurden mit der am Leuchttisch installierten Gelkamera fotografiert und anschließend ausgedruckt.

2.2.1.2 Kapillarblot nach Southern

Im Kapillarblot nach Southern (Southern 1975) wurden die Proteine aus dem Agarose-Gel zum immunologischen Nachweis auf eine Polyvinylendifluorid(PVDF)-Membran übertragen. Dazu wurde die PVDF-Membran zunächst 5 min in Methanol, dann 2 min in destilliertem Wasser und schließlich 2 min in 10x SSC bei RT geschwenkt. Das Gel wurde unter die Membran auf Whatman-Paper (stabiles, saugfähiges Papier) gelegt. Die Enden des Whatman-Paper wurden in eine Wanne mit 10x SSC gehängt. Das Ganze wurde bis auf ein Fenster in der Größe von Gel und Membran mit Saran-Folie bedeckt um die Verdunstung von SSC zu verhindern und um einen senkrechten Sog vom Gel zur Membran zu gewährleisten. Der Sog wurde durch 20 cm obenauf gelegte Papierhandtücher, die sich im Laufe der Nacht (mindestens aber über 6 h) langsam mit SSC voll saugten, aufgebaut.

2.2.2 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (PAGE)

Bei der SDS-PAGE werden die Proteine, anders als bei der NAGE, nicht undenaturiert aufgetrennt. Durch das SDS und das zugefügte DTT wird die Proteinstruktur (hydrophobe Interaktionen und Disulfidbrücken) zerstört und die Aminosäureketten weitgehend nach ihrer molekularen Masse aufgetrennt. Im Falle der Capside bedeutet das einen Zerfall in Capsidmonomere und damit eine Laufhöhe von ca. 21,5 kDa.

In dieser Arbeit wurden hauptsächlich 16 %ige Tris-Glycin-Gele mit 1 mm Dicke, einer Größe von 8 x 8 cm und 15 Geltaschen von der Firma ANAMED verwendet. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit Probenpuffer und DTT versetzt und für 10 min bei 96℃ erhitzt. Die Elektrophoresekammer wurde mit Tris-Glycin-Laufpuffer gefüllt, die Geltaschen wurden gespült und anschließend mit den Proben befüllt. Die

Elektrophorese fand bei 150 V statt und dauerte ca. 2 Stunden. Dann wurde das Gel aus der Gelkassette entnommen und entweder gefärbt, geblottet (Elektroblot) oder getrocknet.

2.2.2.1 Proteinnachweis mit SyproRed

Eine Möglichkeit Proteine im SDS-Polyacrylamid-Gel (PAG) sichtbar zu machen, war eine Färbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff SyproRed. Dazu wurde das Gel mindestens 1 h (auch über Nacht bei dann entsprechend längerer Entfärbung) bei Dunkelheit in 100 ml 7,5 %iger Essigsäure mit 20 µl SyproRed-Lösung geschwenkt, danach zum Entfärben eine Viertelstunde bei Dunkelheit in 7,5 %iger Essigsäure und dann 5 min in Reinstwasser inkubiert. Die gefärbten Proteine wurden am Typhoon 9200, angeregt mit einer Wellenlänge von 532 nm, sichtbar gemacht.

2.2.2.2 Elektroblot

Im Elektroblot wurden die Proteine aus dem SDS-PAG zum immunologischen Nachweis auf eine PVDF-Membran übertragen.

Dazu wurde eine 8 x 8,5 cm große PVDF-Membran zunächst 2 min in Methanol, dann 2 min in destilliertem Wasser und schließlich 10 min in 1x Transferpuffer mit 15 % Methanol bei RT geschwenkt. Die Membran und das Gel wurden nun zwischen Whatman-Papier in das Blotmodul gelegt. Das Blotmodul wurde mit dem Transferpuffer-Methanol-Gemisch befüllt. Die angelegte Spannung betrug 25 V bei 2 h Blotzeit und 15 V für 12 h.

2.2.2.3 Trocknen von SDS-PAGE-Gelen

Für den Nachweis von radioaktivem Core-Protein wurde das Gel auf einen Radioscreen aufgelegt (Nachweis mit dem Radioscreen s. Kapitel 2.2.4.2) und je nach enthaltener Aktivität wurde dieser Stunden bis Tage exponiert.

Um einen gleichmäßigen Wasserverlust und damit das Verziehen und das Einreissen des Gels während der langen Exposition und um Kontaminationen zu vermeiden, musste das Gel getrocknet werden. Dazu wurde das Gel auf angefeuchtetem Whatman-Papier und mit Saran-Folie bedeckt auf einen Heiztisch gelegt und mit einer Gummimatte abgedeckt. Dann wurde ein Sog nach unten über eine an den Heiztisch angeschlossene Vakuumpumpe erzeugt. Nach ca. 2 Stunden war alles Wasser abgesaugt und das getrocknete Gel konnte entnommen werden.

2.2.3 Immunologischer HBcAg-Nachweis (Western Blot)

Zum immunologischen HBcAg-Nachweis wurden die Proben durch einen Kapillar- bzw. Elektroblot auf eine PVDF-Membran transferiert (siehe Kapitel 2.2.1.2 und 2.2.2.2). Diese Membran wurde dann zunächst 1 h bei RT in Milchpuffer geschwenkt und damit abgesättigt. Danach erfolgte die Inkubation mit dem gegen HBcAg gerichteten ersten Antikörper bei RT. Dazu wurde die Membran mit 15 ml Milchpuffer und dem Antikörper ohne Blasen in Kunststofffolie eingeschweißt und 3 h geschwenkt. Nach Entfernen der Folie wurde die Membran dreimal für 10 min in Milchwaschpuffer geschwenkt um nichtgebundene, überschüssige Antikörper zu entfernen. Anschließend wurde die Membran mit 15 ml Milchpuffer und mit dem gegen den ersten Antikörper gerichteten zweiten Antikörper erneut eingeschweißt und 1 h bei RT inkubiert. Dann erfolgte erneut ein Waschschritt um nichtgebundene, überschüssige Antikörper zu entfernen. Wie zuvor wurde die Membran 3 x 10 min mit Milchwaschpuffer und dann zusätzlich 15 min in PBS geschwenkt. Danach wurde die Membran zum dritten Mal eingeschweißt, diesmal mit 10 ml direkt davor hergestellter ECL-Substratlösung, und 45 s von der einen und 45 s von der anderen Seite kräftig gerieben. Anschließend wurde die Kunststofffolie aufgeschnitten und die übrige ECL-Substratlösung sorgfältig entfernt.

Der fertige Blot wurde nun auf einen Röntgenfilm aufgelegt und je nach Stärke des Chemielumineszenzsignals 5 Sekunden bis 30 Minuten belassen. Nach dem Entwickeln des Röntgenfilms waren Banden an den Stellen geschwärzt, an denen der POD-Antikörper an die Membran gebunden hatte.

2.2.3.1 Mit Kaninchen-anti-HBc

Als erster Antikörper im immunologischen HBcAg-Nachweis wurde zum einen der polyklonale anti-HBV-Core-AK aus Kaninchen in einer Verdünnung von 1 zu 5.000 eingesetzt, dazu passend dann als zweiter Antikörper ein POD konjugierter Esel-Anti-Kaninchen-Ak ebenfalls in einer Verdünnung von 1 zu 5.000.

2.2.3.2 Mit dem mAb3105

Die Alternative zum Kaninchen-anti-HBc war der mAb3105 aus der Maus. Dieser wurde als erster Antikörper im immunologischen HBcAg-Nachweis in einer Verdünnung von 1 zu 1.000 eingesetzt. Als zweiter Antikörper diente dann ein POD konjugierter Esel-Anti-Maus-Ak in einer Verdünnung von 1 zu 5.000.

2.2.4 Radioaktive Markierung von in *E. coli*-exprimierten Capsiden

Zum sensitiven Nachweis einer Antigen-Antikörper-Bindung zwischen *E. coli*-exprimierten Capsiden (rHBc) und anti-HBc wurden die Capside radioaktiv markiert. Dies geschah durch eine *in vitro*-Phosphorylierung durch eine zugegebene Proteinkinase C mit [γ ^{32}P] ATP (Kann and Gerlich 1994). Dabei werden Serinreste im carboxyterminalen Bereich der Capside phosphoryliert. Die Zugabe der PKC war notwendig, weil es sich bei den verwendeten Capsiden um *E. coli*-exprimierte Capside handelte und *E. coli* keine Proteinkinase exprimiert.

Ziel der radioaktiven *in vitro*-Phosphorylierung in dieser Arbeit war es möglichst radioaktive (d.h. hohe spezifische Aktivität) und damit gut detektierbare Capside zu bekommen.

Für die *in vitro*-Phosphorylierung mussten zunächst die Capside für die PKC zugänglich gemacht werden. Dies geschah durch reversible Öffnung der Capsidstruktur, indem man 5 µl einer zuvor bei -20°C gelagerten Capsidlösung (50 % Glycin / 1x PBS-Gemisch mit Capsid in einer Konzentration von 3,25 µg/µl, also insgesamt ca. 15 µg Capsid) 15 min bei 42°C in 40 µl Reinstwasser inkubierte. Die Inkubation fand also in einem hypoosmotischen Milieu statt.

Danach wurden 1 µl PKC (47,6 U/ml), 10x PKC-Puffer (ad 1x), 2 µl Phosphatidylserin (10 ng/µl) und 5 µl [γ^{32}P] ATP (50 µCi) hinzugegeben. Anschließend wurde das Gemisch bei 37°C inkubiert. Nach 10 min wurde noch 1 µl nichtradioaktives ATP (10 mM) hinzugegeben um weitere 10 min bei 37°C verbleibende Phosphorylierungsstellen zu phosphorylieren.

Die Reassemblierung der Partikelstruktur wurde durch Erhöhen der Salzkonzentration mit 10x PBS (ad 1x) über Nacht bei 4°C erreicht. Die Lagerung der radioaktiven phosphorylierten Capside erfolgte nach Zugabe von BSA bei -20°C.

2.2.4.1 Bestimmung der Einbaurate und der spezifischen Aktivität

Um zu bestimmen wie viel radioaktives Phosphat in die Capside eingebaut worden war, wurden jeweils 2 µl markierte Capside in einer 1 zu 20 Verdünnung auf 6 Stücke Glasfaserfilter aufgetragen. Nachdem die Proben eingetrocknet waren, wurden 3 Stücke zweimal 10 min in 10 %iger TCA-Lösung und anschließend zweimal 5 min 5 %iger TCA-Lösung bei RT geschwenkt um nicht an Capsid gebundenes, freies ATP zu entfernen.

Die Stücke wurden dann flach auf den Boden der Szintillationsgefäße gelegt und mit 2 ml Szintillationsflüssigkeit bedeckt. Das Auszählen der Szintillationen, der sog. counts, die den radioaktiven Zerfällen unter Aussendung von β-Strahlen entsprechen erfolgte in einem Szintillationszähler.
Das Verhältnis der Anzahl der Zerfälle pro Minute (Einheit: counts pro min = cpm) von ungereinigtem zu mit TCA gereinigtem Glasfaserfilter entspricht dem Anteil des ^{32}P, der tatsächlich in die Capside eingebaut wurde und deshalb bei der Behandlung mit TCA nicht weggespült wurde, der sog. Einbaurate. Da die Menge des aufgetragenen Capsids bekannt war, ließ sich auch die spezifische Aktivität (Zerfälle pro Zeit und Menge (in Nanogramm) = cpm/ng) berechnen.

2.2.4.2 Nachweis radioaktiver Banden im Gel und Auswertung

Zum Nachweis der radioaktiven Banden wurde das entsprechende getrocknete Agarose-Gel bzw. SDS-PAG mit einem gelöschten Radioscreen in eine Kassette unter eine Bleiplatte (zum Abschirmen natürlicher Strahlung) gelegt und je nach Aktivität des Gels Stunden bzw. Tage belassen.
Anschließend wurde der Screen mit dem Phosphoimager (Typhoon 9200) ausgelesen und mit den Programmen „ImageQuant 5.2“ (Molecular Dynamics) und „Excel“ (Microsoft) ausgewertet. Dabei wurden die Banden und gleichgroße Felder als Hintergrund mit ImageQuant eingekästelt und dann die Signalstärke im jeweiligen Kästchen bestimmt. Mit Excel wurde ein durchschnittlicher Hintergrund berechnet und von der Bandenintensität abgezogen.

2.2.5 Anti-HBc-Test durch Immunpräzipitation (IP) von radioaktiv markiertem Capsid

Zum möglichst sensitiven Nachweis von anti-HBc im Serum wurde ein anti-HBc-Test durch Immunpräzipitation von radioaktiv markiertem Capsid entwickelt.
Dafür wurden 50 µl Serum und 50 µl PBS in einem Einwegreaktionsgefäß über Nacht bei 4℃ auf dem Schüttler mit 10 µl mit Protein G-b emantelten biomagnetischen Kügelchen (beads) inkubiert, um die im Serum enthaltenen Antikörper über ihren Fc-Teil zu binden. Anschließend wurden die beads gewaschen, indem beim Abpipettieren des Überstands die beads durch magnetische Anziehung an der Wand des Reaktionsgefäßes verblieben und die beads mit Waschflüssigkeit resuspendiert wurden. Gewaschen wurde zweimal mit 200 µl PBS / 0,1 % (v/v) NP-40 und einmal

mit 200 µl PBS. Dazwischen wurde einmal das Reaktionsgefäß gewechselt. Zu den erneut mit 200 µl PBS resuspendierten beads wurden 100 ng radioaktiv-markierte (^{32}P) Capside mit einer spezifischen Aktivität von mindestens 50 cpm/ng gegeben. Es folgte eine zweite Inkubation über Nacht bei 4℃ auf dem Schüttler. Danach wurden die beads dreimal mit 200 µl PBS / 0,1 % (v/v) NP-40 und einmal mit 200 µl PBS gewaschen. Zwischen den Waschschritten wurden zweimal die Reaktionsgefäße gewechselt, um alles Capsid, das nicht durch die Antikörper an die beads gebunden war, zu entfernen. Die beads wurden in 10 µl PBS resuspendiert, mit Probenpuffer und DTT versetzt, für 10 min bei 96℃ erhitzt und damit das radioaktive Capsid in der Probe von den beads gelöst. Die Auftrennung erfolgte durch SDS-PAGE. Die radioaktiven Banden im getrockneten Gel wurden durch Phosphoimaging nachgewiesen und mit ImageQuant und Excel quantifiziert (siehe oben).

Analog zur Immunpräzipitation von radioaktiv-markiertem Capsid mit an Protein G-beads gebundenem anti-HBc aus humanem Serum erfolgte auch die Immunpräzipitation mit Schaf-Anti-Kaninchen-AK bemantelten beads und Kaninchen-Anti-HBV-Core-AK bzw. Schaf-Anti-Maus-AK bemantelten beads und mAb3105.

2.2.5.1 Kompetition mit nicht-markiertem Capsid

Um die Spezifität der Bindung der radioaktiv-markierten Capside zu überprüfen wurden Kompetitionen mit nicht-markiertem Capsid im Überschuss durchgeführt. Dazu wurde nach der ersten Inkubation mit dem Binden der Antikörper an die beads ein zusätzlicher 12 stündiger Inkubationsschritt mit 1,5 µg nicht-markiertem Capsid bei 4℃ auf dem Schüttler zwischengeschaltet, um die gebundenen anti-HBc-Antikörper abzusättigen.

2.2.6 Mikropartikel-Enzym-Immunoassay (MEIA)

Zur Evaluation der Sensitivität des oben beschriebenen Anti-HBc-Tests mittels Immunpräzipitation radioaktiv markierter Capside wurde ein kommerziell erhältlicher Anti-HBc-Test, der AxSymCORE der Firma Abbott, verwendet. Es handelte sich dabei um einen Mikropartikel-Enzym-Immunoassay (MEIA), der nach Befüllen des Analyse-Automaten mit der entsprechenden Reaktionsflüssigkeit, die im Kit mitgelieferten Positiv- und Negativkontrollen zur Eichung und anschließend automatisch die Serumproben testet.

Der Aufbau des Testes besteht aus folgenden Schritten: Zunächst wurden die im Serum enthaltenen anti-HBc-Antikörper an mit HBcAg beschichtete Latex-Mikropartikel gebunden. Die verbleibenden freien Bindungsstellen wurden mit Anti-HBc-Alkalische-Phosphatase-Konjugaten abgesättigt. Die gebundenen Konjugate wurden dann durch die Bildung des fluoreszierenden Methylumbelliferon aus zugegebenem Methylumbelliferyl-Phosphat durch die Alkalische Phosphatase nachgewiesen.
Bei diesem Verfahren kommt es zu einer Kompetition der im Serum enthaltenen Antikörper und der Test-Antikörper und damit evtl. zu einem Verlust weniger avider Antikörper aus dem Serum und zu falsch negativen Ergebnissen.

2.2.7 Herstellung von eHBc und iHBc

Um extra- und intrazelluläre Capside aus eukaryonter Zellkultur herzustellen wurden Hep.G2.2.15 Zellen in Kultur genommen, vermehrt und die Capside aus den Zellen (iHBc) bzw. aus dem Zellüberstand (eHBc) aufgereinigt.

2.2.7.1 Eukaryonte Zellkultur (Hep.G2.2.15)

Die Hep.G2.2.15 Zellen wurden in Flüssigstickstoff bei -175℃ gelagert. Um sie in Kultur zu nehmen, wurden sie in vorgewärmtem Medium aufgetaut und das Einfriermedium mittels Zentrifugieren (5 min bei 800 g) entfernt. Sie wurden in DMEM-Medium / 10 % FKS auf 15 cm Maxischalen bei 37℃, einem Kohlendioxidgehalt von 5 % und 90 % relativer Luftfeuchte im Brutschrank angezogen. Das Medium musste ca. alle zwei Tage gewechselt werden. Wenn der Boden der Maxischale zu 90 % mit einer konfluierenden einschichtigen Zellschicht bedeckt war, wurden die Zellen gesplittet. Dazu wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen, durch Inkubation mit 1x Trypsin-EDTA / PBS-Lösung bei 37℃ für 5 Minuten gelockert und anschließend in DM EM-Medium / 10 % FKS resuspendiert und auf zwei neue Maxischalen verteilt.

2.2.7.2 Isolierung von HBV-Core-Partikeln aus HepG2.2.15 Zellen

Hep.G2.2.15 Zellen wurden wie oben beschrieben herangezogen und dann für 4 - 5 Tage in DMEM-Medium / 1 % FKS zur Virusproduktion im Brutschrank belassen. Der Überstand wurde abgezogen (Weiterverarbeitung siehe Kapitel 2.2.7.3) und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, mit 1 ml PBS und einem Gummischaber von der

Platte abgelöst, in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt, zentrifugiert (5 min bei 200 g und 4℃) und das Zellpellet in 1 ml PBS / 0,1 % NP- 40 resuspendiert.
Die Zellen wurden dann auf Eis mit Ultraschall (sechsmal 15 s bei 70 % der maximalen Leistung) lysiert. Die Degradation der zellulären Nukleinsäuren erfolgte durch die Zugabe von 20 U/ml DNase I, 20 µg/ml RNase A und 15 mM $MgCl_2$ und die Inkubation für 15 min bei 37℃. Unlösliche zellulär e Bestandteile wurden durch Zentrifugieren (20 min bei 10.000 g und 4℃) pellet iert. Der Überstand (mit PBS / 10 % NP-40 auf eine Konzentration von 0,75 % NP-40 eingestellt) wurde in einem neuen Gefäß weiterverarbeitet. Nukleinsäurereste wurden mit 20 U/ml S7-Nuklease bei 37℃ abgebaut (ad 5 mM $CaCl_2$ zum Starten und 15 mM EDTA zum Stoppen der Reaktion nach 20 min). Die weitere Aufreinigung erfolgte durch Zentrifugieren für 10 min bei 4℃ und 18.000 g und folgender Ultrazentrif ugation des Überstandes durch ein 1 ml 25 % (w/v) Saccharose-Kissen in 0,75 % (v/v) NP-40 / PBS für 2 h bei 50.000 rpm und 10° C. Das Pellet wurde in 600 µl PB S resuspendiert und nochmal für 5 min bei 4℃ und 18.000 g zentrifugiert. Diese r letzte Überstand, die aufgereinigten iHBc, wurden ad 2 mM DTT bei -70℃ g elagert.

2.2.7.3 Isolierung von HBV-Core-Partikeln aus Zellkulturüberstand

Der Überstand von Hep.G2.2.15 Zellen wurde nach 4 - 5 Tagen auf DMEM / 1 %FKS in 50 ml Reaktionsgefäße pipettiert und zentrifugiert (10 min bei 4500 rpm und 4° C). Der Überstand wurde dann durch ein 3 ml 25 % (w/v) Sucrose / 0,75 % (v/v) NP-40 / PBS-Kissen ultrazentrifugiert (bei 28.000 rpm und 10° C für 22 h) und das Pellet in 1 ml PBS / 0,75 % NP-40 resuspendiert. Die Capside wurden anschließend durch eine einstündige Inkubation bei 37℃ von den viralen Hül lproteinen gelöst und durch erneute Ultrazentrifugation (durch ein 1 ml 25 % Sucrose (w/v) / 0,75 % NP-40 (v/v)-Kissen für 2 h bei 50.000 rpm) von diesen getrennt. Das Pellet wurde in 500 µl PBS resuspendiert und ein letztes Mal zentrifugiert (5 min bei 12.500 g und 4℃). Dieser letzte Überstand, die aufgereinigten eHBc wurden bei -70℃ gelagert. Wie von anderen gezeigt führt dieses Protokoll bei Verwendung von Viren aus Zellkultur zur Abtrennung der Hüllproteine (Kaplan et al. 1973).

3. Ergebnisse

3.1 Radioaktive Markierung von Capsiden für die Immunpräzipitation

Für den in Kapitel 2 beschriebenen Anti-HBc-Test durch Immunpräzipitation (IP) wurden radioaktive Capside (HBcAg) benötigt. Aufgrund der nötigen Mengen und Reinheit ist es dabei schwierig Capside aus Serum oder eukaryonter Zellkultur (z.B. HepG2.2.15) zu verwenden. Es wurden daher in *E. coli* exprimierte Capside verwendet.

A 10ng 5ng … 156pg **B** **C**

Abbildung 11: Darstellung von Capsiden im Western Blot

(Agarose-Gel, Kapillarblot, 1. Antikörper: anti-HBc vom Kaninchen (DAKO, Hamburg), 2. Antikörper: POD-Anti-Rabbit)

A: *E. coli* generierte Capside
B: intrazelluläre Capside aus Hep G2.2.15-Zellen aufgereinigt
C: extrazelluläre Capside aus Hep G2.2.15-Zellüberstand aufgereinigt

Wie man in der Abbildung 11 sieht, erkennt der polyklonale anti-HBc-Antikörper vom Kaninchen sowohl die in HepG2.2.15 als auch die in *E. coli* generierten Capside. Während die Capside aus der Hep G2.2.15 Zelle nur monomer sind, enthält die Präparation aus *E. coli* auch Oligomere. Die Partikel werden durch RNA-Moleküle zusammengehalten, die innerhalb mehrerer Capside verpackt sind (Rabe et al. 2009).

3.1.1 Einbaurate und spezifische Aktivität

Die radioaktive Phosphorylierung dieser *E. coli* generierten Capside wurde *in vitro* unter Zugabe von Proteinkinase C und ^{32}P markiertem ATP durchgeführt (Kann and Gerlich 1994). Dabei werden die Capside durch hypotonen Puffer geöffnet, sodass die exogen zugefügte Proteinkinase C Zugang zu den sonst im Inneren liegenden Phosphorylierungsstellen bekommt. Nach einer Reassemblierungsphase über Nacht bei 4℃ wurden die Einbaurate und die spezifische A ktivität bestimmt (siehe 2.2.4.2).

Markierte Capside wurden für den Anti-HBc-Test nur dann verwendet, wenn die Einbaurate bei mindestens einem Prozent ^{32}P lag, d.h. der Anteil des tatsächlich eingebauten am insgesamt eingesetzten ^{32}P betrug 1 %. Dies war außer in seltenen Ausnahmen bei Verwendung des unter 2.2.4.1 beschriebenen Protokolls der Fall. Die spezifische Aktivität lag dann bei ca. 400 cpm/ng und das Capsid wurde solange verwendet bis die spezifische Aktivität auf 50 cpm/ng abgeklungen war, also ca. 3 Halbwertszeiten lang.

3.1.2 Darstellung der radioaktiven Capside

Zur Verifizierung der radioaktiven Markierung der Capside erfolgte eine Darstellung der radioaktiven Untereinheiten in der SDS-PAGE und - um die Reassemblierung der Untereinheiten zu überprüfen - erfolgte weiterhin der Nachweis der reassemblierten radioaktiven Capside im Agarose-Gel unter nativen Bedingungen.

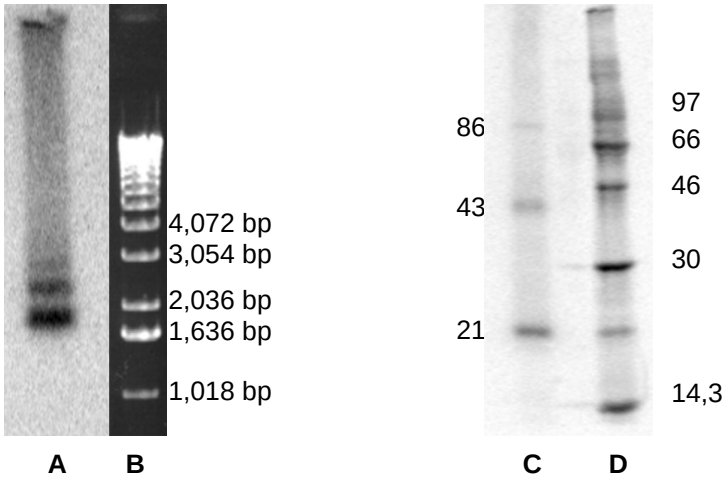


Abbildung 12: Nachweis von radioaktiv markierten Capsiden bzw. Capsiduntereinheiten

Phosphoimager Scan
A: Capsid im Agarose-Gel mit **B:** DNA-Marker (Ethidiumbromid unter UV-Licht)
C: Capsiduntereinheiten im SDS-PAGE mit **D:** C14-Marker (jeweils Angabe in kDa)

Im Phosphoimager Scan des SDS-PAGE sah man in der Höhe von 21,5 kDa die Monomer-Bande und falls die Bedingungen nicht vollständig denaturierend waren bei 43 kDa die Dimer-Bande, bei 86 kDa die Bande höherer Assemblierungsformen.
Wenn eine Reassemblierung stattgefunden hatte, erkannte man im Agarose-Gel die typische Leiterstruktur, die man durch die unterschiedlichen Laufhöhen von

einzelnen bzw. zusammengelagerten Capsiden erhält (zwei Capside oder mehr, die durch RNA zusammengehalten werden).

3.2 Nachweis von anti-HBc-Antikörpern mit einem radioaktiven Assay

Nach dem radioaktiven Markieren von Capsiden konnte der Nachweis von anti-HBc-Antikörpern durch Immunpräzipitation (IP), wie in Kapitel 2.2.5 beschrieben, durchgeführt werden.

Wie man in Abbildung 13 sieht, blieb das über die polyklonalen Antikörper aus humanem Serum (Spur 2) oder Kaninchen-Serum (Spur 3), bzw. über den monoklonalen Antikörper mAb 3105 (Spur 4) gebundene Capsid beim Waschen an den entsprechenden biomagnetischen Kügelchen, „Dynabeads“. Es ließ sich nach Denaturierung mit SDS via Radioscreen in der typischen Höhe (21,5 kDa) im SDS-PAG nachweisen.

Wurde in der ersten Inkubation statt Serum nur PBS hinzugefügt, erschien keine Bande (Spur 1).

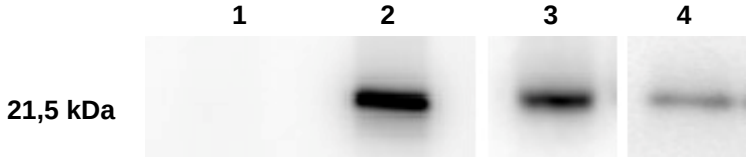


Abbildung 13: Anti-HBc-Nachweis durch Immunpräzipitation

1: Protein G-Dynabeads (binden humanes IgG) + PBS + radioaktiv markiertes Capsid
2: Protein G-Dynabeads + humanes anti-HBc-positives Serum (T1) + radioaktiv markiertes Capsid
3: Schaf-Anti-Maus-AK-Dynabeads (binden Mausantikörper) + mAb 3105 (monoklonaler Ak von der Maus)+ radioaktiv markiertes Capsid
4: Schaf-Anti-Kaninchen-AK-Dynabeads (binden Kaninchenantikörper) + Kaninchen-Anti-HBV-Core-AK + radioaktiv markiertes Capsid

Phosphoimager Scan von getrocknetem SDS-PAG

3.2.1 Angabe des Testergebnisses

Da bei einer Angabe des Testergebnisses in „volume“ (Intensität des Signals ausgemessen im Programm ImageQuant (Molecular Dynamics)) zur Vergleichbarkeit der Werte eine immer genau gleiche spezifische Aktivität des eingesetzten Capsids erforderlich wäre, was quasi unmöglich ist (schwankende Phosphorylierungsrate und Abklingen der Radioaktivität), wurde entschieden bei jedem Test einen „Standard“ mitzutesten. Dieser wurde als 100 Prozent gesetzt und das Ergebnis des zu testenden Serums wurde als Prozent dieses Standards angegeben.

P1, ein hochpositives Serum von dem auch große Mengen vorrätig waren, wurde für die Versuche dieser Arbeit als Standard ausgewählt.
Wertet man Abbildung 14 aus, wird Bande 2, P1 als Standard, gleich 100 % gesetzt. Das reine Capsid (Bande 1) hätte dann einen Wert von 119 %, die Spur ohne Serum nur mit beads und Capsid ein Ergebnis von 0,5 %.

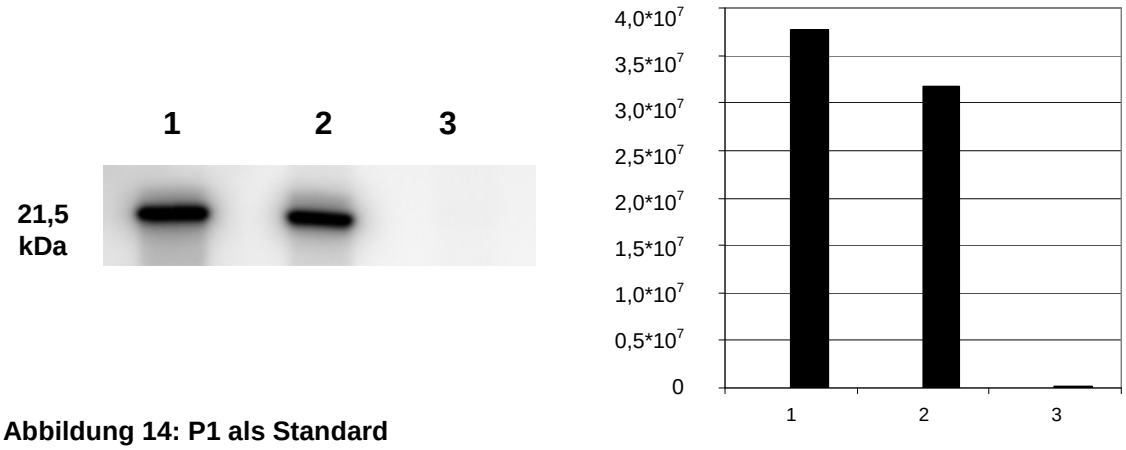


Abbildung 14: P1 als Standard

1: Capsid =119 %
2: Protein G-Dynabeads (10 µl) + P1 (50 µl) + Capsid =100 %
3: Protein G-Dynabeads (10 µl) + Capsid (kein Serum, nur PBS) =0,5 %

Anti-HBc-Nachweis durch IP mit Protein G-Dynabeads + radioaktiv markiertem Capsid:
- Phosphoimager Scan von getrocknetem SDS-PAG
- Auswertung berechnet mit ImageQuant (Molecular Dynamics) und Excel (Microsoft).

3.2.2 Optitimierung der Testbedingungen

Zunächst wurden die Testbedingungen optimiert und festgelegt.

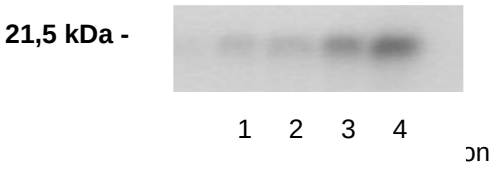
3.2.2.1 Menge der eingesetzten biomagnetischen beads

Es wurde eine möglichlichst geringe Menge Dynabeads gewählt, um die unspezifische Bindung von Capsiden an die bead Oberfläche zu minimieren. Allerdings waren mindestens 10 µl beads erforderlich, um die Waschschritte exakt genug durchführen zu können.
10 µl beads sind nach Herstellerangaben in der Lage 2,5 – 3 µg humanes IgG zu binden.

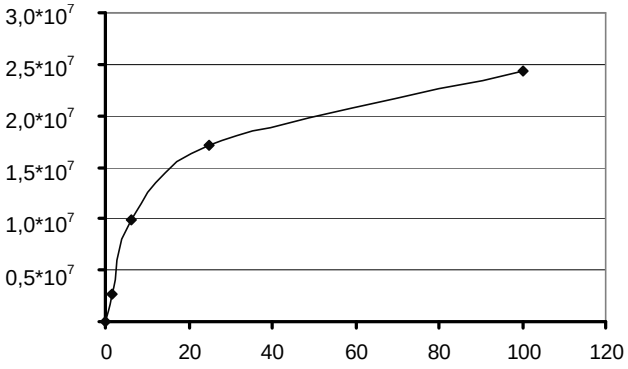
3.2.2.2 Eingesetztes Serumvolumen

Es ergab sich ein Zusammenhang zwischen Höhe des Testergebnisses und eingesetzter Serummenge. Ein Kompromiss zwischen optimalem Nachweis auch kleinster anti-HBc-Mengen und dem Verbrauch seltener trotz HBV-Infektion anti-HBc negativer Seren war notwendig. Da sich bei 10 µl beads und 12 h Inkubationzeit nur noch eine geringe Zunahme zwischen 25 µl und 100 µl Serum zeigte, wurde ein Volumen von 50 µl für alle folgenden Tests festgelegt.

Abbildung 15:Unterschiedliches Serumvolumen



1: 1,25 µl **2:** 6,25 µl **3:** 25 µl **4:** 100 µl
Anti-HBc-Nachweis durch IP mit Protein G-Dynabeads + radioaktiv markiertem Capsid, Phosphoimager Scan von getrocknetem SDS-PAG



x – Achse: unterschiedliche Serummengen (in µl)

y – Achse: Menge an präzipitiertem Capsid

Auswertung berechnet mit ImageQuant (Molecular Dynamics) und Excel (Microsoft)

3.2.2.3 Zeitdauer der Inkubation

In der technischen Information zu den biomagnetischen beads wird eine Inkubationsdauer von 30 min empfohlen. Zur Überprüfung, ob durch die Verlängerung des ersten Inkubationschrittes die Antikörperbindung an das Protein G noch gesteigert werden kann, wurden unterschiedliche Inkubationslängen (30min. 1h, 4h und 12h (über Nacht)) gewählt und dann die Reaktion durch Waschen gestoppt.

Da die Inkubation über Nacht das höchste Ergebnis – nahe der Sättigung - erzielte, wurden die Inkubationen immer über Nacht durchgeführt.

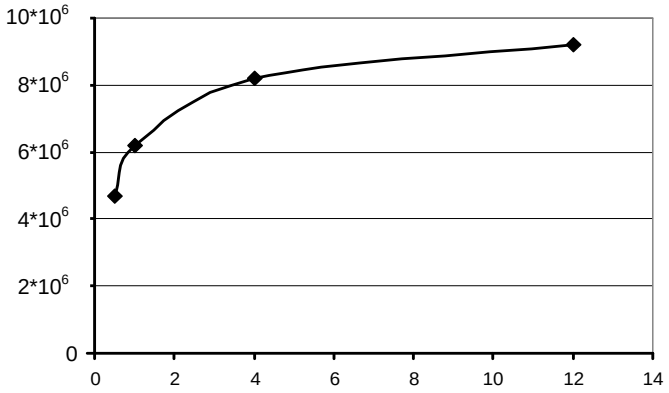


Abbildung 16: Vergleich unterschiedlicher Inkubationszeiten

x – Achse: unterschiedliche Inkubationszeiten (30 min / 1 h / 4 h bzw. 12 h (über Nacht))
y – Achse: Menge an präzipitiertem Capsid

Anti-HBc-Nachweis durch IP mit Protein G-Dynabeads + radioaktiv markiertem Capsid, Phosphoimager Scan von getrocknetem SDS-PAG, Auswertung berechnet mit ImageQuant und Excel

3.2.3 Reproduzierbarkeit

Um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu beurteilen wurde sowohl die Reproduzierbarkeit der Immunpräzipitation als auch die Reproduzierbarkeit der ^{32}P - Quantifikation mit ImageQuant und Excel getestet.

3.2.3.1 Reproduzierbarkeit der Immunpräzipitation

Aliquots von P1 unverdünnt und einer 1:2.700 Verdünnung wurden mehrfach getestet und die Ergebnisse wurden verglichen.

Die entstehende Abweichung der Messwerte beruhte auf dem Pipettierfehler und dem Auswertungsfehler - d.h. der Bestimmung der Radioaktivität auf dem Screen – und entsprach damit einer Normalverteilung. Deshalb konnten Mittelwert, Standardabweichung und das 95 % Konfidenzintervall berechnet werden.

Der Mittelwert der unverdünnten Proben wurde definitionsgemäß auf 100 % gesetzt, es kam zu einer Abweichung von bis zu 37 %. Der Mittelwert der verdünnten Proben lag bei 68,6 %, d.h. ca. 31 % unter dem Mittelwert der unverdünnten Proben (grauer Balken in Abbildung 17). Hierbei kam es zu einer Abweichung von bis zu 11 %. Die Standardabweichung lag bei 18,4 % für das unverdünnte Serum bzw. bei 13,4 % für die 1:2700 Verdünnung.

Entsprechend lag das 95 % Konfidenzintervall zwischen 63,2 % und 136,8 % für das unverdünnte Serum und zwischen 46,6 % und 90,6 % für die 1:2700 Verdünnung.

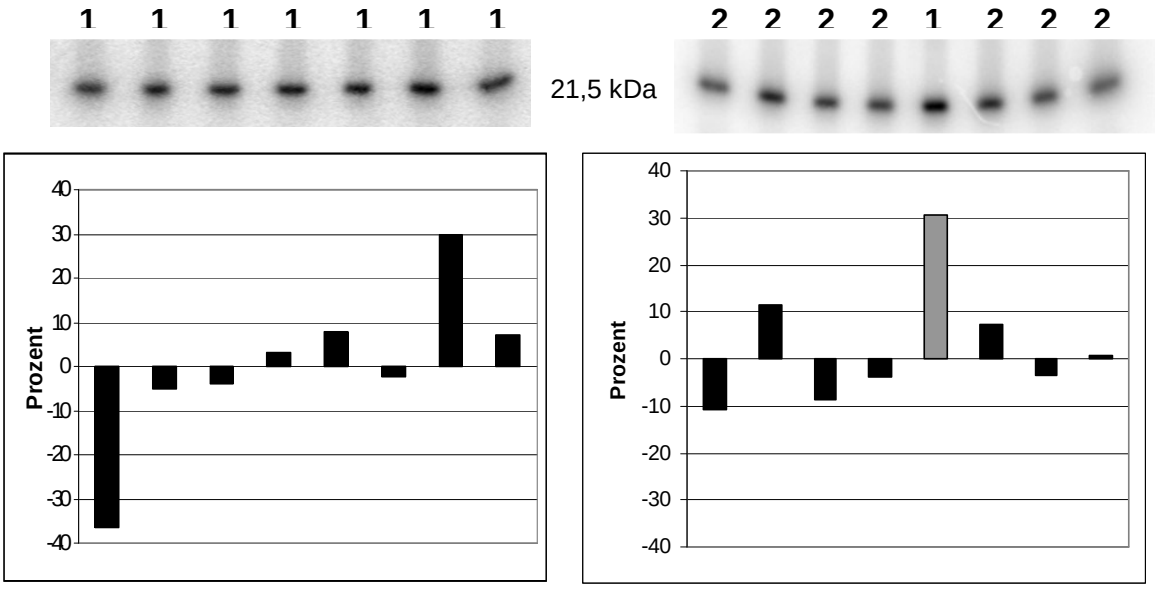


Abbildung 17: Schwankung der Ergebnisse im anti-HBc-Test um den jeweiligen Mittelwert

1: P1 unverdünnt
2: P1 1:2.700
grauer Balken: Differenz zum Mittelwert der unverdünnten Proben

Anti-HBc-Nachweis durch IP mit Protein G-Dynabeads + radioaktiv markiertem Capsid, Phosphimager Scan von getrocknetem SDS-PAG und Auswertung mit ImageQuant und Excel.

3.2.3.2 Reproduzierbarkeit der ^{32}P-Quantifikation mit ImageQuant und Excel

Um den Einfluss des Auswertungsfehlers zu bestimmen wurden Banden unterschiedlicher Stärke zehnmal ausgemessen und die Ergebnisse verglichen.
Bestimmt wurden der durchschnittliche Hintergrund, P1 als starke Bande, P1 in einer 1:900-Verdünnung als mittelstarke Bande und P1 in einer 1:24.300-Verdünnung als Beispiel für eine schwache Bande. Anschließend wurde wie oben beschrieben der Mittelwert von P1 gleich 100 Prozent gesetzt und die einzelnen Ergebnisse von P1 und den beiden Verdünnungsstufen in Prozent angegeben.

	Fläche	Hintergrund	P1		P1 1:900		P1 1:24.300	
			Volume	Prozent	Volume	Prozent	Volume	Prozent
1.	864	23.703	6.184.231	102,87	3.556.814	57,51	330.701	5,35
2.	816	9.175	6.167.343	102,59	3.551.772	57,59	341.258	5,53
3.	580	8.862	5.697.996	94,78	3.346.948	58,73	302.729	5,31
4.	828	12.109	6.138.067	102,10	3.548.781	57,81	338.298	5,51
5.	850	11.759	6.226.295	103,57	3.584.529	57,57	338.836	5,44
6.	690	10.934	5.954.155	99,04	3.439.287	57,76	321.806	5,40
7.	651	10.677	5.844.884	97,22	3.433.068	58,74	307.522	5,26
8.	792	19.260	6.105.345	101,56	3.528.713	57,80	321.531	5,27
9.	805	8.869	6.097.348	101,42	3.538.172	58,03	335.296	5,50
10.	589	5.188	5.701.534	94,84	3.354.400	58,83	301.777	5,29
Mittelwert	747	12.054	6.011.720	100,00	3.488.248	58,02	323.975	5,39

Tabelle 2: 10 Ausmessung und Auswertung derselben Banden mit ImageQuant und Excel

P1: starke Bande
P1 1:900: mittelstarke Bande
P1 1:24.300: schwache Bande

Die Standardabweichung lag bei der schwachen Bande bei 0,10 %, bei der mittelstarken Bande bei 0,53 % und bei der starken Bande bei 3,32 %.

3.2.4 Spezifität

Um die Spezifität der Immunpräzipitation zu prüfen wurden Präzipitationen mit strukturell modifiziertem Capsid und Kompetitionen mit unmarkiertem Capsid im Überschuss durchgeführt, außerdem wurden 32 anti-HBc negative Seren getestet.

3.2.4.1 Präzipitationen mit strukturell modifizierten Capsiden

Zunächst wurden verschiedene Methoden ausprobiert um das Capsid leicht zu verändern, seine charakteristische Antigenität zu zerstören, ohne es komplett zu zerstören. Bei den zunächst versuchten Methoden kam es zu einer Komplexbildung, dass denaturierte Capsid blieb komplett in den Taschen der nativen AGE hängen (Abbildung 18).

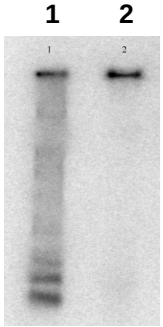
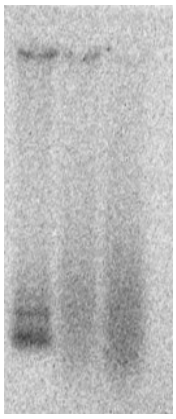


Abbildung 18: Komplexbildung bei Denaturierung

1: Capsid
2: denaturiertes Capsid
(10min bei 37℃ mit 1 M DTT und 12,5 % TFA)

Phosphoimager Scan von getrocknetem Agarose-Gel

Die Behandlung des Capsids mit 0,1 % β-ME, 0,1 % SDS und moderater Erwärmung auf 42℃ bzw. 56℃ für 10 min erzeugte hingegen ein heterogenes Wanderungsverhalten des Capsids in der AGE (Schmierbildung), ohne dass es zur kompletten Denaturierung oder Aggregatbildung kam (Abbildung 19).



A B C

Abbildung 19: AGE nach Behandlung des Capsids mit 0,1 % β-ME und 0,1 % SDS

A: normales Capsid
B: bei 42℃
C: bei 56℃

Phosphoimager Scan von getrocknetem Agarose-Gel

Dieses strukturell modifizierte Capsid wurde nun als Antigen in die IP eingesetzt. Es zeigte sich eine unspezifische Bindung, die sich auch durch BSA oder FKS nicht inhibieren ließ. Bei dem unveränderten Capsid kam es hingegen zu keiner unspezifischen Bindung.

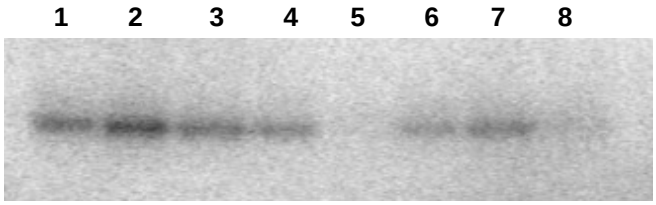


Abbildung 20: Strukturell modifiziertes Capsid im anti-HBc-IP-Test

IP mit Protein G-Dynabeads, Phosphoimager Scan von getrocknetem SDS-PAGE

1-4: anti-HBc positives Serum (P1)
1-3: Test mit verändertem Capsid
2: mit BSA
3: mit FKS
4: Test mit unverändertem Capsid

5-8: anti-HBc negatives Serum
5: Test mit unverändertem Capsid
6-8: Test mit verändertem Capsid
7: mit BSA
8: mit FKS

3.2.4.2 Kompetition durch unmarkierte Capside

Abbildung 21 zeigt die Kompetition durch unmarkiertes Capsid nach der in Kapitel 2.2.5.1 beschriebenen Methode, Abbildung 22 die Auswertung des Phosphoimager Scans mit ImageQuant und Excel. Es zeigte sich eine Abnahme der Signalstärke durch Verdünnung und Inhibition. Bei abnehmender anti-HBc-Menge nahm die

relative Inhibition (Verdünnungsreihe mit Kompetition bezogen auf die Verdünnungsreihe ohne Kompetition) zu.

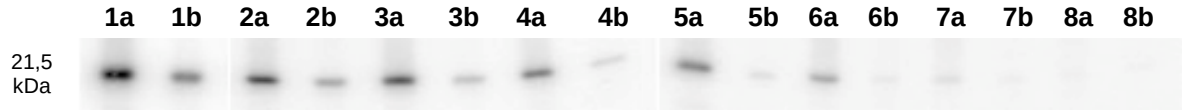


Abbildung 21: Kompetition der Verdünnungsreihe von T1 mit nicht-markiertem Capsid

a: nur P32-phosphoryliertes Capsid
b: mit nicht-radioaktiv markiertem Capsid im Überschuß zur Kompetition
(1,5 µg im Vergleich zu 100 ng radioaktivem Capsid)
1: unverdünnt **2:** 1:100 **3:** 1:300 **4:** 1:900 **5:** 1:2.700 **6:** 1:8.100
7: 1:24.300 **8:** 1:72.900
Anti-HBc-Nachweis durch IP mit Protein G-Dynabeads + radioaktiv markiertem Capsid, Phosphoimager Scan von getrocknetem SDS-PAGE

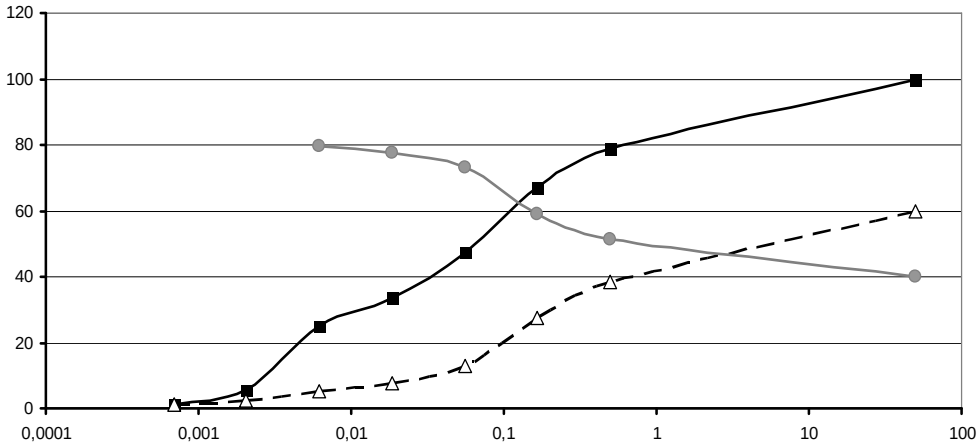


Abbildung 22: Auswertung der Gele in Abbildung 21 mit ImageQuant und Excel:

x-Achse: Serumvolumen (in µl ensprechend: 1:72.900 / 1:24.300 / 1:8.100 / 1:2.700 / 1:900 / 1:300 / 1:100 / unverdünnt
y-Achse: Präzipitiertes Capsid in Prozent vom Standard

Durchgezogener Graph mit gefüllten Quadraten: Verdünnungsreihe ohne Kompetion
Gestrichelter Graph mit leeren Dreiecken: Verdünnungsreihe mit Kompetition
Grauer Graph mit gefüllten Kreisen: Relative Inhibition (Verdünnungsreihe mit Kompetition bezogen auf die Verdünnungsreihe ohne Kompetition

3.2.4.3 Test von anti-HBc negativen Seren

Zum Nachweis der Spezifität des Testes wurden außerdem 32 Seren (N1 bis N32) getestet. Diese Seren stammten von Blutspendern, die negativ auf HBsAg, negativ auf anti-HBc (Microparticle-Enzyme-ImmunAssay (MEIA) AxSymCORE, Abbott am Institut für Medizinische Virologie, Gießen) und gepoolt negativ für HBV-DNA (HBV-

PCR (Ampliscreen, Roche) in der Blutbank, Universitätsklinik, Giessen) getestet wurden.

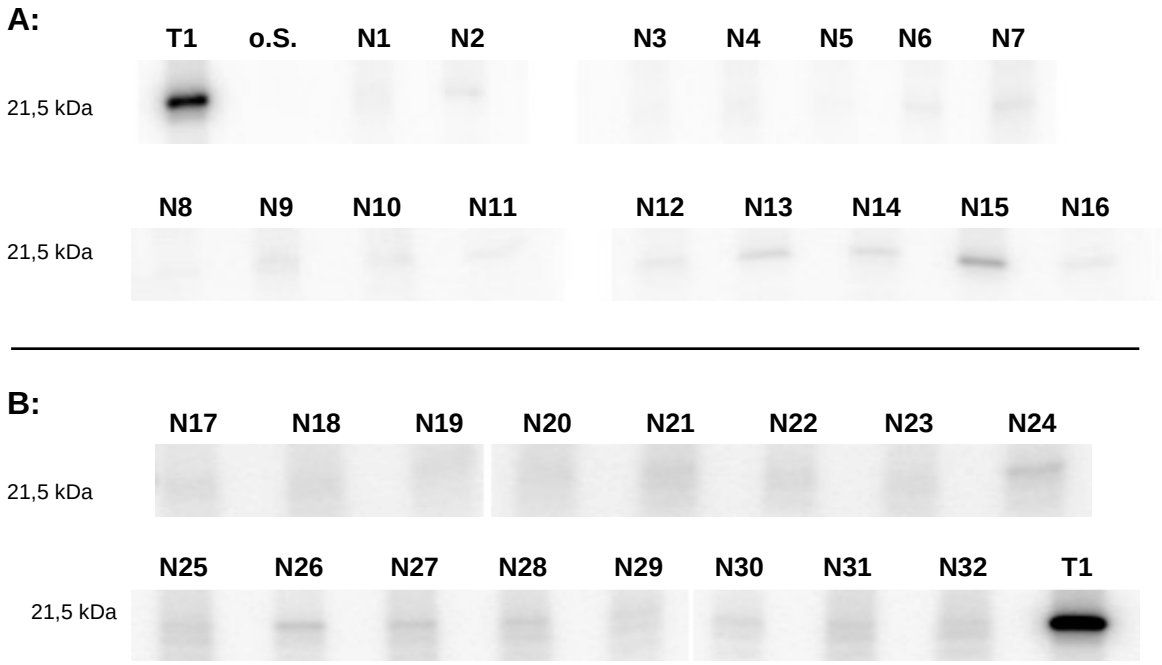


Abbildung 23: Anti-HBc negative Seren (N1-N32) in der IP

A: N1 – N16
B: N17 – N32
T1 jeweils als Standard, **o.S.**: Ohne Serum, nur PBS in der Probe

Anti-HBc-Nachweis durch IP mit Protein G-Dynabeads + radioaktiv makiertem Capsid, Phosphoimager Scan von getrocknetem SDS-PAG

Dabei fiel ein Serum (N15, siehe Abbildung 23) als abweichend auf. Eine unspezifisch-positive Reaktion wurde vermutet und eine Kompetition zu deren Ausschluss durchgeführt (Abbildung 24).

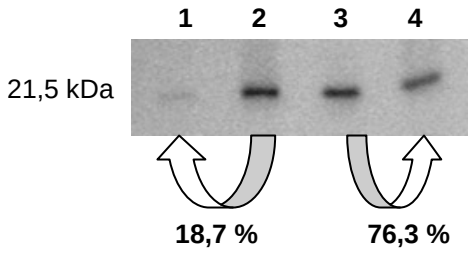


Abbildung 24: Kompetition von N15 im anti-HBc-Test

1: P1(1:10.000) mit Kompetition
2: P1(1:10.000) ohne Kompetition
3: N15 ohne Kompetition
4: N15 mit Kompetition

Anti-HBc-Nachweis durch IP mit Protein G-Dynabeads + radioaktiv markiertem Capsid, Phosphoimager Scan von getrocknetem SDS-PAG, Auswertung mit ImageQuant und Excel

In diesem Fall war die Bindung von radioaktiv markiertem Capsid nur geringfügig durch unmarkiertes Capsid im Überschuss kompetierbar.

Es blieben noch 76,3 % Prozent vom ursprünglichen Testergebnis erhalten, die relative Inhibition lag bei 23,7 %. Der Vergleich mit einer relativen Inhibition von 81,3

% bei T1 (1:10.000) ergab, dass die Bindung wahrscheinlich unspezifisch war. Das Testergebnis von N15 wurde daher bei der Festsetzung der Beurteilungskriterien nicht verwendet.

Nach dem Ausschluss des Serum N15 wurden der Mittelwert (1,82 %) und die Standardabweichung (1,07 %) errechnet.

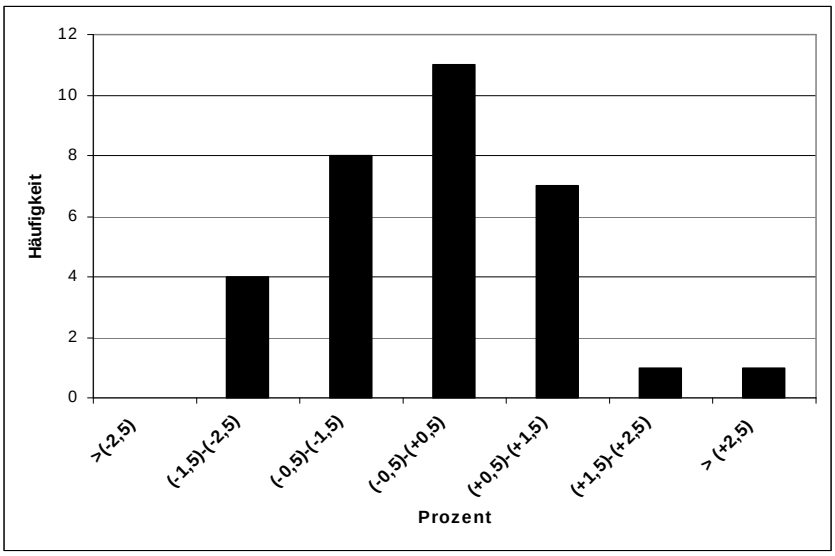


Abbildung 25: Verteilung der Testergebnisse N1-N32 (ohne N15) um ihren Mittelwert

x-Achse: Abweichung der Testergebnisse vom Mittelwert - eingeteilt in Rubriken mit einem Bereich von einem Prozent
y-Achse: Anzahl der Seren in den einzelnen Rubriken

Über die Standardabweichung wurden die Beurteilungskriterien festgelegt. Dabei gelten Ergebnisse unter zwei Standardabweichungen als negativ, über drei Standardabweichungen als positiv und Ergebnisse dazwischen als grenzwertig:

negativ	grenzwertig	positiv
< X + 2SD		> X + 3SD
< 4,0 %	4,0 % - 5,0 %	> 5,0 %

3.2.5 Sensitivität

Die Sensitivität der Immunpräzipitation (IP) wurde geprüft, indem neun anti-HBc positive Seren in Verdünnungsreihen getestet und mit den Ergebnissen im MEIA (AxSymCORE von Abbott im Institut für Medizinische Virologie bzw. im Zentrallabor, beide Universitätsklinikum Giessen) verglichen wurden. Dazu wurden Seren mit unterschiedlicher Serologie ausgewählt: Ein Serum stammte von der ersten anti-HBc positiven Blutprobe eines akut infizierten Patienten (**P4**, Abbildung 26). Drei Seren

stammten von Patienten mit chronisch-aktiver Hepatitis B (**P1 - P3**, Abbildung 27), d.h. sie waren HBsAg und HBeAg positiv, anti-HBs und anti-HBe negativ. Drei Seren stammten auch von Patienten mit chronischer Hepatitis, aber negativem HBeAg und positivem anti-HBe (**P5 - P7**, Abbildung 28). Zwei Seren stammten von Patienten mit einer ausgeheilten HBV-Infektion (**P8 - P9**, Abbildung 29), d.h. HBsAg war negativ und anti-HBs positiv. Eine Auflistung der zu diesen Seren erhobenen Daten findet sich im Anhang.

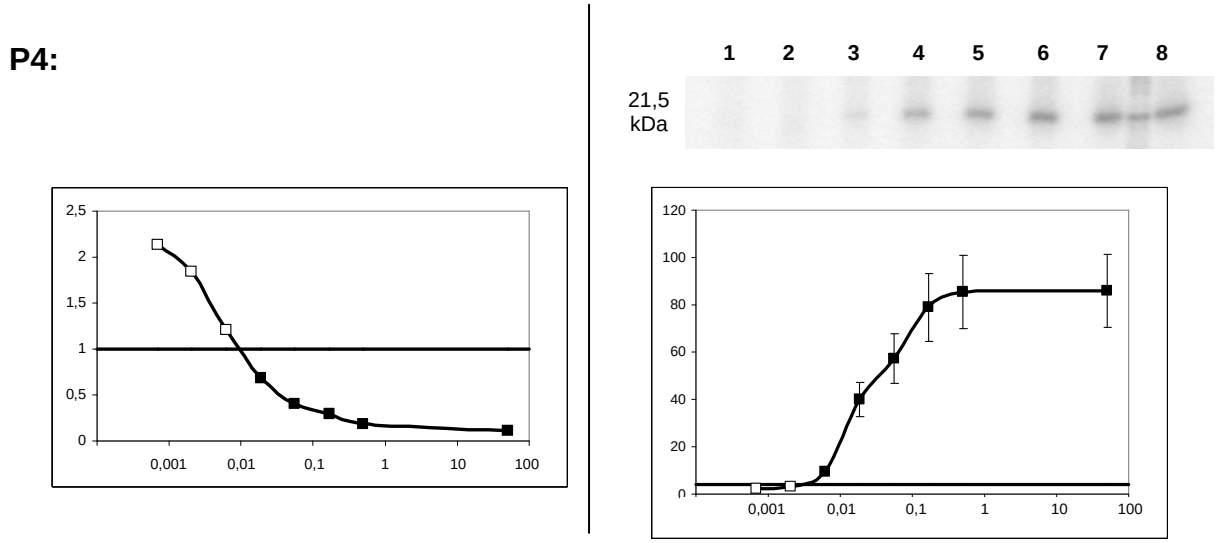


Abbildung 26: Verdünnungsreihe der ersten anti-HBc positiven Blutprobe eines akut infizierten Patienten (P4)

Gefüllte Quadrate: positiv gemessene Verdünnungsschritte
Leere Quadrate: negativ gemessene Verdünnungsschritte

Linke Spalte: Ergebnisse aus dem MEIA (AxSymCORE von Abbott)
x-Achse: Serumvolumen (in µl)
y-Achse: Ergebnisse MEIA (S/CO)
Horizontale Linie: Cut Off im MEIA (S/CO > 1 = anti-HBc negativ)

Rechte Spalte:
- Immunpräzipitation (IP) mit Protein G-Dynabeads + radioaktivem Capsid,
Phosphoimager Scan von getrocknetem SDS-PAG
1: unverdünnt (= 50 µl), **2:** 1:100 (= 0,5 µl), **3:** 1:300 (=0,1667 µl), **4:** 1:900 (=0,0556 µl), **5:** 1:2.700 (=0,0185 µl), **6:** 1:8.100 (=0,0062 µl), **7:** 1:24.300 (=0,0021 µl), **8:** 1:72.900 (=0,0007 µl)
- Auswertung
x-Achse: Serumvolumen (in µl)
y-Achse: Ergebnisse IP gemessen und berechnet durch ImageQuant und Excel (in Prozent vom Standard)
Horizontale Linie: Cut Off in der IP (Ergebniss < 4,0 % = anti-HBc negativ)
Fehlerbalken: eine Standardabweichung (18 %)

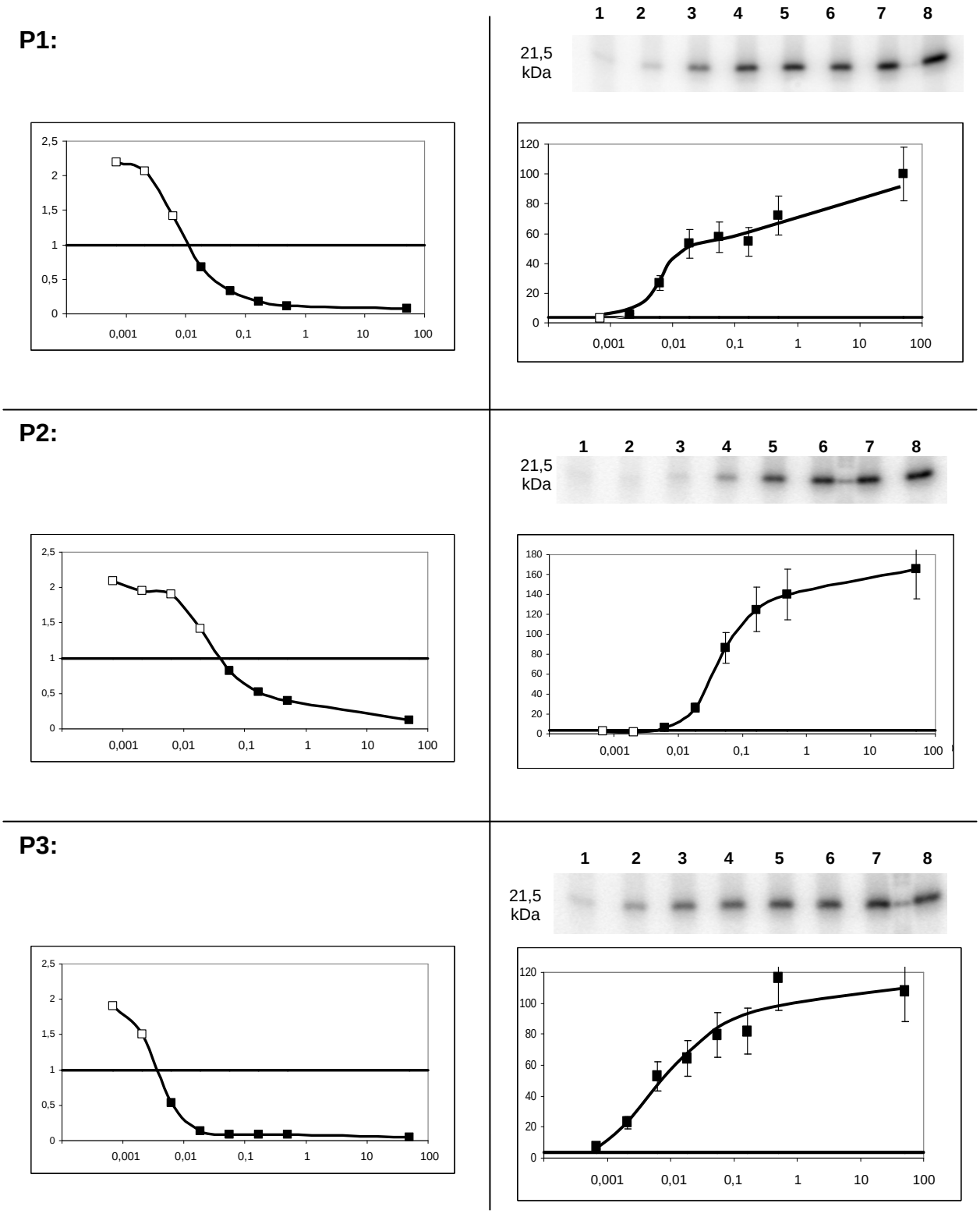


Abbildung 27: Verdünnungsreihen anti-HBc positiver Seren von Patienten mit HbeAg positiver chronischer Hepatitis B (P1 - P3)

Links: MEIA
Rechts: IP

Weitere Beschriftung siehe Abbildung 26

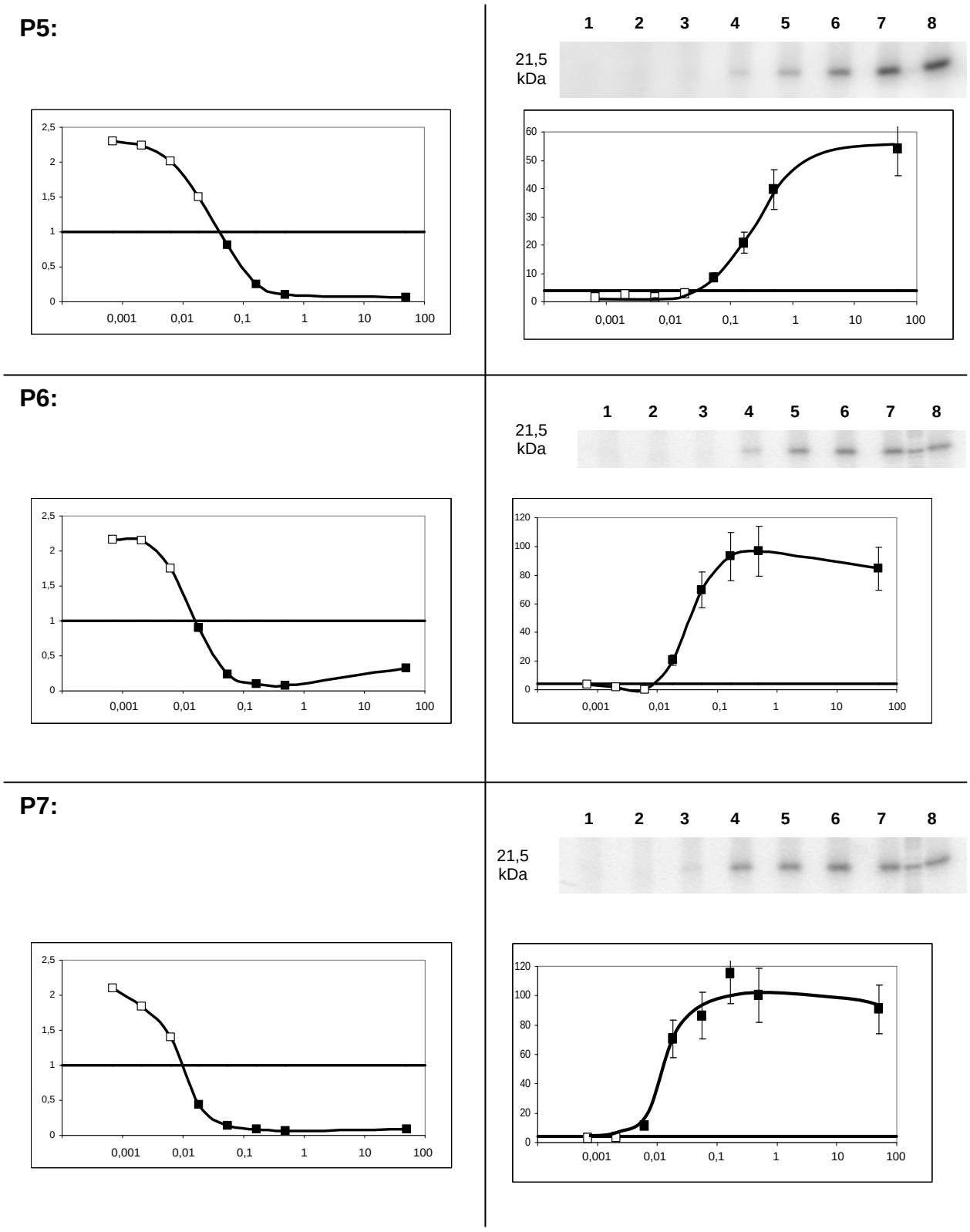


Abbildung 28: Verdünnungsreihen anti-HBc positiver Seren von Patienten mit HBeAg negativer, anti-HBe positiver chronischer Hepatitis B (P5 - P7)

Links: MEIA
Rechts: IP

Weitere Beschriftung siehe Abbildung 26

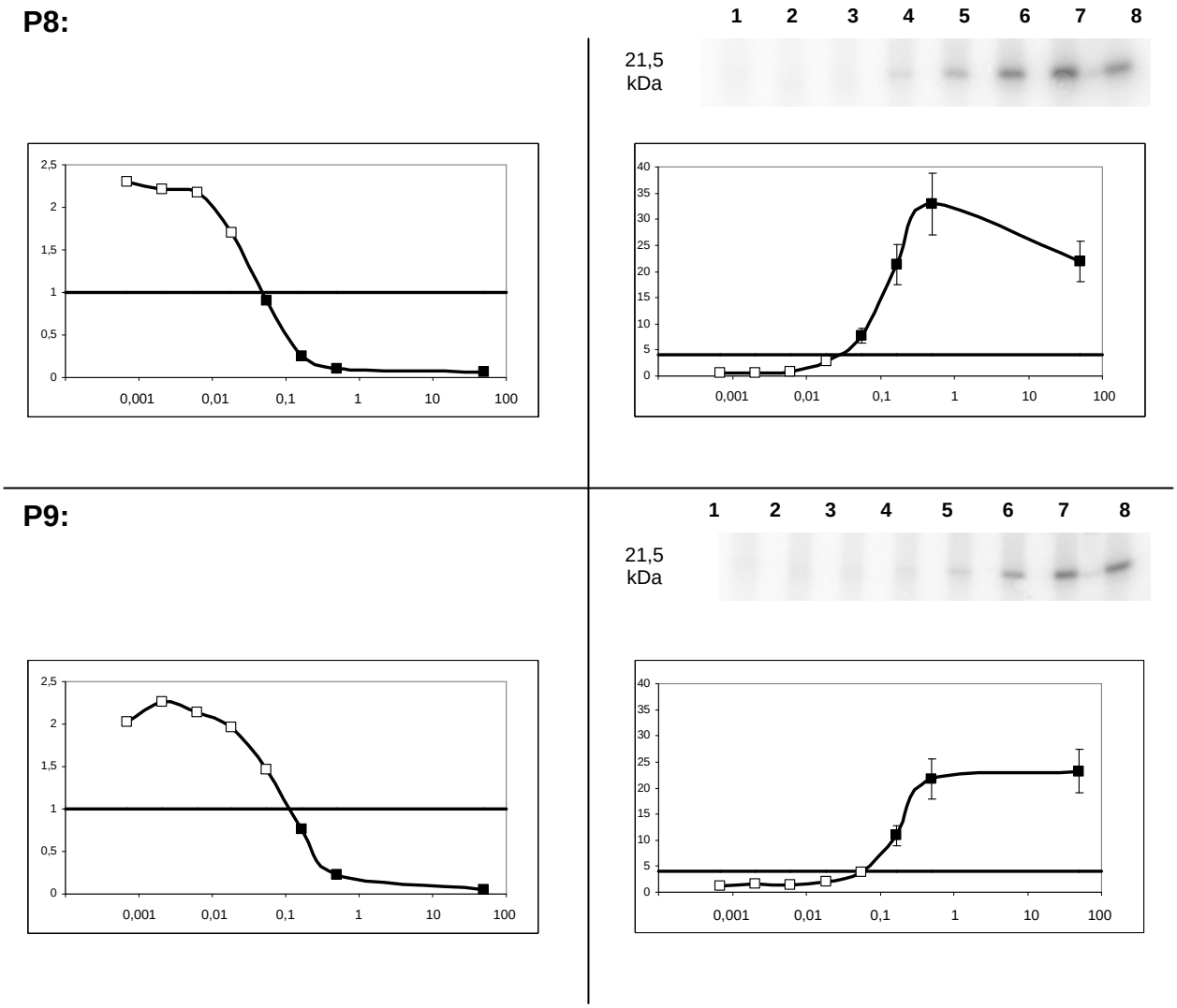


Abbildung 29: Verdünnungsreihen anti-HBc und anti-HBs positiver Seren von Patienten mit ausgeheilter Hepatitis B (P8 + P9)

Links: MEIA
Rechts: IP
Weitere Beschriftung siehe Abbildung 26

Bei den Verdünnungsreihen fiel auf, dass in vier Fällen in der IP (P3, P6, P7 und P8) und in zwei Fällen im MEIA (P6 und P7) die 1:100 Verdünnung ein intensiveres Signal als das unverdünnte Serum gab, was auf die Anwesenheit eines Inhibitors im entsprechenden Serum hinweist.

Die Sensitivitäten im MEIA und IP waren durchaus unterschiedlich. Bei der ersten anti-HBc-positiven Probe eines akut infizierten Patienten (P4, unbekannter anti-HBe Status) war die IP um eine Verdünnungsstufe sensitiver. Bei den Seren von Patienten mit HBeAg positiver chronischer Hepatitis B (P1 - P3) war die IP um zwei Verdünnungsstufen sensitiver als der kommerziell erhältliche MEIA. Bei den Seren

von anti-HBe positiven chronisch infizierten Patienten (P5 - P7) waren die Tests bei zwei Seren ab der gleichen Verdünnungsstufe negativ (P5 und P6) bzw. eine Stufe später (P7). Bei den Seren von Patienten mit einer ausgeheilten HBV-Infektion (P8 und P9) wurden beide Tests bei der gleichen Verdünnungsstufe negativ.

Um nicht nur die grobe Einteilung in Verdünnungsstufen zu haben, wurde der Schnittpunkt der durch die gemessenen Werte konstruierten Kurve mit dem Cut Off (MEIA: y = 1 und IP: y = 5,0 % (positiv) bzw. y = 4,0 % (grenzwertig)) bestimmt. Damit lässt sich der für ein positives bzw. grenzwertiges Testergebnis gerade eben notwendige Serumanteil am Gestamttestvolumen (detection limit = DL (positiv) bzw. grey zone limit = GZL (grenzwertig)) bestimmen (Tabelle 3).

Betrachtet man diese Werte, war der für ein positives Testergebnis gerade eben benötigte Serumanteil bei der IP stets niedriger als beim MEIA und damit die IP bei allen Seren sensitiver als der MEIA. Das Verhältnis DL MEIA / DL IP war immer > 1. Die Höhe dieses Quotienten, der Sensitivitätsunterschied zwischen den beiden Tests war aber je nach Patientengruppe unterschiedlich, wie sich bereits bei den Verdünnungsstufen andeutete. So lag DL MEIA / DL IP bei den anti-HBe positiven, chronisch infizierten Patienten (P5 - P7) und den Patienten mit einer ausgeheilten Hepatitis B (P8 und P9) zwischen 1,3 und 2,9. Bei HBeAg positiven, anti-HBe negativen chronisch infizierten Patienten (P1 - P3) lag DL MEIA / DL IP hingegen zwischen 5,8 und 7,4.

Serum Nr.	HBsAg	anti-HBc	anti-HBe	anti-HBs	MEIA DL < 1 S/CO	IP DL > 5.0 %	IP GZL > 4.0 %	MEIA DL/ IP DL	MEIA DL/ IP GZL
P1	+	+	-	-	0,022	0,0038	0,0032	5,8	6,9
P2	+	+	-	-	0,08	0,0108	0,0092	7,4	8,7
P3	+	+	-	-	0,007	0,0011*	0,00092*	6,4	7,6
P4	+	+		-	0,018	0,005	0,00598	3,6	3
P5	+	+	+	-	0,08	0,064	0,052	1,3	1,5
P6	+	+	+	-	0,032	0,0186	0,0174	1,7	1,8
P7	+	+	+	-	0,02	0,007	0,0052	2,9	3,9
P8	-	+	+	+	0,1	0,068	0,054	1,5	1,9
P9	-	+	+	+	0,22	0,14	0,11	1,6	2

Tabelle 3: Sensitivität der IP im Vergleich mit der Sensitivität im MEIA

DL: detection limit
GZL: grey zone limit

Die Zahlen in den Spalten MEIA DL, IP DL und GZL geben den Anteil des Testvolumens (in %) der aus Serum bestehen musste, um ein Signal bei DL (bzw. GZL) zu verursachen. Aufgrund der unterschiedlichen benötigten Testvolumina von MEIA und IP erfolgte die Angabe nicht in µl.

*Werte basieren auf Extrapolation

3.3 Anti-HBc negative, HBsAg positive Seren

Wenn in Serum HBsAg und HBV-Genome nachweisbar sind, der Patient also HBV infiziert ist, aber trotzdem ein anti-HBc-Test negativ ist, stellt sich die Frage nach der möglichen Ursache: a) Es handelt sich um die Frühphase einer Infektion, in der der anti-HBc-Titer noch unter der Nachweisgrenze des Tests liegt und in einem Folgeserum nachweisbar wäre. b) Die vorhandenen Antikörper werden nur in den herkömmlichen Tests nicht erkannt, könnten evtl. aber in einem sensitiveren bzw. andersartig konzipierten Test erkannt werden. c) Es sind tatsächlich keine Antikörper vorhanden.

Um dieser Frage nachzugehen wurden Seren mit diesem ungewöhnlichen serologischen Profil (HBsAg positiv, aber anti-HBc negativ) aus drei Quellen untersucht. Am Gießener Uniklinikum fanden sich im Zeitraum von Januar 1992 bis Juni 2006 1692 HBsAg positive Seren und am CHU Bordeaux im Zeitraum vom November 2001 bis Juni 2006 1605 HBsAg positive Seren. Unter diesen 3297 Seren waren insgesamt 26 Seren von 15 Patienten (zwölf Seren von fünf Patienten aus Gießen und 14 Seren von zehn Patienten aus Bordeaux) bei denen diese Konstellation (HBsAg positiv, aber anti-HBc negativ) vorlag; sie kam also bei 0,79 % der Seren vor (bei 0,71% in Gießen und bei 0,87% in Bordeaux). Bei zwei Seren (D3 und D4) handelte es sich um extreme Frühphasen einer Infektion. Zunächst fanden sich 24 weiter zu untersuchende Seren von 13 Patienten. In der Sammlung des Nationalen Konsilarlabors für HBV waren zwölf anti-HBc negative Seren von elf Patienten mit positivem HBsAg. Da es sich bei den Seren des Konsiliarlabors um kein natürliches Kollektiv handelt, sondern um eine Sammlung ungewöhnlicher Fälle, die behandelnden Ärzten deutschlandweit aufgefallen waren und deshalb an das Konsiliarlabor gesandt wurden, kann keine Schlussfolgerung auf deren Häufigkeit gezogen werden.

Eine Auflistung der Seren befindet sich im Anhang.

3.3.1 Seren vom CHU in Bordeaux, Frankreich (F1 - F10)

Am CHU Bordeaux fanden sich im Zeitraum vom November 2001 bis Juni 2006 unter den 1605 HBsAg positiven Seren 14 Seren von zehn Patienten, die HBsAg positiv und anti-HBc negativ waren.

Leider waren kaum klinische Informationen über die zehn Patienten in Erfahrung zu bringen. Bei vier Patienten war eine HIV-Koinfektion bekannt (F1, F6, F8 und F9). Bei zwei Patienten (F3 und F4) waren vorausgehende Serumproben bereits anti-HBc positiv gewesen, über eine Immunsuppression als Ursache für das Verschwinden des anti-HBc bei erhaltenem HBsAg lässt sich aber nur spekulieren. Bei vier Patienten bestand die HBV-Infektion zum Zeitpunkt der Entnahme der anti-HBc negativen Blutprobe nachweislich über sechs Monate (F3, F7, F8 und F9).

Alle Seren (außer F10) waren HBeAg positiv und anti-HBe negativ.

Es waren nur von zehn der 14 Seren ausreichende Volumina für weitere Tests vorhanden. Am CHU wurde als anti-HBc-Test der EIA Enzygnost von DADE Behring verwendet, während in Gießen der MEIA AxSymCORE der Firma Abbott verwendet wurde. Um eine bessere Vergleichbarkeit herzustellen wurden die Seren aus Frankreich, falls das vorhandene Serumvolumen es zuließ, mit dem MEIA nachgetestet. Da der MEIA aber mit ca. 250 µl viel Serum benötigt, war der Test von F3.3 und F4.2 nicht möglich. Bei den übrigen getesteten Seren waren zwei Seren (F2.1 und F5.1) im MEIA anti-HBc positiv. Daher wurden F2 und F5 von den weiteren Betrachtungen ausgeschlossen.

Die die verbleibenden anti-HBc negativen Seren wurden dann in der IP erneut auf anti-HBc getestet (Abbildung 29). In der IP waren drei der acht Seren (F3.3, F4.2 und F6) positiv für anti-HBc. Bei der anschließend bei diesen drei Seren durchgeführten Kompetition mit unmarkiertem Capsid zum Ausschluss einer unspezifischen Bindung ließ sich ein Serum (F6) nicht kompetieren.

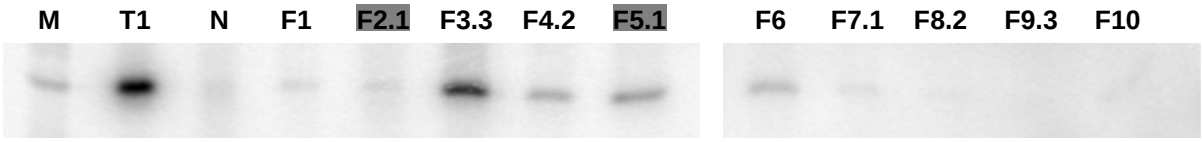


Abbildung 30: IP mit den Seren vom CHU in Bordeaux

IP mit Protein G-Dynabeads und radioaktiv markierten Capsiden zum Anti-HBc-Nachweis, Phosphoimager Scan von getrocknetem SDS-PAG

M: C14-Marker (Bande 21,5 kDa)
P1: Standard und Positivkontrolle
N: Negativkontrolle
F1-F10: 10 HBsAg positive Patienten mit mind. einem anti-HBc negativen Serum (EIA)
F2.1+F5.1: im MEIA anti-HBc positiv getestete Seren (Patienten F2 und F5 deshalb ausgeschlossen)

3.3.2 Seren vom Universitätsklinikum Gießen (D1 - D5)

Mit der Software der Serumverwaltung der virologischen Diagnostik des Gießener Uniklinikums wurde nach HBsAg positiven (1692 Patienten), aber anti-HBc negativen Seren im Zeitraum von Januar 1992 bis Juni 2006 gesucht (beide Tests von AxSym, Abbott). Es fanden sich 88 Ergebnisse. D.h. 5,2 % der initial HBsAg positiven Seren waren anti-HBc negativ. In solchen Fällen war aber im Regelfall direkt ein HBsAg-Bestätigungstest durchgeführt worden. Dieser bestand aus der Präinkubation des Serums mit anti-HBs-Schafserum und anschließend erneutem Testen auf HBsAg im AxSym. Die Zahl der für die Fragestellung interessanten Seren schränkte sich nach dem Aussortieren der Seren, die weiterhin positiv blieben und also im HBsAg-Test nur unspezifisch positiv reagiert hatten, stark ein. Es blieben zwölf Seren von fünf Patienten übrig, die in mindestens einer Probe bestätigt HBsAg positiv, aber anti-HBc negativ waren (D1 - D5).

D1 wurde 1974 geboren. Es existiert eine Probe vom Oktober 1999, hier sollte nach HBV-Impfung eine anti-HBs-Titerkontrolle erfolgen, die negativ war. Die Probe vom Januar 2002 wurde wegen erhöhter Transaminasen eingesandt. Es zeigte sich, dass das Serum HBsAg positiv und anti-HBc negativ war. Die Mutter des Patienten hat eine chronische HBV-Infektion. Dass der Patient bereits perinatal infiziert wurde, lässt sich daher vermuten.

Bei **D2** wurde HBsAg zuerst in einer Probe vom März 2004 nachgewiesen. Es handelte sich um eine Statuserhebung vor einer Hochdosischemotherapie bei Ewing-Sarkom. Die HCV-PCR war ebenfalls positiv. Die Transaminasen waren im weiteren Verlauf schwankend erhöht, eine Lamivudin-Therapie wurde begonnen. Zur anti-HBc-Serokonversion kam es erst im Januar 2005.

Bei zwei Patienten (**D3** und **D4**) zeigte sich, dass lediglich eine Frühphase der Infektion erfasst worden war, sie wurden daher von den weiteren Betrachtungen ausgeschlossen. Es handelte sich bei beiden um Blutspender, weshalb die ersten Proben nicht aufgrund von Symptomen, sondern im Rahmen der Spende entnommen wurden. In nachfolgenden Proben sah man die Serokonversion, in dem der anti-HBc-Test positiv wurde. Beide Patienten entwickelten in späteren Proben anti-HBs, was eine ausheilende Hepatitis B anzeigt.

Bei **D5**, einem Patienten mit Rhabdomyosarkom, fand sich ein über mindestens zwölf Jahre hinziehender Verlauf mit zunächst niedrigen (bis 1994), dann steigenden

HBsAg-Werten und persistierend negativem anti-HBc (ausgenommen eine Probe von 1990), bis es 1998 zur endgültigen anti-HBc-Serokonversion kam.
Von den drei bleibenden Patienten (D1, D2 und D5) ist der Infektionsverlauf also in einem Fall (D1) unbekannt und in den anderen beiden Fällen handelte es sich um eine chronische Hepatitis bei Immunsuppression. In beiden Fällen kam es zu einer späteren anti-HBc-Serokonversion. Das HBeAg war nur in den Proben von D5 getestet worden und zeigte einen zum HbsAg analogen Verlauf mit zunächst niedrig positiven Werten und einem deutlichen Anstieg ab 1994.

Von den zehn Seren dieser drei Patienten war von sieben noch genügend Volumen für die IP vorhanden. D1 blieb auch in der IP negativ. Im Verlauf von D2 trat die Serokonversion in der IP im Vergleich mit dem MEIA einen Monat später (in der nächsten Serumprobe) auf (D2.6 statt D2.5). Eine Probe früher im Verlauf (D2.3) war grenzwertig, was durch eine positive Kompetition weiter bestätigt werden konnte. Zwischen dieser und dem positiven Ergebnis lag eine negativ getestete Probe (D2.4). Bei D5, wo es im MEIA erst 1998 nach zwölf Jahren zur Serokonversion kam (D5.6), war die IP schon eine Probe (D5.5) früher (1997) positiv, was auch in der Kompetition bestätigt werden konnte.

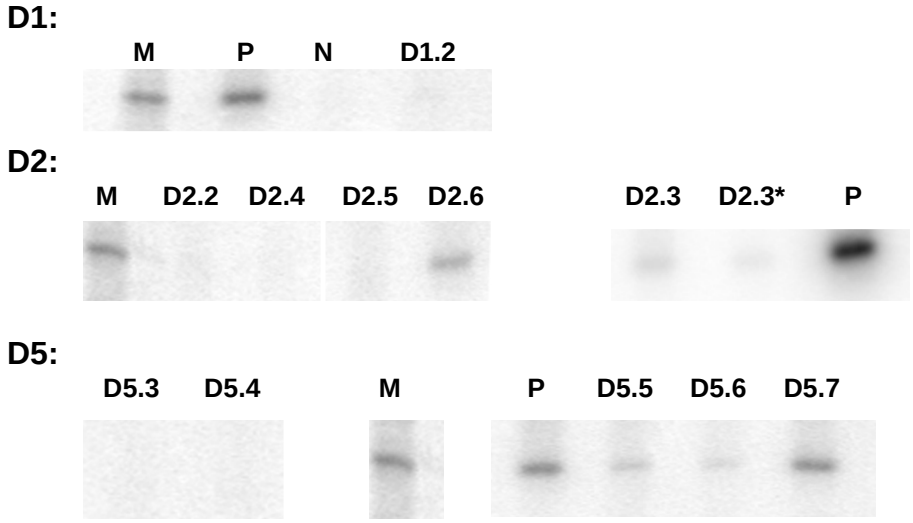


Abbildung 31: IP mit den Seren vom Universitätsklinikum in Gießen (D1/D2/D5)

IP mit Protein G-Dynabeads und radioaktiv markierten Capsiden zum Anti-HBc-Nachweis, Phosphoimager Scan von getrocknetem SDS-PAG

M: C14-Marker (Bande 21,5kDa)
P: Positivkontrollen
N: Negativkontrolle
***:** Kompetition der IP

Bei D3 und D4, bei denen eine Frühphase der Infektion vorlag, trat anti-HBc bei beiden Tests im selben Serum zum ersten Mal auf; d.h. dass die Serokonversion mit der IP nicht früher festgestellt werden konnte.

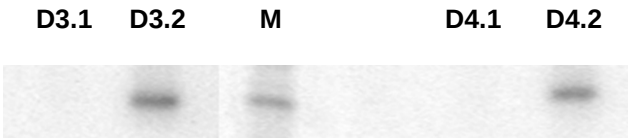


Abbildung 32: Serokonversion bei zwei Neu-Infizierten (D3 und D4)

IP mit Protein G-Dynabeads und radioaktiv markierten Capsiden zum anti-HBc-Nachweis, Phosphoimager Scan von getrocknetem SDS-PAG

M: C14-Marker (Bande 21,5 kDa)
D3.1 und D4.1: vor Serokonversion
D3.2 und D4.2: nach Serokonversion

3.3.3 Seren vom Nationalen Konsilarlabor für HBV in Gießen (K1 - K11)

In der Sammlung des Konsilarlabors für HBV fanden sich zwölf Seren von elf verschiedenen Patienten mit der beschriebenen Konstellation (HBsAg positiv, aber anti-HBc negativ bzw. ein Sonderfall (K8, sicher durchgemachte HBV-Infektion ohne anti-HBc-Serokonversion).

Bei **K1** und **K2** handelt es sich um Blutspender aus der Blutbank Gießen. Es gibt keine weiteren Informationen über die Spender und auch keine Folgeseren. So konnte nicht geprüft werden, ob es zu einem späteren Zeitpunkt zu einer anti-HBc-Serokonversion kam und die untersuchten Blutspenden Proben aus der frühen Phase der HBV-Infektion waren.

Serum von **K3** wurde mit Proben von zwei weiteren Patienten aus der Uniklinik Tübingen zur Infektionskettenaufklärung ins Konsilarlabor geschickt. Im August 1998 wurde der Patient HBV negativ getestet (HBsAg negativ, anti-HBs positiv, anti-HBc negativ). Nach einer Lebertansplantation im August 1999 war im November eine HBV-Infektion nachweisbar (HBsAg und HBeAg positiv, anti-HBc negativ). Eine spätere Probe existiert auch von diesem Patienten nicht.

Patient **K4** hatte 1992 eine akute myeloische Leukämie (AML), wurde chemotherapiert und erhielt eine Stammzell-Transplantation. In Proben aus den Jahren 1992 und 1994 waren anti-HBs und anti-HBc positiv, HBsAg war negativ. In

einer Probe ein Jahr später (1995) und in 2003 war HBsAg positiv und die beiden Antikörper anti-HBs und anti-HBc waren im MEIA negativ. Es erfolgte also eine Reaktivierung der okkulten HBV-Infektion mit Verlust aller HBV-Antikörper. Bei der Abnahme 2003 waren die Transaminasen leicht erhöht, das Bilirubin aber normwertig. Der Fall wurde kürzlich publiziert (Gartner et al. 2007).

Serum von **K5** (K5.2) wurde von der Virologie der Universitätsklinik Heidelberg zugeschickt. Der Patient hatte eine seit 1999 bekannte Hepatitis B. 1999, 2002 und 2004 waren HBsAg und HBeAg nachweisbar, der Nachweis von anti-HBc war ab 2002 negativ. Seit 2002 ist eine Koinfektion mit HIV bekannt. Der Patient wurde weder antiretroviral behandelt noch durch AIDS-definierende Erkrankungen auffällig.

K6, in Kasachstan geboren, war bei Blutentnahme zehn Jahre alt. Der Patient war nach Angabe der Universitätsklinik der Ruhr-Universität Bochum seit mindestens fünf Jahren HBV infiziert. Eine Leberschädigung zeigte sich nicht (normales Bilirubin und normwertige Transaminasen). Beide Eltern sollen eine HBV-Infektion durchgemacht haben, die drei Geschwister sollen teilweise ebenfalls infiziert sein.

K7 war bei Blutentnahme acht Jahre alt und wurde beim Kinderarzt in Saarbrücken wegen Übelkeit und Apathie vorgestellt. Das Kind ist gemäß STIKO gegen HBV geimpft worden. Postnatal fand keine Simultanimpfung statt, da die chronische HBV-Infektion der Mutter nicht bekannt war. Das Kind hatte leicht erhöhte Transaminasen. Ein vier Jahre älteres Geschwisterkind ist ebenfalls infiziert, bei diesem ist anti-HBc aber positiv.

Bei **K8** zeigen die vorhandenen Testergebnisse, dass der Patient eine HBV-Infektion durchgemacht haben muss und dies scheinbar ohne anti-HBc zu produzieren. Er war in einem Serum vom November 2005 bestätigt HBsAg positiv und im vorhandenen Serum vom Dezember 2006 HBsAg negativ und anti-HBs positiv.

K9, K10 und **K11** sind perinatal infiziert worden. K10 und K11 sind Geschwister bei denen aufgrund der bekannten chronischen Hepatitis B der Mutter postnatal *lege artis* eine Simultanimpfung (passiv und aktiv) durchgeführt worden war. Bei beiden Geschwistern trat ein Impfversagen unklarer Ursache auf. Beide Geschwister waren zunächst anti-HBc positiv, wurden dann aber bei bestehender chronischer Infektion (HBsAg und HBV-DNA positiv) anti-HBc negativ. Bei der Mutter bestand ein grenzwertig positiver anti-HBc Befund, sodass es sich bei dem passager positiven Befund bei den beiden Kindern wahrscheinlich um einen Leihtiter handelte.

Zusammenfassend bestand bei drei der zehn Patienten aus dem Konsiliarlabor eine Immunsuppression (K3, K4 und K5). Fünf der zehn Patienten wurden perinatal, als kleine Kinder infiziert (K6, K7, K9, K10 und K11).
Bei acht Patienten war ein Verlauf über mehr als sechs Monate nachweisbar.
Außer bei K8 und bei K6 (aufgrund Volumenmangels unbekannter Status) handelte es sich um HBeAg positive, anti-HBe negative Infektionen.

Alle vorliegenden Seren wurden mittels IP erneut auf anti-HBc getestet. Bei drei der zwölf Seren ergab sich ein positives Ergebnis (K4.3, K10.2 und K11.2), bei drei ergab sich ein grenzwertiges Ergebnis (K2, K3 und K9.4).

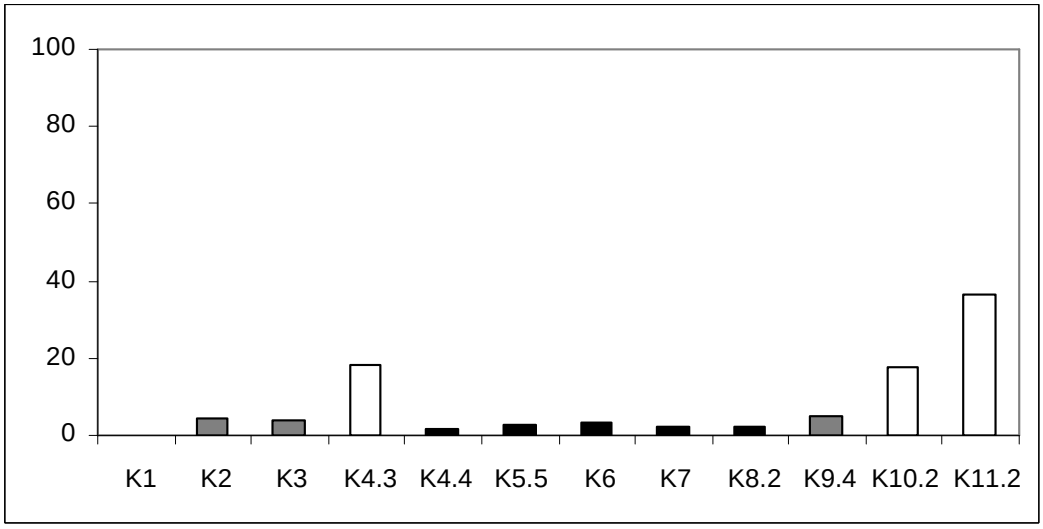


Abbildung 33: IP mit den Seren vom Konsilarlabor für HBV in Gießen (K1 - K11)

Schwarzer Balken: negatives Ergebnis (< 4 %)
Grauer Balken: grenzwertiges Ergebnis (4 – 5 %)
Weißer Balken: positives Ergebnis (> 5 %)

Anti-HBc-Nachweis durch IP mit Protein G-Dynabeads + radioaktiv markiertem Capsid, Phosphimager Scan von getrocknetem SDS-PAG und Auswertung mit ImageQuant und Excel.

Diese Ergebnisse konnten in drei Fällen durch Kompetition mit nicht-markiertem Capsid auf ihre Spezifität überprüft werden. Bei einem positiven und zwei grenzwertigen Seren (K4.3, K2 und K3) ließ sich die Präzipitation nicht inhibieren, die Bindung war also unspezifisch. Bei einem grenzwertigen und zwei positiven Seren war nicht ausreichend Volumen für die Kompetition vorhanden (K9.4, K10.2 und K11.2).

Außerdem wurde, um zu prüfen, ob das Fehlen des anti-HBc evtl. an einer Mutation im Virusgenom lag, falls möglich (noch genug Volumen vom Serum vorhanden und genug Genome im Serum intakt) eine Genotypisierung und Sequenzierung durchgeführt.

Vier Patienten waren mit dem Genotyp A2, zwei mit dem Genotyp D und zwei mit dem Genotyp C infiziert. Fünf dieser Patienten waren IP negativ bzw. unspezifisch (vier mit Genotyp A2 und einer mit Genotyp D) und drei IP positiv (einer mit Genotyp D und zwei mit Genotyp C). Bei zwei Patienten gelang die Genotypisierung und Sequenzierung nicht (K1 und K8).

Eine Sequenzierung war bei sieben Seren möglich. Fünf Seren zeigten keine Mutationen im Core im Vergleich mit dem Wildtyp. Zwei der A2-infizierten Patienten zeigten Mutationen (E93D / N94T / N103T bzw. P15S).

	Genotypisierung	Sequenzierung
K1	-	
K2	A2	*
K3	A2	E93D / N94T / N103T
K4	A2	keine Mutation im Core-Leserahmen
K5	A2	P15S
K6	*	
K7	D	keine Mutation im Core-Leserahmen
K8	-	
K9	D	keine Mutation im Core-Leserahmen
K10	C	keine Mutation im Core-Leserahmen
K11	C	keine Mutation im Core-Leserahmen
Mutter von K10 + K11	C	keine Mutation im Core-Leserahmen

Tabelle 4: Ergebnisse der Genotypisierung und Sequenzierung (K1 - K11)

-: Genotypisierung in der Probe nicht erfolgreich
*: nicht ausreichend Volumen vorhanden

4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war HBsAg positive, aber anti-HBc negative Seren aus drei Quellen, dem Nationalen Konsilarlabor für HBV in Gießen und den Serumverwaltungen der virologischen Diagnostiken des Gießener Uniklinikums und des CHU in Bordeaux, Frankreich zu reevaluieren. Dazu wurde ein anti-HBc-Test entwickelt. Außerdem wurde versucht über weitere diagnostische Tests (z.B. Genotypisierung und Sequenzierung) und weitere Informationen zu den Patienten Näheres über die Ätiologie des fehlenden anti-HBc herauszufinden.

4.1 Anti-HBc-Test durch IP von radioaktiv markiertem Capsid

Um zu prüfen, ob in den HBsAg positiven, anti-HBc negativen Seren evtl. doch anti-HBc-Antikörper vorhanden sind und nur der ursprüngliche Test keine ausreichende Sensitivität für den Nachweis derselben hatte, wurde ein sensitiverer anti-HBc-Test entwickelt. Dieser Test zeigte eine insgesamt 3,6fach höhere Sensitivität im Vergleich mit einem gewöhnlichen Assay (AxSymCORE von Abbott). Durch Kompetition könnten wenig avide, aber eben doch vorhandene, anti-HBc-Antikörper unentdeckt geblieben sein. Deshalb wurde ein Testverfahren verwendet, das anders als die meisten kommerziell erhältlichen anti-HBc-Tests nicht auf Kompetition der evtl. im Serum vorhandenen Antikörper mit markierten Test-Antikörpern beruht.

Ein ebenfalls nicht auf Kompetition beruhender, direkter Radioimmunassay (dRIA), der 1984 von Wolff und Gerlich beschrieben wurde (Wolff and Gerlich 1984), zeigte eine 10fach höhere Sensitivität als ein gewöhnlicher Inhibitionsassay. In diesem Assay wurde HBcAg an eine Mikrotiter-Platte gebunden, dann wurden die Platten mit dem zu testenden Serum und danach mit ^{32}P markiertem HBcAg inkubiert. Die Phosphorylierung wurde durch die endogene Proteinkinase und die Zugabe von $\gamma^{32}P$-ATP erreicht. Bei dem damals verwendeten HBcAg handelte es sich um aus der Leber eines verstorbenen Patienten mit einer chronischen Hepatitis B aufgereinigtes Material.

Solches Material ist natürlich nur schwer und in geringen Mengen zu erhalten. Es konnte aber gezeigt werden, dass rekombinant hergestellte Capside ebenfalls in der anti-HBc-Testung eingesetzt werden können (Tordjeman et al. 1993). Deshalb wurden in dieser Arbeit *E. coli*-exprimierte Capside verwendet, die durch *in vitro*-Phosphorylierung mittels zugefügter Proteinkinase C mit ^{32}P markiert worden waren

(Kann and Gerlich 1994). Die Phosphorylierung von Core-Proteinen ist Teil des natürlichen Replikationszyklus von HBV und exogen zugefügte Proteinkinase C phosphoryliert *E. coli*-exprimierte Capside an den selben C-terminalen Aminosäuren wie die endogene Proteinkinase die aus Leber aufgereinigten Capside (Rabe et al. 2003). Eine Störung der Antikörperbindung durch die Phosphorylierung an den entsprechenden Epitopen auf den Capsiden ist deshalb nicht zu befürchten. Ein Nachteil dieser Markierung ist allerdings die kurze Halbwertszeit von ^{32}P.

Unspezifisch-positive Ergebnisse bei anti-HBc-Tests sind in der Literatur beschrieben worden (Wolff and Gerlich 1984; Caspari et al. 1989). Um diese zu vermeiden wurde ein Assay gewählt, bei dem zum einen durch die Auftrennung im SDS-PAGE ein gezieltes Ausmessen der Aktivität des intakten ^{32}P markierten HBcAg an der 21,5 kDa-Bande und zum anderen eine Kontrolle der Spezifität durch Inhibition mit unmarkiertem Capsid möglich war.

Um die Sensitivität des neuen Assays zu überprüfen wurden Verdünnungsreihen mittels IP und einem kommerziell erhältlichen Inhibitions-MEIA, dem AxSymCORE von Abbott, getestet. Der Vergleich brachte überraschende Ergebnisse: Zwar war die IP bei allen neun Verdünnungsreihen sensitiver als der MEIA, aber nur 1,8fach sensitiver bei anti-HBe enthaltenden Seren, während sie 6,5fach sensitiver bei anti-HBe negativen Seren war. Scheinbar erkennen unterschiedliche anti-HBc-Tests mit unterschiedlichem Format und unterschiedlichen HBcAg-Präparationen durchaus unterschiedliche Antikörpergruppen. Der HBV-Genotyp scheint dabei keine Rolle zu spielen, denn anhand der Aminosäuresequenz des Core-Proteins ist eine Aussage über den Genotyp nur schlecht möglich. Vor allem Genotyp B und C können nur durch ihre Nukleotidsequenz unterschieden werden (Chain and Myers 2005). Sallberg et al. beschrieben 1993 ein Epitop (AS 124 - 133), das sowohl auf der Oberfläche von nativem HBeAg als auch auf denaturiertem HBcAg exponiert ist (Sallberg et al. 1993). Wenn denaturiertes HBcAg im AxSymCORE vorhanden wäre, welches auch von anti-HBe erkannt wird, könnte dies die Signalstärke bei anti-HBe positiven Seren erhöhen und so die Sensitivitätsunterschiede zwischen anti-HBe positiven und anti-HBe negativen Seren in den beiden Tests erklären.

Ein Ausgangspunkt für die weitere Entwicklung und Verfeinerung von anti-HBc-Tests könnte die Beobachtung sein, dass unterschiedliche Epitope vom HBcAg in unterschiedlichen Stadien der Infektion erkannt werden (Tordjeman et al. 1993). So

sind die gebildeten Antikörper während der akuten Hepatitis viel heterogener als danach. Bereits vor dem Verschwinden von HBeAg im Serum werden frühe anti-HBe-Antikörper nachgewiesen, welche konformationale Epitope erkennen. Später nach erfolgter anti-HBe-Serokonversion fanden sich hingegen anti-HBe-Antikörper, die eher lineare HBeAg-Epitope erkennen (Baumeister et al. 2000). Dies könnte klinische Bedeutung bei der Beurteilung des Erfolges einer Interferon-Therapie haben. Durch die Information, ob sich eine Serokonversion bereits ankündigt, könnte sich z.B. beim Auftreten von Nebenwirkungen die Entscheidung für oder gegen den Abbruch der Therapie erleichtern. Analog dazu wäre auch ein anti-HBc-Test denkbar, der z.B. bei Neuinfektion eine Aussage über die Effektivität der Immunantwort des Infizierten und damit die Wahrscheinlichkeit einer Chronifizierung der Hepatitis B machen könnte. In der Klinik wäre ein solcher Test als Entscheidungshilfe für oder gegen einen frühzeitigen Therapiebeginn von großem Nutzen.

4.2 Anti-HBc negative, HBsAg positive Patienten

Das in dieser Arbeit untersuchte serologische Profil (HBsAg positiv, aber anti-HBc negativ) ist sehr ungewöhnlich. Eigentlich wird im Rahmen jeder HBV-Infektion anti-HBc gebildet (Schaefer and Gerlich 2007). Bei diesem serologischen Profil wurde zeitweilig eine Infektion mit einem neuen Virus, dem sog. „HBV Typ 2“ vermutet (Coursaget et al. 1990); eine Annahme die inzwischen wieder verworfen wurde.

Insgesamt waren unter 3309 Seren aus dem Nationalen Konsilarlabor für HBV in Gießen und den Serumverwaltungen der virologischen Diagnostiken des Gießener Uniklinikums und des CHU in Bordeaux, Frankreich nur 34 Serumproben von 22 Patienten, die dieses serologische Profil aufwiesen.

Anti-HBe war bei allen 17 Seren, die darauf getestet wurden, ebenfalls negativ. HBeAg war in den darauf getesteten Proben (zehn Seren) positiv. Nur in einem Fall waren sowohl anti-HBe als auch HBeAg negativ. Ein selektiver Ausfall des anti-HBc bei positivem Nachweis von anti-HBe konnte nicht beobachtet werden.

4.2.1 Mögliche Ätiologie des ungewöhnlichen serologischen Profils

Eine Erklärung für dieses ungewöhnliche serologische Profil (HBsAg positiv, aber anti-HBc negativ) könnte das sog. diagnostische Fenster sein, also die Frühphase einer Infektion noch vor Symptombeginn, wenn lediglich die HBV-DNA und die

viralen Antigene (HBsAg und HBeAg) nachweisbar sind, aber noch keine Antikörper gebildet wurden. Bei 14 der 22 in dieser Arbeit reevaluierten Patienten bestand aber nachgewiesenermaßen eine chronische Hepatitis B mit einem Infektionsverlauf über sechs Monate. Bei zwei dieser Fälle kam es noch später zu einer Serokonversion (anti-HBc wurde positiv). In acht Fällen war der Infektionsverlauf hingegen unbekannt, hier könnte es sich also um Blutentnahmen im diagnostischen Fenster bei symptomfreien Personen z.B. im Rahmen einer Blutspende gehandelt haben.

Schon mehrfach in der Literatur beschrieben wurde ein Fehlen der anti-HBc-Antikörper bei immunsuppremierten Patienten: Z.B. wiesen in einer Studie von 1989 sieben von zehn anti-Hbc negativen Patienten einen sekundären Immundefekt (AIDS, Leukämie, Histiozytose X, terminale Niereninsuffizienz) auf (Moller et al. 1989).

Auch bei neun der 22 in dieser Arbeit reevaluierten Patienten war eine Immunsuppression (Chemotherapie bei Neoplasie, Transplantation oder HIV) nachzuweisen. Bei den Patienten mit einer HIV-Koinfektion war allerdings in den meisten Fällen das Stadium der HIV-Infektion unbekannt, womit das Ausmaß der Immunsuppression unklar ist. Avettand-Fenoel et al. beschreiben ein Verschwinden der anti-HBc-Antikörper ab einer T-Helferzellzahl von unter 50 /mm^3 und einer HIV-Viruslast über 100.000 Kopien /ml (Avettand-Fenoel et al. 2006).

Da HBcAg auch ein T-Zell-unabhängiges Antigen ist, aber der Antikörper-Klassenwechsel von IgM- zu IgG-Produktion nicht ohne die Hilfe von T-Zellen stattfinden kann (Vanlandschoot et al. 2003), wäre bei HBV-Infektion in einem fortgeschrittenen Stadium der HIV-Infektion evtl. nur die alleinige Bildung von anti-HBc-IgM denkbar. Während die in der IP verwendeten Dynabeads lediglich IgG erkennen, wird durch den AxSymCORE von Abbott sowohl IgG als auch IgM erkannt.

HBsAg positive, eigentlich immunkompetente, aber trotzdem anti-HBc negative Personen wurden z.B. von Lee et al. beschrieben. So konnte für einen über eine Studienperiode von fünf Jahren konstant anti-HBc negativen Patienten gezeigt werden, dass seine Lymphozyten *in vitro* u.a. auf Staphylococcus aureus- und Tetanustoxoid reagierten, nicht aber auf rekombinant hergestelltes HBcAg, und dass seine Monozyten keine HBcAg beschichteten Kügelchen phagozytierten. Die B- und T-Zellzahlen im peripheren Blut waren normal und der Patient war symptomfrei, was einen selektiven Immundefekt anzeigt (Lee et al. 1992).

Bei 13 der 22 in dieser Arbeit reevaluierten Patienten war ebenfalls keinerlei Immunsuppression bekannt. Allerdings lag in mindestens fünf Fällen eine perinatale Infektion vor. Die perinatale Infektion ist als weitere Ursache für das Ausbleiben einer anti-HBc-Antikörperbildung bekannt. Unter 128 HBsAg positiven Neugeborenen, die perinatal von ihrer HBsAg und HBeAg positiven Mutter infiziert worden waren, waren zwölf über die gesamte Nachbeobachtungszeit von drei bis fünf Jahren anti-HBc negativ (Lee et al. 1989). Ein Transaminasenanstieg als Hinweis auf eine Leberschädigung konnte bei keinem der zwölf Kinder beobachtet werden.
Bei sechs von zehn, initial anti-HBc negativen, perinatal infizierten Kindern trat nach minimal zwei Jahren bzw. maximal acht Jahren noch eine verspätete Serokonversion auf (Ni et al. 1993). Das Auftreten der anti-HBc-Antikörper war dabei nicht von Hepatitis-Symptomen begleitet.
Bei perinataler Infektion trifft HBV auf ein noch unreifes Immunsystem. So kommt es in über 90 Prozent der Fälle zur Entwicklung einer chronischen Hepatitis B, da das Immunsystem nicht in der Lage ist die Infektion zu terminieren. HBeAg kann von der Mutter plazentar auf den Fetus übertragen werden und dort auch ohne Infektion des Babys bis zu sechs Monate nachweisbar sein (Wang et al. 2003). Dies könnte zu der Unfähigkeit des Immunsystems führen, die viralen Proteine HBeAg und HBcAg als fremd zu erkennen.

	Anzahl
Immunsuppression	**9**
Chemotherapie	4
HIV	5
Keine Immunsuppression bekannt	**13**
perinatale Infektion	5
unklarer Infektionszeitpunkt	8

Tabelle 5: Übersicht anti-HBc negative Seren (MEIA bzw. EIA)

Eine genetische Prädisposition für das Ausbleiben der anti-HBc-Antikörperbildung ist ebenfalls denkbar. Die Kombination HBsAg positiv, aber anti-HBc negativ trat bei den in dieser Arbeit untersuchten Fällen bei zwei perinatal infizierten Geschwistern auf. Ein ähnlicher Fall findet sich auch in der Literatur: In einer Familie waren alle vier Geschwister anti-HBc negativ (Fiordalisi et al. 1994). Bei der Sequenzierung von drei dieser Patienten fanden sich neben dem Wildtyp auch Varianten, die zu trunkierten

Core-Proteinen führten, die nicht mehr durch anti-HBc-Testantikörper präzipitiert werden konnten.

Eine weitere Möglichkeit für die Nichtdetektion von anti-HBc könnten also Mutationen des HBcAg sein. Zoulim et al. beschrieben einen Patienten mit HBV-assozierter Leberzirrhose, bei dem das Immunsystem durchaus auf die viralen Antigene reagierte, aber die humorale Immunantwort auf HBcAg aufgrund von Deletionen verhindert war (Zoulim et al. 1996).

4.2.1.1 Mutation des HBcAg

Im Bereich des HBsAg ist eine Immunselektion mit dem Entstehen von Mutationen, die z.B. der Impfung gegen HBV entkommen und in normalen HBsAg-Tests nicht mehr nachgewiesen werden können, bekannt wenn auch extrem selten (Zuckerman and Zuckerman 2003).

Beim HBcAg ist die Häufigkeit und die Bedeutung solcher Mutationen noch unklar. Die strukturellen Anforderungen an das Core-Protein im Rahmen der Capsidbildung und auf der Capsidaußenseite der Interaktion mit den Surface-Proteinen (Ponsel and Bruss 2003) lassen wenig Raum für Mutationen. In einer Studie zeigten über Dreiviertel der Aminosäuren des HBcAg bei über 700 verglichenen Sequenzen keine Polymorphie. Gerade im Bereich der wichtigen B-Zell-Epitope am Stachel des HBV fand sich die Mehrzahl der Sequenzvariationen (Chain and Myers 2005).

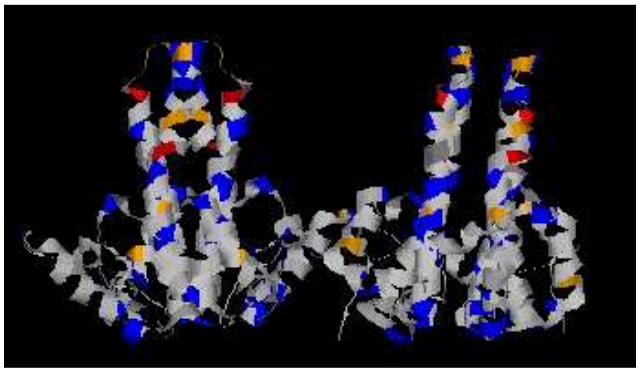


Abbildung 34:
Sequenzvariation im HBcAg

Verglichen wurden 742 Protein-sequenzen

Blau: 2 Polymorphismen
Orange: 3 Polymorphismen
Rot: 4 bzw. > 4 Polymorphismen

(nach (Chain and Myers 2005)

Es konnte gezeigt werden, dass Mutationen im Bereich der AS 50 - 69 (ein immunodominates Epitop für die T-Helferzellen) einen direkten Einfluss auf die Reaktivität der T-Helferzellen haben (Torre et al. 2004).

Aufgrund der Vermutung, dass Mutationen im Bereich der B-Zell-Epitope auf dem Core-Protein auch eine Ursache für fehlende anti-HBc-Antikörper bei

nachgewiesener HBV-Infektion seien könnten, wurde bereits mehrfach das von entsprechenden Patienten isolierte Material sequenziert.

So wurde z.B. 1991 die entsprechende Region bei zwölf Patienten untersucht (Melegari et al. 1991). Dabei zeigte sich eine hohe Homologie zu dem entsprechenden Subtyp von HBV, es fanden sich keine Deletionen und keine bedeutenden Mutationen. Bei dem untersuchten Kollektiv handelte es sich allerdings um nosokomial infizierte, juvenile Krebspatienten unter Chemotherapie. Die fehlende Entwicklung von anti-HBc lässt sich also durch die bestehende Immunsuppression erklären. So fand sich auch in Folgeuntersuchungen bei den überlebenden Patienten nach bis zu sieben Jahren noch die Bildung von anti-HBc. Einen ähnlichen Fall gab es auch in Gießen: Bei D5 handelte es sich ebenfalls um einen juvenilen Krebspatienten, der erst mindestens zwölf Jahre nach Infektion anti-HBc entwickelte.

Ein anderer Aspekt bei der Studie von 1991 war, dass bei den überlebenden Patienten nur niedrige anti-HBc-Titer auftraten und klinisch keine Leberzellschädigung zu beobachten war. Dies wurde dahingehend interpretiert, dass eine HBV-Infektion unter Chemotherapie im Stadium der Immunsuppression zu einer Toleranz bezüglich der viralen Proteine führen kann. Dieser Umstand ähnelt der Beobachtung, dass perinatal, also bei noch unreifem Immunsystem, infizierte Patienten manchmal wenig bzw. auch kein anti-HBc entwickeln.

In einer Studie aus Frankreich wurde von zwei gesunden Blutspendern berichtet, die anti-HBc negativ, aber HBV infiziert waren (Laperche et al. 2001). Bei beiden zeigte die Sequenzierung keine Deletionen und keine Mutationen. Beide waren nicht immunsupprimiert, stammten aber ursprünglich aus HBV-Endemiegebieten, sodass eine perinatale Infektion als Ursache wahrscheinlich erscheint.

Bei den sieben Patienten aus dieser Arbeit, bei denen eine Sequenzierung des HBV-Genoms möglich war, fanden sich bei fünf keine Mutationen und bei zwei lediglich Mutationen, die nicht die immundominante Region (AS 78 - 83) betrafen (Salfeld et al. 1989; Pushko et al. 1994). Von diesen sieben Patienten waren drei immunsupprimiert und vier perinatal infiziert worden. Es konnte also auch in den hier untersuchten Fällen bestätigt werden, dass Mutationen im Core-Fenster keine bedeutende Rolle bei dem fehlenden anti-HBc-Nachweis trotz chronischer Hepatitis B spielen.

Dies könnte bei der sog. okkulten Infektion anders sein. Bei diesem Infektionstyp persistiert HBV-DNA in der Leber, aber dem Immunsystem gelingt die Suppression

der Replikation nahezu vollständig. HBsAg im Serum und oft auch anti-HBc ist negativ. So war ungefähr ein Drittel der okkulten HBV-Träger, die erst bei Leberresektionen bzw. Leberbiopsien im Rahmen einer Abdominaloperation identifiziert wurden, anti-HBc negativ (Raimondo et al. 2008). Escape-Mutanten unter starkem Druck des Immunsystems (immunologische Selektion) könnten hier die Ursache sein. Die Sequenzierung von Virusisolaten aus der Leber von Patienten mit okkulter Infektion zeigte jedenfalls eine ausgesprochen hohe Variabiltät (Pollicino et al. 2007; Chen et al. 2009). Ein sensitiverer anti-HBc-Test, der restistenter gegen Mutationen im Core-Protein ist, könnte helfen okkulte Infektionen zu entdecken. Anti-HBc negative Seren von Patienten mit okkulter Infektion wurden jedoch in dieser Arbeit nicht erneut getestet, da der Nachweis von HBsAg, welches definitionsgemäß bei der okkulten Infektion negativ ist, ein Einschlusskriterium war.

4.2.2 Test mit einem sensitiveren anti-HBc-Test

Ein sensitiverer anti-HBc-Test konnte in manchen Fällen zu einem positiven Nachweis für anti-HBc führen (Zoulim et al. 1996; Avettand-Fenoel et al. 2006). Das zeigte sich auch in dieser Arbeit beim erneuten Testen der EIA (Enzygnost von DADE Behring) analysierten Proben aus Bordeaux mit dem MEIA (AxSymCORE von Abbott). Die verfügbaren anti-HBc negativen Seren wurden deshalb mit der sensitiveren, nicht auf Kompetition beruhenden IP erneut auf anti-HBc getestet. Von den 27 im IP getesteten, ursprünglich anti-HBc negativen, Seren waren sieben positiv und vier grenzwertig. Das Vorhandensein von anti-HBc war dabei unabhängig vom Abnahmedatum und damit auch der Lagerungsdauer.

IP	Anzahl
negativ	16
positiv	7
grenzwertig	4

Tabelle 6: Zusammenfassung der IP-Ergebnisse ursprünglich anti-HBc negativer Seren

Insgesamt: 27 Seren von 22 Patienten

negativ: IP < 4,0 %
positiv: IP > 5.0 %
grenzwertig: 4,0 % < IP < 5,0 %

Bei acht der elf in der IP positiv bzw. grenzwertig getesteten Seren konnte eine Kompetition zur Überprüfung der Spezifität durchgeführt werden, bei drei Seren (zwei positive und ein grenzwertiges) waren hingegen keine ausreichenden Volumina für eine weitere Tests vorhanden. Das Ergebnis ließ sich bei vier Seren (drei positiven

und einem grenzwertigen) bestätigen. Das positive Ergebnis von den andern vier Seren (zwei positiven und zwei grenzwertigen) ließ sich hingegen nicht bestätigen. Fasst man nun die Ergebnisse von der IP und der Kompetition der IP zusammen, waren 16 der 27 Seren negativ, sieben waren positiv und vier waren unspezifisch.

	Anzahl
negativ	16
positiv	7*
davon positiv in der IP	5
davon grenzwertig in der IP	2
unspezifisch	4
davon positiv in der IP	2
davon grenzwertig in der IP	2

Tabelle 7: Zusammenfassung der IP-Ergebnisse unter Berücksichtigung der Ergebnisse der Kompetition

* davon bei 3 Seren keine ausreichenden Volumina für eine Kompetition mehr vorhanden

Auch mit der sensitiveren, nicht auf Kompetition beruhenden IP gelang es also nur bei einem kleinen Teil, der im kommerziell erhältlichen MEIA negativen Seren, anti-HBc zu detektieren. Bei der Mehrheit blieb auch mit diesem Assay anti-HBc negativ. Dies galt auch für die anti-HBe negativen chronisch infizierten Patienten in deren Bereich vor allem, wie im Kapitel 4.1 beschrieben, der Sensitivitätsgewinn des neuen Tests lag.

Auch wenn anti-HBc-Antikörper nur bei sehr wenigen Menschen mit einer chronischen Hepatitis B fehlen bzw. die vorhandenen Antikörper mit der heutigen Technik nicht nachweisbar sind, kann damit kein anti-HBc-Test allein eine HBV-Infektion ausschließen. Das gilt im Besonderen im Blutspendewesen. Weitere Tests, wie das Screening auf HBV-DNA, sind notwendig um das Infektionsrisiko für die Empfänger zu minimieren. Bei ätiologisch unklarer Hepatitis ist, vor allem wenn eine perinatale HBV-Infektion in Betracht kommt oder bei Immunsuppression des Patienten, eine Hepatitis B trotz negativem anti-HBc nicht ausgeschlossen.

5. Anhang

5.1 Daten zum Sensitivitätsvergleich (IP / MEIA)

In Kapitel 3.2.5. wurden die Ergebnisse im Sensitivitätsvergleich zwischen IP und MEIA dargestellt.

5.1.1 Ergebnisse aus zusätzlichen Tests zu den Seren P1 - P9

Zum Sensitivitätsvergleich wurden neun bekannt anti-HBc positive Seren verwendet. In der folgenden Tabelle sind die weiteren zu diesen Seren bekannten Testergebnisse aufgeführt.

Serum	HBsAg		anti-HBs		HBeAg		anti-HBe	
Nr.		S/N		S/CO		PEIU/mL		S/CO
P1	+	161,59			+	18,07	-	
P2	+		-		+		-	
P3	+	202,8	-		+		-	
P4	+							
P5	+	79,8			-	0,912	+	0,076
P6	+	80,97			-	1,7	+	0,012
P7	+	84,47	-		-	0,912	+	0,012
P8	-	0,57	+	14,2			+	0,065
P9	-		+				+	0,031

Tabelle 8: Ergebnisse aus zusätzlichen Tests zu den Seren P1 - P9

5.1.2 Messwerte der Verdünnungsreihen (IP und MEIA)

Mit den neun Seren wurden Verdünnungsreihen hergestellt und sowohl im IP als auch im MEIA getestet. Die entsprechenden Messwerte finden sich in der folgenden Tabelle.

	P1		P2		P3		P4		P5	
	IP	MEIA	IP	MEIA	IP	MEIA	IP	MEIA	IP	MEIA
1	100	0,072	165,41	0,128	107,62	0,045	85,95	0,107	54,13	0,059
1:100	72,03	0,118	139,84	0,399	116,36	0,081	85,35	0,184	39,67	0,105
1:300	54,51	0,177	124,96	0,522	81,98	0,084	78,88	0,298	20,82	0,255
1:900	57,51	0,330	86,17	0,820	79,76	0,088	57,26	0,400	8,54	0,810
1:2.700	53,35	0,670	26,40	1,418	64,04	0,143	39,89	0,682	2,81	1,504
1:8.100	26,76	1,420	6,02	1,907	52,73	0,532	9,39	1,205	1,29	2,015
1:24.300	5,35	2,063	1,78	1,957	22,88	1,508	3,20	1,844	2,44	2,236
1:72.900	3,25	2,199	2,37	2,090	6,95	1,904	2,10	2,132	1,58	2,299

	P6		P7		P8		P9	
	IP	MEIA	IP	MEIA	IP	MEIA	IP	MEIA
1	84,37	0,324	90,76	0,087	21,92	0,058	23,16	0,052
1:100	96,69	0,079	100,20	0,066	32,91	0,099	21,68	0,229
1:300	93,00	0,106	115,24	0,084	21,30	0,253	10,91	0,758
1:900	69,59	0,238	86,44	0,133	7,75	0,906	3,94	1,458
1:2.700	20,49	0,902	70,73	0,432	2,78	1,702	2,09	1,959
1:8.100	0,01	1,744	11,55	1,398	0,76	2,170	1,47	2,136
1:24.300	1,95	2,148	3,34	1,841	0,63	2,217	1,57	2,264
1:72.900	3,47	2,157	2,56	2,102	0,60	2,295	1,19	2,030

Tabelle 9: Verdünnungsreihen im IP und im MEIA

Hellgraue Felder: negativ getestete Verdünnungsstufe

5.2 Daten zu den HBsAg positiven, anti-HBc negativen Seren

In Kapitel 3.3 wurden die Ergebnisse zu anti-HBc negativen, HBsAg positiven Seren dargestellt. Zu diesen Seren sind in jeweils drei Tabellen die Ergebnisse aus zusätzlichen Tests (Kapitel 5.2.1) und der unterschiedlichen anti-HBc-Tests (Kapitel 5.2.2) aufgeführt.

5.2.1 Ergebnisse aus zusätzlichen Tests

Im Folgenden sind zu den Seren bekannte Daten und klinische Informationen, inklusive weiterer bekannter Serumproben der Patienten, aufgeführt.

5.2.1.1 Seren vom CHU in Bordeaux, Frankreich (F1 - F10)

In der Tabelle sind die weiteren Daten zu den Seren aus der virologischen Diagnostik des CHU aufgeführt. Im untersuchten Zeitraum fanden sich 14 Seren von 10 Patienten mit der gesuchten Konstellation (anti-HBc negativ, aber HBsAg positiv).
Von 10 Seren war ausreichend Volumen zur Testung vorhanden. Zwei weitere Seren von zwei Patienten wurden aber später noch ausgeschlossen, da bereits der MEIA in Gießen anti-HBc nachweisen konnte.

	Datum	Dauer der Infektion	Klinische Infos	anti-HBc*	HBsAg	anti-HBs	HBeAg	anti-HBe	HBV-DNA [Mcopies/ml]
F1	Jul. 04	?	HIV	-	+	-	+	-	
F2.1	Sep. 02	?		-	+	-	+	-	
F2.2	Mrz. 05			+	+	-	+	-	
F3.1	Aug. 02			+	-	-			
F3.2	Apr. 04			+	+	-	+	-	>200
F3.3	Jan. 05	> 6 m		-	+	-	+	-	
F4.1	Okt. 02	?		+	+	-	+	-	
F4.2	Nov. 02			-	+	-	+	-	
F5.1	Jun. 06	?		-	+	-	+	-	< 0,06
F5.2	Jul. 07			-	+	-	+	-	-
F6	Aug. 03	?	HIV	-	+	-	+	-	> 200
F7.1	Okt. 02			-	+	-	+	-	5,24
F7.2	Mrz. 03	5,5 m		-		-	+	-	6,71
F8.1	Jan. 03		HIV	-	+	-	+	-	
F8.2	Sep. 05	> 6 m		-	+	-	+	-	0,06
F8.3	Mrz. 06								>110
F9.1	Aug. 02		HIV	-	+	-	+	-	
F9.2	Sep. 02			-	+	-	+	-	
F9.3	Nov. 03	> 6 m		-	+	-	+	-	171
F10	Mai. 05	?		-	+	-	-	-	

Tabelle 10: Daten zu Seren vom CHU in Bordeaux, Frankreich

F1 - F10: 10 Patienten mit mindestens einem anti-HBc negativen Serum
Fettgedruckte Nummern: Anti-HBc negative Seren im untersuchten Zeitraum (14 Seren)
Anti-HBc*: EIA von Dade Behring, durchgeführt am CHU
Hellgraue Felder: Seren, von denen ausreichend Volumen zur Testung vorlag (10 Seren)
Dunkelgraue Felder: F2.1 und F5.1 wurden später im MEIA positiv für anti-HBc getestet und deshalb ausgeschlossen

5.2.1.2 Seren vom Universitätsklinikum in Gießen (D1 - D5)

Eine weitere Quelle war die virologische Diagnostik des Universitätsklinikums in Gießen.

	Datum	Dauer der Infektion	Klinische Infos	anti-HBc	HBsAg	anti-HBs	HBeAg	anti-HBe	HBV-DNA
D1.1	Okt. 99		evtl. perinatal			-			
D1.2	Jan. 02	?		-	+	-			
D2.1	Mrz. 04		Sarkom	-	+	-			+
D2.2	Apr. 04		HCV	-	+				+
D2.3	Sep. 04			-	+	-			+
D2.4	Okt. 04	> 6 m		-					+
D2.5	Jan. 05			+					+
D2.6	Feb. 05			+					+
D3.1	Jan. 01	akut	Blutspender	-	+	-			+
D3.2	Feb. 01			+	+				+
D3	2002			+	-	+		+	-
D4.1	Mrz. 99	akut	Blutspender	-	+		-		
D4.2	Nov. 99			+		+			
D5	1986-91		Sarkom	-	+		+		
D5.1	1992	> 6 m		-	+		+		
D5.2	1993			-	+				
D5.3	1994			-	+		+		
D5.4	1995			-			+		
D5.5	1997			-	+		+		
D5.6	1998			+	+		+		
D5.7	2002			+	+				

Tabelle 11: Daten zu Seren vom Uniklinikum in Gießen

D1-D5: 5 Patienten mit mindestens einem anti-HBc negativen Serum
Fettgedruckte Nummern: anti-HBc negative Seren im untersuchten Zeitraum (12 Seren)
Dunkelgraue Felder: D3 und D4 erwiesenermaßen lediglich Frühphase der Infektion, deshalb sofort ausgeschlossen
Hellgraue Felder: Seren, von denen ausreichend Volumen zur Testung vorlag (7 Seren)

5.2.1.3 Seren vom Konsiliarlabor für Hepatitis B in Gießen (K1 - K11)

	Entnahme-Datum	Dauer der Infektion	Klinische Information	anti-HBc*	HBsAg	anti-HBs	HBeAg	anti-HBe
K1	Jun. 97	?	Blutspender	-	+			-
K2	Okt. 98	?	Blutspender	-	+	-		-
K3	Dez. 99	?	LeberTX	-	+	-		-
K4.1	Nov. 92	> 6 m	Leukämie	+**	-	+		
K4.2	Sep. 94			+**	-	+		
K4.3	Okt. 95			-	+	-		
K4.4	Nov. 03			-	+	-	+	-
K5.1	1999	> 6 m	HIV	+**	+		+	
K5.2	Aug. 04			-	+		+	-
K6	Nov. 04	> 6 m	perinatal	-	+			
K7	Dez. 04	> 6 m	perinatal	-	+	-	+	-
K8.1	Nov. 05	> 6 m		-	+	-		
K8.2	Dez. 06			-	-	+		
K9.1	Feb. 02	> 6 m	perinatal	-	+		+	-
K9.2	Sep. 02			-	+	-	+	-
K9.3	Mrz. 03			-	+		+	
K9.4	Nov. 03			-	+			
K10.1	Dez. 98	> 6 m	perinatal	+***	+		+	
K10.2	Okt. 04			-	+		+	
K11.1	Apr. 01	> 6 m	perinatal	+***	+		+	
K11.2	Okt. 04			-	+		+	

Tabelle 12: Daten zu Seren aus dem Nationalen Konsilarlabor für Hepatitis B

K1-K11: 11 Patienten mit mindestens einem anti-HBc negativen Serum
Hellgraue Felder: Seren, die zur Testung vorlagen (12 Seren)
***:** Ergebnis des anti-HBc-Tests der einsendenden Institution
****:** zunächst positiver anti-HBc-Titer, später Verlust bei Immunsuppression
*****:** positiver anti-HBc-Titer kurz nach der Geburt, vermutlich Leihtiter

5.2.2 Anti-HBc (IP und MEIA im Vergleich)

Im Folgenden sind die Ergebnisse der unterschiedlichen anti-HBc-Tests aufgelistet.

5.2.2.1 Seren vom CHU in Bordeaux (F1 - F10)

Bei diesen Seren wurde in Bordeaux ein EIA zum anti-HBc-Nachweis durchgeführt. In Gießen wurde dann, falls das Volumen der Probe ausreichte, mit dem MEIA getestet. Dabei waren zwei Seren (F2.1 und F5.1) doch anti-HBc positiv und wurden von der weiteren Testung (IP und Komp. der IP) ausgeschlossen. Von vier anti-HBc negativen Seren (F7.2, F8.1, F9.1 und F9.2) war weder für die IP noch für einen MEIA ausreichend Volumen vorhanden.

	Datum		**EIA**	**MEIA**		**IP**		**Komp. der IP**	
					[S/CO]		[%]		[%vuE]
F1	Jul. 04		-	-	1,66	-	0,27		
F2.1	Sep. 02		-	+	0,94				
F2.2	Mrz. 05		+						
F3.1	Aug. 02		+						
F3.2	Apr. 04		+						
F3.3	Jan. 05		-	*		+	72,95	+	13
F4.1	Okt. 02		+						
F4.2	Nov. 02		-	*		+	8,24	+	15,6
F5.1	Jun. 06		-	+	0,51				
F5.2	Jul. 07		-						
F6	Aug. 03		-	-	1,03	+	11,53	-	120,5
F7.1	Okt. 02		-	-	1,84	-	0,14		
F7.2	Mrz. 03		-	*		*			
F8.1	Jan. 03		-	*		*			
F8.2	Sep. 05		-	-	1,7	-	0,57		
F8.3	Mrz. 06								
F9.1	Aug. 02		-	*		*			
F9.2	Sep. 02		-	*		*			
F9.3	Nov. 03		-	-	1,74	-	2,75		
F10	Mai. 05		-	-	1,86	-	3,58		

Tabelle 13: Anti-HBc-Testergebnisse (F1 - F10)

EIA: Enzym-Immunoassay, durchgeführt in Bordeaux
MEIA: Mikropartikel-Enzym-Immunoassay, durchgeführt in Gießen
[S/CO] = Sample to cut off
IP: Immunpräzipitation mit Protein G-Dynabeads und radioaktiv markiertem Capsid zum Anti-HBc-Nachweis, Phosphoimager Scan von getrocknetem SDS-PAG
[%] = Prozent vom Standardserum
Komp. der IP: Kompetition der IP mit unmarkiertem Capsid
[%vuE] = Prozent vom ursprünglichen Ergebnis

Fettgedruckte Nummern: Anti-HBc negative Seren im untersuchten Zeitraum (14 Seren)
Hellgraue Felder: Seren, von denen ausreichend Volumen zur Testung vorlag (10 Seren)
Dunkelgraue Felder: F2.1 und F5.1 wurden später im MEIA positiv für anti-HBc getestet und deshalb ausgeschlossen
***:** nicht ausreichend Volumen für diese Testung vorhanden

5.2.2.2 Seren vom Universitätsklinikum in Gießen (D1 - D5)

In der virologischen Diagnostik in Gießen wurden zunächst fünf Patienten identifiziert, bei denen mindestens ein Serum die gesuchte Konstellation (anti-HBc negativ, HBsAg bzw. HBV positiv) aufwies. Zwei der Patienten (D3 und D4) wurden dann allerdings ausgeschlossen, da weitere Serumproben zeigten, dass es sich jeweils nur um eine sehr frühe Neuinfektion handelte.

	Datum	MEIA	[S/CO]	IP	[%]	Komp. der IP	[%vuE]
D1.1	Okt. 99						
D1.2	Jan. 02	-	>1	-	3,40		
D2.1	Mrz. 04	-					
D2.2	Apr. 04	-	>1	-	1,95		
D2.3	Sep. 04	-	>1	+ / -	4,56	+	38,5
D2.4	Okt. 04	-	>1	-	0,90		
D2.5	Jan. 05	+	0,606	-	2,26		
D2.6	Feb. 05	+	0,223	+	16,83	+	8,1
D3.1	Jan. 01	-	>1	-	3,04		
D3.2	Feb. 01	+	0,435	+	111,49		
D4.1	Mrz. 99	-	>1	-	0,69		
D4.2	Nov. 99	+	0,054	+	68,94		
D5	1986-91	-	>1				
D5.1	1992	-	>1				
D5.2	1993	-	>1				
D5.3	1994	-	>1	-	2,14		
D5.4	1995	-	>1	-	1,48		
D5.5	1997	-	>1	+	16,05	+	29,0
D5.6	1998	+	0,909	+	7,36		
D5.7	2002	+	0,097	+	69,48		

Tabelle 14: Anti-HBc-Testergebnisse (D1 - D5)

MEIA: Mikropartikel-Enzym-Immunoassay
[S/CO] = Sample to cut off
IP: Immunpräzipitation mit Protein G-Dynabeads und radioaktiv markiertem Capsid zum Anti-HBc-Nachweis, Phosphoimager Scan von getrocknetem SDS-PAG
[%] = Prozent vom Standardserum
Komp. der IP: Kompetition der IP mit unmarkiertem Capsid
[%vuE] = Prozent vom ursprünglichen Ergebnis

Dunkelgraue Felder: D3 und D4 erwiesenermaßen lediglich Frühphase der Infektion, deshalb sofort ausgeschlossen
Fettgedruckte Nummern: unklar anti-HBc negative Seren im untersuchten Zeitraum (10 Seren)
Hellgraue Felder: Seren, von denen ausreichend Volumen zur Testung vorlag (7 Seren)

5.2.2.3 Seren vom Konsiliarlabor für Hepatitis B in Gießen (K1 - K11)

Bei den Seren vom Nationalen Konsiliarlabor für Hepatitis B handelt es sich um Seren, die von verschiedenen Orten in Deutschland zur weiteren Beurteilung nach Gießen gesandt wurden. Deshalb ist in der folgenden Tabelle unter anti-HBc zunächst der Ort des anti-HBc-Tests, dann das Testergebnis (positiv oder negativ) und dann falls bekannt die Art des einsetzten Tests und das Testergebnis in Zahlen angegeben.

	Datum	**anti-HBc**				**IP**		**Komp. der IP**	
		Ort		Art	[S/CO]		[%]		[%vuE]
K1	Jun. 97	Gießen	-	MEIA	1,56	-	0,12		
K2	Okt. 98	Gießen	-	MEIA	1,76	+ / -	4,16	-	118,4
K3	Dez. 99	Gießen	-	MEIA	1,26	+ / -	4,00	-	96,0
K4.1	Nov. 92	Homburg	+	MEIA	>1				
K4.2	Sep. 94	Homburg	+	MEIA	>1				
K4.3	Okt. 95	Homburg	-	MEIA	>1	+	18,48	-	86,3
K4.4	Nov. 03	Homburg	-	MEIA	>1	-	1,91		
K5.1	1999	Heidelberg	+						
K5.2	Aug. 04	Heidelberg	-	MEIA	<1	-	2,83		
K6	Nov. 04	Oeynhausen	-			-	3,43		
K7	Dez. 04	Saarbrücken	-	MEIA	>1	-	2,10		
K8.1	Nov. 05	Köln	-						
K8.2	Dez. 06	Gießen	-	MEIA	1,91	-	2,40		
K9.1	Feb. 02	Diepholz	-						
K9.2	Sep. 02	Diepholz	-						
K9.3	Mrz. 03	Diepholz	-						
K9.4	Nov. 03	Gießen	-	MEIA	1,33	+ / -	4,7	*	
K10.1	Dez. 98	Münster	+						
K10.2	Okt. 04	Münster	-			+	17,9	*	
K11.1	Apr. 01	Münster	+						
K11.2	Okt. 04	Münster	-			+	36,3	*	

Tabelle 15: Anti-HBc-Testergebnisse (K1 - K11)

Anti-HBc: kommerziell erhältlicher Assay der einsendenden Institution
[S/CO] = Sample to cut off
IP: Immunpräzipitation mit Protein G-Dynabeads und radioaktiv markiertem Capsid zum Anti-HBc-Nachweis, Phosphoimager Scan von getrocknetem SDS-PAG
[%] = Prozent vom Standardserum
Komp. der IP: Kompetition der IP mit unmarkiertem Capsid
[%vuE] = Prozent vom ursprünglichen Ergebnis

Hellgraue Felder: Seren, die zur Testung vorlagen
***:** nicht ausreichend Volumen für die Kompetition vorhanden

Literaturverzeichnis

Acs, G., M. A. Sells, R. H. Purcell, P. Price, R. Engle, M. Shapiro and H. Popper (1987). "Hepatitis B virus produced by transfected Hep G2 cells causes hepatitis in chimpanzees." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(13): 4641-4.

Albin, C. and W. S. Robinson (1980). "Protein kinase activity in hepatitis B virus." J Virol **34**(1): 297-302.

Allain, J. P. (2004). "Occult hepatitis B virus infection: implications in transfusion." Vox Sang **86**(2): 83-91.

Almeida, J. D., D. Rubenstein and E. J. Stott (1971). "New antigen-antibody system in Australia-antigen-positive hepatitis." Lancet **2**(7736): 1225-7.

Alter, M. J. (2003). "Epidemiology of hepatitis B in Europe and worldwide." J Hepatol **39 Suppl 1**: S64-9.

Alward, W. L., B. J. McMahon, D. B. Hall, W. L. Heyward, D. P. Francis and T. R. Bender (1985). "The long-term serological course of asymptomatic hepatitis B virus carriers and the development of primary hepatocellular carcinoma." J Infect Dis **151**(4): 604-9.

Aoki, S. K., D. Finegold, I. K. Kuramoto, C. Douville, C. Richards, R. Randell, L. Fernando, P. V. Holland and J. B. Zeldis (1993). "Significance of antibody to hepatitis B core antigen in blood donors as determined by their serologic response to hepatitis B vaccine." Transfusion **33**(5): 362-7.

Avettand-Fenoel, V., D. Thabut, C. Katlama, T. Poynard and V. Thibault (2006). "Immune suppression as the etiology of failure to detect anti-HBc antibodies in patients with chronic hepatitis B virus infection." J Clin Microbiol **44**(6): 2250-3.

Awerkiew, S., M. Daumer, M. Reiser, U. C. Wend, H. Pfister, R. Kaiser, W. R. Willems and W. H. Gerlich (2007). "Reactivation of an occult hepatitis B virus escape mutant in an anti-HBs positive, anti-HBc negative lymphoma patient." J Clin Virol **38**(1): 83-6.

Bartenschlager, R., M. Junker-Niepmann and H. Schaller (1990). "The P gene product of hepatitis B virus is required as a structural component for genomic RNA encapsidation." J Virol **64**(11): 5324-32.

Baumeister, M. A., A. Medina-Selby, D. Coit, S. Nguyen, C. George-Nascimento, A. Gyenes, P. Valenzuela, G. Kuo and D. Y. Chien (2000). "Hepatitis B virus e

antigen specific epitopes and limitations of commercial anti-HBe immunoassays." J Med Virol **60**(3): 256-63.

Beasley, R. P., L. Y. Hwang, C. C. Lin and C. S. Chien (1981). "Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22 707 men in Taiwan." Lancet **2**(8256): 1129-33.

Beck, J. and M. Nassal (2001). "Reconstitution of a functional duck hepatitis B virus replication initiation complex from separate reverse transcriptase domains expressed in Escherichia coli." J Virol **75**(16): 7410-9.

Beck, J. and M. Nassal (2007). "Hepatitis B virus replication." World J Gastroenterol **13**(1): 48-64.

Belnap, D. M., N. R. Watts, J. F. Conway, N. Cheng, S. J. Stahl, P. T. Wingfield and A. C. Steven (2003). "Diversity of core antigen epitopes of hepatitis B virus." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(19): 10884-9.

Berting, A., C. Fischer, S. Schaefer, W. Garten, H. D. Klenk and W. H. Gerlich (2000). "Hemifusion activity of a chimeric influenza virus hemagglutinin with a putative fusion peptide from hepatitis B virus." Virus Res **68**(1): 35-49.

Bertoletti, A. and A. J. Gehring (2006). "The immune response during hepatitis B virus infection." J Gen Virol **87**(Pt 6): 1439-49.

Blumberg, B. S., H. J. Alter and S. Visnich (1965). "A "New" Antigen in Leukemia Sera." JAMA **191**: 541-6.

Blumberg, B. S., B. J. Gerstley, D. A. Hungerford, W. T. London and A. I. Sutnick (1967). "A serum antigen (Australia antigen) in Down's syndrome, leukemia, and hepatitis." Ann Intern Med **66**(5): 924-31.

Bock, C. T., S. Schwinn, S. Locarnini, J. Fyfe, M. P. Manns, C. Trautwein and H. Zentgraf (2001). "Structural organization of the hepatitis B virus minichromosome." J Mol Biol **307**(1): 183-96.

Breiner, K. M., S. Urban and H. Schaller (1998). "Carboxypeptidase D (gp180), a Golgi-resident protein, functions in the attachment and entry of avian hepatitis B viruses." J Virol **72**(10): 8098-104.

Bruss, V. (1997). "A short linear sequence in the pre-S domain of the large hepatitis B virus envelope protein required for virion formation." J Virol **71**(12): 9350-7.

Bruss, V., X. Lu, R. Thomssen and W. H. Gerlich (1994). "Post-translational alterations in transmembrane topology of the hepatitis B virus large envelope protein." EMBO J **13**(10): 2273-9.

Carey, W. D. (2009). "The prevalence and natural history of hepatitis B in the 21st century." Cleve Clin J Med **76 Suppl 3**: S2-5.

Caspari, G., H. J. Beyer, G. Elbert, K. Koerner, P. Muss, F. W. Schunter, A. Uy, W. Gerlich, R. Thomssen and H. Schmitt (1989). "Unsatisfactory specificities and sensitivities of six enzyme immunoassays for antibodies to hepatitis B core antigen." J Clin Microbiol **27**(9): 2067-72.

Ceres, P. and A. Zlotnick (2002). "Weak protein-protein interactions are sufficient to drive assembly of hepatitis B virus capsids." Biochemistry **41**(39): 11525-31.

Chain, B. M. and R. Myers (2005). "Variability and conservation in hepatitis B virus core protein." BMC Microbiol **5**: 33.

Charnay, P., C. Pourcel, A. Louise, A. Fritsch and P. Tiollais (1979). "Cloning in Escherichia coli and physical structure of hepatitis B virion DNA." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(5): 2222-6.

Chen, C. H., C. S. Changchien, C. M. Lee, W. C. Tung, C. H. Hung, T. H. Hu, J. H. Wang, J. C. Wang and S. N. Lu (2009). "A study on sequence variations in pre-S/surface, X and enhancer II/core promoter/precore regions of occult hepatitis B virus in non-B, non-C hepatocellular carcinoma patients in Taiwan." Int J Cancer **125**(3): 621-9.

Chen, H. S., S. Kaneko, R. Girones, R. W. Anderson, W. E. Hornbuckle, B. C. Tennant, P. J. Cote, J. L. Gerin, R. H. Purcell and R. H. Miller (1993). "The woodchuck hepatitis virus X gene is important for establishment of virus infection in woodchucks." J Virol **67**(3): 1218-26.

Chen, H. S., M. C. Kew, W. E. Hornbuckle, B. C. Tennant, P. J. Cote, J. L. Gerin, R. H. Purcell and R. H. Miller (1992). "The precore gene of the woodchuck hepatitis virus genome is not essential for viral replication in the natural host." J Virol **66**(9): 5682-4.

Cherrington, J., R. Russnak and D. Ganem (1992). "Upstream sequences and cap proximity in the regulation of polyadenylation in ground squirrel hepatitis virus." J Virol **66**(12): 7589-96.

Chisari, F. V. and C. Ferrari (1995). "Hepatitis B virus immunopathology." Springer Semin Immunopathol **17**(2-3): 261-81.

Chulanov, V. P., G. A. Shipulin, S. Schaefer and W. H. Gerlich (2003). "Kinetics of HBV DNA and HBsAg in acute hepatitis B patients with and without coinfection by other hepatitis viruses." J Med Virol **69**(3): 313-23.

Conway, J. F., N. Cheng, A. Zlotnick, S. J. Stahl, P. T. Wingfield, D. M. Belnap, U. Kanngiesser, M. Noah and A. C. Steven (1998). "Hepatitis B virus capsid: localization of the putative immunodominant loop (residues 78 to 83) on the capsid surface, and implications for the distinction between c and e-antigens." J Mol Biol **279**(5): 1111-21.

Coursaget, P., B. Yvonnet, C. Bourdil, Y. Buisson, J. Chotard, R. N'Doye, C. Molinie, I. Diop-Mar and J. P. Chiron (1990). "Hepatitis B surface antigen reactivity in man due to a new variant of hepatitis B virus." Vaccine **8 Suppl**: S15-7; discussion S21-3.

Crowther, R. A., N. A. Kiselev, B. Bottcher, J. A. Berriman, G. P. Borisova, V. Ose and P. Pumpens (1994). "Three-dimensional structure of hepatitis B virus core particles determined by electron cryomicroscopy." Cell **77**(6): 943-50.

Dane, D. S., C. H. Cameron and M. Briggs (1970). "Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis." Lancet **1**(7649): 695-8.

Daub, H., S. Blencke, P. Habenberger, A. Kurtenbach, J. Dennenmoser, J. Wissing, A. Ullrich and M. Cotten (2002). "Identification of SRPK1 and SRPK2 as the major cellular protein kinases phosphorylating hepatitis B virus core protein." J Virol **76**(16): 8124-37.

Duclos-Vallee, J. C., F. Capel, H. Mabit and M. A. Petit (1998). "Phosphorylation of the hepatitis B virus core protein by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase protein kinase activity." J Gen Virol **79 (Pt 7)**: 1665-70.

Fernholz, D., P. R. Galle, M. Stemler, M. Brunetto, F. Bonino and H. Will (1993). "Infectious hepatitis B virus variant defective in pre-S2 protein expression in a chronic carrier." Virology **194**(1): 137-48.

Ferrari, C., A. Bertoletti, A. Penna, A. Cavalli, A. Valli, G. Missale, M. Pilli, P. Fowler, T. Giuberti, F. V. Chisari and et al. (1991). "Identification of immunodominant T cell epitopes of the hepatitis B virus nucleocapsid antigen." J Clin Invest **88**(1): 214-22.

Fiordalisi, G., D. Primi, E. Tanzi, E. Magni, C. Incarbone, A. R. Zanetti and E. Cariani (1994). "Hepatitis B virus C gene heterogeneity in a familial cluster of anti-HBc negative chronic carriers." J Med Virol **42**(2): 109-14.

Funk, A., M. Mhamdi, L. Lin, H. Will and H. Sirma (2004). "Itinerary of hepatitis B viruses: delineation of restriction points critical for infectious entry." J Virol **78**(15): 8289-300.

Gallina, A., F. Bonelli, L. Zentilin, G. Rindi, M. Muttini and G. Milanesi (1989). "A recombinant hepatitis B core antigen polypeptide with the protamine-like domain deleted self-assembles into capsid particles but fails to bind nucleic acids." J Virol **63**(11): 4645-52.

Ganem, D. and A. M. Prince (2004). "Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences." N Engl J Med **350**(11): 1118-29.

Gartner, B. C., W. Jung, C. Welsch, J. Fischinger, J. Schubert, S. Zeuzem, N. Mueller-Lantzsch, U. C. Wend and W. H. Gerlich (2007). "Permanent loss of anti-HBc after reactivation of hepatitis B virus infection in an anti-HBs and anti-HBc-positive patient after allogeneic stem cell transplantation." J Clin Virol **38**(2): 146-8.

Gazina, E. V., J. E. Fielding, B. Lin and D. A. Anderson (2000). "Core protein phosphorylation modulates pregenomic RNA encapsidation to different extents in human and duck hepatitis B viruses." J Virol **74**(10): 4721-8.

Gerelsaikhan, T., J. E. Tavis and V. Bruss (1996). "Hepatitis B virus nucleocapsid envelopment does not occur without genomic DNA synthesis." J Virol **70**(7): 4269-74.

Gerlich, W. H., U. Goldmann, R. Muller, W. Stibbe and W. Wolff (1982). "Specificity and localization of the hepatitis B virus-associated protein kinase." J Virol **42**(3): 761-6.

Gerlich, W. H. and W. S. Robinson (1980). "Hepatitis B virus contains protein attached to the 5' terminus of its complete DNA strand." Cell **21**(3): 801-9.

Gerlich, W. H. a. S., S. (2002). Hepadnaviren: Hepatitis-B-Virus. Medizinische Virologie. H. W. a. G. Doerr, W. H. Stuttgart, Georg Thieme Verlag**:** 191-210.

Glebe, D., M. Aliakbari, P. Krass, E. V. Knoop, K. P. Valerius and W. H. Gerlich (2003). "Pre-s1 antigen-dependent infection of Tupaia hepatocyte cultures with human hepatitis B virus." J Virol **77**(17): 9511-21.

Guidotti, L. G. and F. V. Chisari (1996). "To kill or to cure: options in host defense against viral infection." Curr Opin Immunol **8**(4): 478-83.

Guidotti, L. G. and F. V. Chisari (2001). "Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response." Annu Rev Immunol **19**: 65-91.

Harris, A., D. M. Belnap, N. R. Watts, J. F. Conway, N. Cheng, S. J. Stahl, J. G. Vethanayagam, P. T. Wingfield and A. C. Steven (2006). "Epitope diversity of

hepatitis B virus capsids: quasi-equivalent variations in spike epitopes and binding of different antibodies to the same epitope." J Mol Biol **355**(3): 562-76.

Herold, G. (2005). Innere Medizin. Köln, Gerd Herold.

Hertogs, K., W. P. Leenders, E. Depla, W. C. De Bruin, L. Meheus, J. Raymackers, H. Moshage and S. H. Yap (1993). "Endonexin II, present on human liver plasma membranes, is a specific binding protein of small hepatitis B virus (HBV) envelope protein." Virology **197**(2): 549-57.

Hirsch, R. C., J. E. Lavine, L. J. Chang, H. E. Varmus and D. Ganem (1990). "Polymerase gene products of hepatitis B viruses are required for genomic RNA packaging as wel as for reverse transcription." Nature **344**(6266): 552-5.

Hoofnagle, J. H., R. J. Gerety and L. F. Barker (1973). "Antibody to hepatitis-B-virus core in man." Lancet **2**(7834): 869-73.

Hu, J., D. Toft, D. Anselmo and X. Wang (2002). "In vitro reconstitution of functional hepadnavirus reverse transcriptase with cellular chaperone proteins." J Virol **76**(1): 269-79.

Hu, J., D. O. Toft and C. Seeger (1997). "Hepadnavirus assembly and reverse transcription require a multi-component chaperone complex which is incorporated into nucleocapsids." EMBO J **16**(1): 59-68.

Huang, J. and T. J. Liang (1993). "A novel hepatitis B virus (HBV) genetic element with Rev response element-like properties that is essential for expression of HBV gene products." Mol Cell Biol **13**(12): 7476-86.

Jeng, K. S., C. P. Hu and C. M. Chang (1991). "Differential formation of disulfide linkages in the core antigen of extracellular and intracellular hepatitis B virus core particles." J Virol **65**(7): 3924-7.

Jilbert, A. R., C. J. Burrell, M. Triyatni and M. Kann (2002). "Hepatitis B Virus." International medical press, London, Atlanta.

Jung, M. C., H. M. Diepolder, U. Spengler, E. A. Wierenga, R. Zachoval, R. M. Hoffmann, D. Eichenlaub, G. Frosner, H. Will and G. R. Pape (1995). "Activation of a heterogeneous hepatitis B (HB) core and e antigen-specific CD4+ T-cell population during seroconversion to anti-HBe and anti-HBs in hepatitis B virus infection." J Virol **69**(6): 3358-68.

Junker-Niepmann, M., R. Bartenschlager and H. Schaller (1990). "A short cis-acting sequence is required for hepatitis B virus pregenome encapsidation and sufficient for packaging of foreign RNA." EMBO J **9**(10): 3389-96.

Kalams, S. A. and B. D. Walker (1998). "The critical need for CD4 help in maintaining effective cytotoxic T lymphocyte responses." J Exp Med **188**(12): 2199-204.

Kann, M. and W. H. Gerlich (1994). "Effect of core protein phosphorylation by protein kinase C on encapsidation of RNA within core particles of hepatitis B virus." J Virol **68**(12): 7993-8000.

Kann, M. and W. H. Gerlich (2005). Hepatitis B. Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections. C. L. e. al. London.

Kann, M., B. Sodeik, A. Vlachou, W. H. Gerlich and A. Helenius (1999). "Phosphorylation-dependent binding of hepatitis B virus core particles to the nuclear pore complex." J Cell Biol **145**(1): 45-55.

Kann, M., R. Thomssen, H. G. Kochel and W. H. Gerlich (1993). "Characterization of the endogenous protein kinase activity of the hepatitis B virus." Arch Virol Suppl **8**: 53-62.

Kaplan, P. M., R. L. Greenman, J. L. Gerin, R. H. Purcell and W. S. Robinson (1973). "DNA polymerase associated with human hepatitis B antigen." J Virol **12**(5): 995-1005.

Kau, J. H. and L. P. Ting (1998). "Phosphorylation of the core protein of hepatitis B virus by a 46-kilodalton serine kinase." J Virol **72**(5): 3796-803.

Kenney, J. M., C. H. von Bonsdorff, M. Nassal and S. D. Fuller (1995). "Evolutionary conservation in the hepatitis B virus core structure: comparison of human and duck cores." Structure **3**(10): 1009-19.

Kock, J., E. M. Borst and H. J. Schlicht (1996). "Uptake of duck hepatitis B virus into hepatocytes occurs by endocytosis but does not require passage of the virus through an acidic intracellular compartment." J Virol **70**(9): 5827-31.

Kock, J., M. Kann, G. Putz, H. E. Blum and F. Von Weizsacker (2003). "Central role of a serine phosphorylation site within duck hepatitis B virus core protein for capsid trafficking and genome release." J Biol Chem **278**(30): 28123-9.

Kock, J., M. Nassal, S. MacNelly, T. F. Baumert, H. E. Blum and F. von Weizsacker (2001). "Efficient infection of primary tupaia hepatocytes with purified human and woolly monkey hepatitis B virus." J Virol **75**(11): 5084-9.

Kuroki, K., F. Eng, T. Ishikawa, C. Turck, F. Harada and D. Ganem (1995). "gp180, a host cell glycoprotein that binds duck hepatitis B virus particles, is encoded by a member of the carboxypeptidase gene family." J Biol Chem **270**(25): 15022-8.

Lai, M. M. (1995). "The molecular biology of hepatitis delta virus." Annu Rev Biochem **64**: 259-86.

Lambert, C. and R. Prange (2003). "Chaperone action in the posttranslational topological reorientation of the hepatitis B virus large envelope protein: Implications for translocational regulation." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(9): 5199-204.

Lan, Y. T., J. Li, W. Liao and J. Ou (1999). "Roles of the three major phosphorylation sites of hepatitis B virus core protein in viral replication." Virology **259**(2): 342-8.

Landers, T. A., H. B. Greenberg and W. S. Robinson (1977). "Structure of hepatitis B Dane particle DNA and nature of the endogenous DNA polymerase reaction." J Virol **23**(2): 368-76.

Laperche, S., C. Guitton, W. Smilovici and A. M. Courouce (2001). "Blood donors infected with the hepatitis B virus but persistently lacking antibodies to the hepatitis B core antigen." Vox Sang **80**(2): 90-4.

Lee, J. H., T. G. Paglieroni, P. V. Holland and J. B. Zeldis (1992). "Chronic hepatitis B virus infection in an anti-HBc-nonreactive blood donor: variant virus or defective immune response?" Hepatology **16**(1): 24-30.

Lee, S. D., K. J. Lo, Y. T. Tsai, J. C. Wu and T. C. Wu (1989). "HBsAg carrier infants with serum anti-HBc negativity." Hepatology **9**(1): 102-4.

Leistner, C. M., S. Gruen-Bernhard and D. Glebe (2008). "Role of glycosaminoglycans for binding and infection of hepatitis B virus." Cell Microbiol **10**(1): 122-33.

Lürmann, A. (1885). "Eine Icterusepidemie." Berl Klin Wochenschr **22**: 20-3.

Maeng, C. Y., C. J. Ryu, P. Gripon, C. Guguen-Guillouzo and H. J. Hong (2000). "Fine mapping of virus-neutralizing epitopes on hepatitis B virus PreS1." Virology **270**(1): 9-16.

Magnius, L. O. and A. Espmark (1972). "A new antigen complex co-occurring with Australia antigen." Acta Pathol Microbiol Scand [B] Microbiol Immunol **80**(2): 335-7.

Mehdi, H., M. J. Kaplan, F. Y. Anlar, X. Yang, R. Bayer, K. Sutherland and M. E. Peeples (1994). "Hepatitis B virus surface antigen binds to apolipoprotein H." J Virol **68**(4): 2415-24.

Melegari, M., M. C. Jung, R. Schneider, T. Santantonio, S. Bagnulo, N. Luchena, G. Pastore, G. Pape, P. P. Scaglioni, E. Villa and et al. (1991). "Conserved core protein sequences in hepatitis B virus infected patients without anti-HBc." J Hepatol **13**(2): 187-91.

Milich, D. and T. J. Liang (2003). "Exploring the biological basis of hepatitis B e antigen in hepatitis B virus infection." Hepatology **38**(5): 1075-86.

Milich, D. R., M. Chen, F. Schodel, D. L. Peterson, J. E. Jones and J. L. Hughes (1997). "Role of B cells in antigen presentation of the hepatitis B core." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(26): 14648-53.

Milich, D. R., J. E. Jones, J. L. Hughes, J. Price, A. K. Raney and A. McLachlan (1990). "Is a function of the secreted hepatitis B e antigen to induce immunologic tolerance in utero?" Proc Natl Acad Sci U S A **87**(17): 6599-603.

Milich, D. R. and A. McLachlan (1986). "The nucleocapsid of hepatitis B virus is both a T-cell-independent and a T-cell-dependent antigen." Science **234**(4782): 1398-401.

Milich, D. R., A. McLachlan, A. Moriarty and G. B. Thornton (1987). "Immune response to hepatitis B virus core antigen (HBcAg): localization of T cell recognition sites within HBcAg/HBeAg." J Immunol **139**(4): 1223-31.

Milich, D. R., F. Schodel, J. L. Hughes, J. E. Jones and D. L. Peterson (1997). "The hepatitis B virus core and e antigens elicit different Th cell subsets: antigen structure can affect Th cell phenotype." J Virol **71**(3): 2192-201.

Moller, B., U. Hopf, R. Stemerowicz, G. Henze and H. Gelderblom (1989). "HBcAg expressed on the surface of circulating Dane particles in patients with hepatitis B virus infection without evidence of anti-HBc formation." Hepatology **10**(2): 179-85.

Nassal, M. (1992). "The arginine-rich domain of the hepatitis B virus core protein is required for pregenome encapsidation and productive viral positive-strand DNA synthesis but not for virus assembly." J Virol **66**(7): 4107-16.

Nassal, M. (1992). "Conserved cysteines of the hepatitis B virus core protein are not required for assembly of replication-competent core particles nor for their envelopment." Virology **190**(1): 499-505.

Nassal, M., A. Rieger and O. Steinau (1992). "Topological analysis of the hepatitis B virus core particle by cysteine-cysteine cross-linking." J Mol Biol **225**(4): 1013-25.

Neurath, A. R., S. B. Kent, N. Strick and K. Parker (1986). "Identification and chemical synthesis of a host cell receptor binding site on hepatitis B virus." Cell **46**(3): 429-36.

Neurath, A. R., N. Strick and P. Sproul (1992). "Search for hepatitis B virus cell receptors reveals binding sites for interleukin 6 on the virus envelope protein." J Exp Med **175**(2): 461-9.

Ni, Y. H., H. Y. Hsu, M. H. Chang, D. S. Chen and C. Y. Lee (1993). "Absence or delayed appearance of hepatitis B core antibody in chronic hepatitis B surface antigen carrier children." J Hepatol **17**(2): 150-4.

Niederau, C., T. Heintges, S. Lange, G. Goldmann, C. M. Niederau, L. Mohr and D. Haussinger (1996). "Long-term follow-up of HBeAg-positive patients treated with interferon alfa for chronic hepatitis B." N Engl J Med **334**(22): 1422-7.

Norder, H., A. M. Courouce, P. Coursaget, J. M. Echevarria, S. D. Lee, I. K. Mushahwar, B. H. Robertson, S. Locarnini and L. O. Magnius (2004). "Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes." Intervirology **47**(6): 289-309.

Owada, T., K. Matsubayashi, H. Sakata, H. Ihara, S. Sato, K. Ikebuchi, T. Kato, H. Azuma and H. Ikeda (2006). "Interaction between desialylated hepatitis B virus and asialoglycoprotein receptor on hepatocytes may be indispensable for viral binding and entry." J Viral Hepat **13**(1): 11-8.

Pante, N. and M. Kann (2002). "Nuclear pore complex is able to transport macromolecules with diameters of about 39 nm." Mol Biol Cell **13**(2): 425-34.

PEI. (2009). "Paul-Ehrlich-Institut " http://www.pei.de.

Perz, J. F., G. L. Armstrong, L. A. Farrington, Y. J. Hutin and B. P. Bell (2006). "The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide." J Hepatol **45**(4): 529-38.

Pollicino, T., G. Raffa, L. Costantino, A. Lisa, C. Campello, G. Squadrito, M. Levrero and G. Raimondo (2007). "Molecular and functional analysis of occult hepatitis B virus isolates from patients with hepatocellular carcinoma." Hepatology **45**(2): 277-85.

Ponde, R. A., D. D. Cardoso and M. O. Ferro "The underlying mechanisms for the 'anti-HBc alone' serological profile." Arch Virol **155**(2): 149-58.

Ponsel, D. and V. Bruss (2003). "Mapping of amino acid side chains on the surface of hepatitis B virus capsids required for envelopment and virion formation." J Virol **77**(1): 416-22.

Pontisso, P., M. G. Ruvoletto, W. H. Gerlich, K. H. Heermann, R. Bardini and A. Alberti (1989). "Identification of an attachment site for human liver plasma membranes on hepatitis B virus particles." Virology **173**(2): 522-30.

Pushko, P., M. Sallberg, G. Borisova, U. Ruden, V. Bichko, B. Wahren, P. Pumpens and L. Magnius (1994). "Identification of hepatitis B virus core protein regions exposed or internalized at the surface of HBcAg particles by scanning with monoclonal antibodies." Virology **202**(2): 912-20.

Rabe, B., M. Delaleau, A. Bischof, M. Foss, I. Sominskaya, P. Pumpens, C. Cazenave, M. Castroviejo and M. Kann (2009). "Nuclear entry of hepatitis B virus capsids involves disintegration to protein dimers followed by nuclear reassociation to capsids." PLoS Pathog **5**(8): e1000563.

Rabe, B., D. Glebe and M. Kann (2006). "Lipid-mediated introduction of hepatitis B virus capsids into nonsusceptible cells allows highly efficient replication and facilitates the study of early infection events." J Virol **80**(11): 5465-73.

Rabe, B., A. Vlachou, N. Pante, A. Helenius and M. Kann (2003). "Nuclear import of hepatitis B virus capsids and release of the viral genome." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(17): 9849-54.

Raimondo, G., G. Navarra, S. Mondello, L. Costantino, G. Colloredo, E. Cucinotta, G. Di Vita, C. Scisca, G. Squadrito and T. Pollicino (2008). "Occult hepatitis B virus in liver tissue of individuals without hepatic disease." J Hepatol **48**(5): 743-6.

Raimondo, G., T. Pollicino, I. Cacciola and G. Squadrito (2007). "Occult hepatitis B virus infection." J Hepatol **46**(1): 160-70.

Rehermann, B., C. Ferrari, C. Pasquinelli and F. V. Chisari (1996). "The hepatitis B virus persists for decades after patients' recovery from acute viral hepatitis despite active maintenance of a cytotoxic T-lymphocyte response." Nat Med **2**(10): 1104-8.

Repp, R., C. Keller, A. Borkhardt, A. Csecke, S. Schaefer, W. H. Gerlich and F. Lampert (1992). "Detection of a hepatitis B virus variant with a truncated X gene and enhancer II." Arch Virol **125**(1-4): 299-304.

RKI (2010). Virushepatitis B, C und D im Jahr 2009. Epidemiologisches Bulletin, Robert Koch Institut. **Nr. 20**.

Robinson, W. S., D. A. Clayton and R. L. Greenman (1974). "DNA of a human hepatitis B virus candidate." J Virol **14**(2): 384-91.

Salfeld, J., E. Pfaff, M. Noah and H. Schaller (1989). "Antigenic determinants and functional domains in core antigen and e antigen from hepatitis B virus." J Virol **63**(2): 798-808.

Sallberg, M., P. Pushko, I. Berzinsh, V. Bichko, P. Sillekens, M. Noah, P. Pumpens, E. Grens, B. Wahren and L. O. Magnius (1993). "Immunochemical structure of the carboxy-terminal part of hepatitis B e antigen: identification of internal and surface-exposed sequences." J Gen Virol **74 (Pt 7)**: 1335-40.

Schaefer, S. (2007). "Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes." World J Gastroenterol **13**(1): 14-21.

Schaefer, S. and W. H. Gerlich (2007). Structure, replication and laboratory diagnosis of HBV and HDV. The textbook of hepatology: form basic science to clinical practice. J. P. Benhamou, R. Rizzetto, R. Reichenet al. Oxford, Blackwell Publishing**:** 823-49.

Schlicht, H. J. and H. Schaller (1989). "Analysis of hepatitis B virus gene functions in tissue culture and in vivo." Curr Top Microbiol Immunol **144**: 253-63.

Schmitz, A., A. Schwarz, M. Foss, L. Zhou, B. Rabe, J. Hoellenriegel, M. Stoeber, N. Pante and M. Kann "Nucleoporin 153 arrests the nuclear import of hepatitis B virus capsids in the nuclear basket." PLoS Pathog **6**(1): e1000741.

Seifer, M. and D. N. Standring (1994). "A protease-sensitive hinge linking the two domains of the hepatitis B virus core protein is exposed on the viral capsid surface." J Virol **68**(9): 5548-55.

Seitz, S., S. Urban, C. Antoni and B. Bottcher (2007). "Cryo-electron microscopy of hepatitis B virions reveals variability in envelope capsid interactions." EMBO J **26**(18): 4160-7.

Sells, M. A., M. L. Chen and G. Acs (1987). "Production of hepatitis B virus particles in Hep G2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(4): 1005-9.

Shikata, T., T. Karasawa, K. Abe, T. Uzawa, H. Suzuki, T. Oda, M. Imai, M. Mayumi and Y. Moritsugu (1977). "Hepatitis B e antigen and infectivity of hepatitis B virus." J Infect Dis **136**(4): 571-6.

Southern, E. M. (1975). "Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis." J Mol Biol **98**(3): 503-17.

Spandau, D. F. and C. H. Lee (1988). "trans-activation of viral enhancers by the hepatitis B virus X protein." J Virol **62**(2): 427-34.

Stahl, S., P. MacKay, M. Magazin, S. A. Bruce and K. Murray (1982). "Hepatitis B virus core antigen: synthesis in Escherichia coli and application in diagnosis." Proc Natl Acad Sci U S A **79**(5): 1606-10.

Summers, J. and W. S. Mason (1982). "Replication of the genome of a hepatitis B--like virus by reverse transcription of an RNA intermediate." Cell **29**(2): 403-15.

Thimme, R., S. Wieland, C. Steiger, J. Ghrayeb, K. A. Reimann, R. H. Purcell and F. V. Chisari (2003). "CD8(+) T cells mediate viral clearance and disease pathogenesis during acute hepatitis B virus infection." J Virol **77**(1): 68-76.

Tillmann, H. L., J. Hadem, L. Leifeld, K. Zachou, A. Canbay, C. Eisenbach, I. Graziadei, J. Encke, H. Schmidt, W. Vogel, A. Schneider, U. Spengler, G. Gerken, G. N. Dalekos, H. Wedemeyer and M. P. Manns (2006). "Safety and efficacy of lamivudine in patients with severe acute or fulminant hepatitis B, a multicenter experience." J Viral Hepat **13**(4): 256-63.

Toh, H., H. Hayashida and T. Miyata (1983). "Sequence homology between retroviral reverse transcriptase and putative polymerases of hepatitis B virus and cauliflower mosaic virus." Nature **305**(5937): 827-9.

Tordjeman, M., G. Fontan, V. Rabillon, J. Martin, C. Trepo, A. Hoffenbach, K. Mabrouk, J. M. Sabatier, J. Van Rietschoten and G. Somme (1993). "Characterization of minor and major antigenic regions within the hepatitis B virus nucleocapsid." J Med Virol **41**(3): 221-9.

Tordjeman, M., V. Rabillon, D. Abouth, C. Trepo, A. Hoffenbach and G. Somme (1993). "Specific detection of anti-HBc antibodies with an enzyme immunoassay using recombinant HBcAg and monoclonal antibodies." J Virol Methods **43**(1): 21-30.

Torre, F., M. Cramp, A. Owsianka, E. Dornan, H. Marsden, W. Carman, R. Williams and N. V. Naoumov (2004). "Direct evidence that naturally occurring mutations within hepatitis B core epitope alter CD4+ T-cell reactivity." J Med Virol **72**(3): 370-6.

Treichel, U., K. H. Meyer zum Buschenfelde, R. J. Stockert, T. Poralla and G. Gerken (1994). "The asialoglycoprotein receptor mediates hepatic binding and uptake

of natural hepatitis B virus particles derived from viraemic carriers." J Gen Virol **75 (Pt 11)**: 3021-9.

Tuttleman, J. S., C. Pourcel and J. Summers (1986). "Formation of the pool of covalently closed circular viral DNA in hepadnavirus-infected cells." Cell **47**(3): 451-60.

Urban, S., C. Schwarz, U. C. Marx, H. Zentgraf, H. Schaller and G. Multhaup (2000). "Receptor recognition by a hepatitis B virus reveals a novel mode of high affinity virus-receptor interaction." EMBO J **19**(6): 1217-27.

Vanlandschoot, P., T. Cao and G. Leroux-Roels (2003). "The nucleocapsid of the hepatitis B virus: a remarkable immunogenic structure." Antiviral Res **60**(2): 67-74.

Wang, G. H. and C. Seeger (1993). "Novel mechanism for reverse transcription in hepatitis B viruses." J Virol **67**(11): 6507-12.

Wang, Z., J. Zhang, H. Yang, X. Li, S. Wen, Y. Guo, J. Sun and J. Hou (2003). "Quantitative analysis of HBV DNA level and HBeAg titer in hepatitis B surface antigen positive mothers and their babies: HBeAg passage through the placenta and the rate of decay in babies." J Med Virol **71**(3): 360-6.

Watanabe, T., E. M. Sorensen, A. Naito, M. Schott, S. Kim and P. Ahlquist (2007). "Involvement of host cellular multivesicular body functions in hepatitis B virus budding." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(24): 10205-10.

Westh, H., S. Hoffmann, E. Christiansen and A. M. Worm (1996). "Hepatitis B core antibody screening in a high prevalence group: comparison of three enzyme immunoassays using receiver operating characteristic analysis." J Virol Methods **56**(1): 13-8.

Westhoff, T. H., F. Jochimsen, A. Schmittel, M. Stoffler-Meilicke, J. H. Schafer, W. Zidek, W. H. Gerlich and E. Thiel (2003). "Fatal hepatitis B virus reactivation by an escape mutant following rituximab therapy." Blood **102**(5): 1930.

WHO (2002). Hepatitis B. http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/HepatitisB_whocdscsrlyo2002_2.pdf, World Health Organization.

WHO (2002). Hepatitis C. http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/Hepc.pdf, World Health Organisation.

WHO (2008). Report of the WHO collaborative study to establish the First Intemational Standard for detection of antibodies to Hepatitis Bcore antigen

(anti-HBc). http://whqlibdoc.who.int/hq/2008/WHO_BS_08.2098_eng.pdf, World Health Organization.

Will, H., W. Reiser, T. Weimer, E. Pfaff, M. Buscher, R. Sprengel, R. Cattaneo and H. Schaller (1987). "Replication strategy of human hepatitis B virus." J Virol **61**(3): 904-11.

Wittkop, L. (2007). Natur und Funktion der Hepatitis B Virus Proteinkinase http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2008/5137/.

Wittkop, L., A. Schwarz, A. Cassany, S. Grun-Bernhard, M. Delaleau, B. Rabe, C. Cazenave, W. Gerlich, D. Glebe and M. Kann "Inhibition of protein kinase C phosphorylation of hepatitis B virus capsids inhibits virion formation and causes intracellular capsid accumulation." Cell Microbiol.

Wittkop, L., A. Schwarz, A. Cassany, S. Grun-Bernhard, M. Delaleau, B. Rabe, C. Cazenave, W. Gerlich, D. Glebe and M. Kann (2010). "Inhibition of protein kinase C phosphorylation of hepatitis B virus capsids inhibits virion formation and causes intracellular capsid accumulation." Cell Microbiol.

Wolff, W. and W. H. Gerlich (1984). "Direct radioimmunoassay of antibody against hepatitis B core antigen using 32P-labelled core particles." Eur J Clin Microbiol **3**(1): 25-9.

Wu, C. G., M. Forgues, S. Siddique, J. Farnsworth, K. Valerie and X. W. Wang (2002). "SAGE transcript profiles of normal primary human hepatocytes expressing oncogenic hepatitis B virus X protein." FASEB J **16**(12): 1665-7.

Wynne, S. A., R. A. Crowther and A. G. Leslie (1999). "The crystal structure of the human hepatitis B virus capsid." Mol Cell **3**(6): 771-80.

Xu, Z., T. S. Yen, L. Wu, C. R. Madden, W. Tan, B. L. Slagle and J. H. Ou (2002). "Enhancement of hepatitis B virus replication by its X protein in transgenic mice." J Virol **76**(5): 2579-84.

Yaginuma, K., Y. Shirakata, M. Kobayashi and K. Koike (1987). "Hepatitis B virus (HBV) particles are produced in a cell culture system by transient expression of transfected HBV DNA." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(9): 2678-82.

Zahm, P., P. H. Hofschneider and R. Koshy (1988). "The HBV X-ORF encodes a transactivator: a potential factor in viral hepatocarcinogenesis." Oncogene **3**(2): 169-77.

Zhang, H., L. Y. Wu, S. Zhang, L. Y. Qiu, N. Li, X. Zhang, X. Z. Zhang, C. L. Shan, L. H. Ye and X. D. Zhang (2009). "Anti-hepatitis B virus X protein in sera is one

of the markers of development of liver cirrhosis and liver cancer mediated by HBV." J Biomed Biotechnol **2009**: 289068.

Zhang, Z., N. Torii, Z. Hu, J. Jacob and T. J. Liang (2001). "X-deficient woodchuck hepatitis virus mutants behave like attenuated viruses and induce protective immunity in vivo." J Clin Invest **108**(10): 1523-31.

Zheng, J., F. Schodel and D. L. Peterson (1992). "The structure of hepadnaviral core antigens. Identification of free thiols and determination of the disulfide bonding pattern." J Biol Chem **267**(13): 9422-9.

Zhou, S. and D. N. Standring (1992). "Hepatitis B virus capsid particles are assembled from core-protein dimer precursors." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(21): 10046-50.

Zlotnick, A., N. Cheng, S. J. Stahl, J. F. Conway, A. C. Steven and P. T. Wingfield (1997). "Localization of the C terminus of the assembly domain of hepatitis B virus capsid protein: implications for morphogenesis and organization of encapsidated RNA." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(18): 9556-61.

Zlotnick, A., J. M. Johnson, P. W. Wingfield, S. J. Stahl and D. Endres (1999). "A theoretical model successfully identifies features of hepatitis B virus capsid assembly." Biochemistry **38**(44): 14644-52.

Zoulim, F., J. Saputelli and C. Seeger (1994). "Woodchuck hepatitis virus X protein is required for viral infection in vivo." J Virol **68**(3): 2026-30.

Zoulim, F., X. Zhang, C. Pichoud and C. Trepo (1996). "Heterogeneity of hepatitis B virus (HBV) core gene in a patient with HBV-associated cirrhosis and serum negativity for anti-HBc." J Hepatol **24**(2): 155-60.

Zuckerman, J. N. and A. J. Zuckerman (2003). "Mutations of the surface protein of hepatitis B virus." Antiviral Res **60**(2): 75-8.

Abkürzungen und Einheiten

Ak, ab	Antikörper, antibody
anti-HBc	Antikörper gegen das Hepatits-B-Core-Protein
anti-HBe	Antikörper gegen das Hepatits-B-e-Protein
anti-HBs	Antikörper gegen das Hepatits-B-Surface-Protein
anti-HBx	Antikörper gegen das Hepatits-B-x-Protein
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
[γ^{32}P] ATP	mit Phosphor^{32} markiertes ATP
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	bezeihungsweise
ca.	circa
cccDNA	covalently closed circulated DNA
Ci	Curie
cpm	counts pro min
C-terminal	carboxyterminal
CHU	Centre Hospitalier Universitäire, Bordeaux
Da	Dalton
d	Tag
d.h.	das heißt
dH_2O	destilliertes Wasser
DMEM	Dulbeccos Modified Essential Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dRIA	direkter Radioimmunassay
DTT	Dithiothreithol
***E**.coli*	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-Tetraessigsäure
eHBc	extrazelluläre Capside
EIA	Enzymimmunoassay
evtl.	eventuell
FKS	Fötales Kälberserum
g	Gravitationskraft oder Gramm
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde
HBc, HBcAg	Hepatitis-B-Core-Protein bzw. Hepatitis-B-Core-Antigen
HBe	Hepatitis-B-e-Protein bzw. Hepatitis-B-e-Antigen
HBs, HBsAg	Hepatitis-B-Surface-Protein bzw. Hepatitis-B-Surface-Antigen
HBx	Hepatitis-B-x-Protein
HBV	Hepatitis-B-Virus

IE	Internationale Einheiten
iHBc	intrazelluläre Capside
IMV	Institut für Medizinische Virologie, Giessen
IP	Immunpräzipitation
IVD	*In vitro*-Diagnostika
JLU	Justus-Liebig-Universität
l	Liter
lHBs	Large-Hepatitis-B-Surface-Protein
mAb	monoklonarer Antikörper
β-ME	β-Mercaptoethanol
MEIA	Mikropartikel-Enzymimmunoassay
MES	2-(N-morpholino)-ethane sulfonic acid
MHBs	Middle-Hepatitis-B-Surface-Protein
min	Minute
MW	Molekulargewicht
NAG	natives Agarosegel
NAGE	native Agarosegelelektophorese
NLS	nuclear localisation signal
NPC	nuclear pore complex
NP-40	Nonidet P-40
nt	Nukleotid
N-terminal	aminoterminal
ORF	open reading frame
PAG	Polyacrylamidgel
PAGE	Polyacrylamid-gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
pds	partially double stranded, partiell doppelsträngig
PEI	Paul-Ehrlich-Institut
pgRNA	prägenomische RNA
PK	Proteinkinase
PKC	Proteinkinase C
POD	Peroxidase
PrHBc	phosphorylierte, rekombinante in *E.coli* exprimierte Core-Partikel
PrHBc*	radioaktiv (mit [γ^{32}P] ATP) phosphorylierte, rekombinante in *E.coli* exprimierte Core-Partikel
PVDF	Polyvinylendifluorid
rcDNA	relaxed circulated DNA
rHBc	rekombinante in *E.coli* exprimierte Core-Partikel
RKI	Robert-Koch-Institut
RT	reverse Transkription bzw. Raumtemperatur
s	Sekunde
S/CO	sample to cut off, Probe im Verhältnis zur Ausschlussgröße

SDS	Sodiumdodecylsulfat		
SHBs	Small-Hepatitis-B-Surface Protein	**v**/v	volume / volume, Volumenprozent
TAE	TRIS Acetat EDTA	**W**HO	World Health Organization
TCA	Trichloric acid, Trichloressigsäure	w/v	weight / volume, Gewicht pro Volumen
Tris	Trishydroxy-methylaminomethan	w/w	weight / weight, Gewichtsprozent
U	Unit, Einheit		

Zusammenfassung

Unter den verschiedenen Antigenen des Hepatitis B Virus (HBV) führt das Hepatitis B Core Antigen (HBcAg) zur stärksten Immunreaktion. So kommt es im Rahmen einer Hepatitis B in den allermeisten Fällen zur Bildung von Antikörpern gegen HBcAg (anti-HBc).

Unter 3309 Hepatitis B Surface Antigen (HbsAg) positiven Seren wurden durch einen kommerziell erhältlichen (Mikropartikel)-Enzym-Immunoassy (M / EIA) 34 Proben von 22 Patienten anti-HBc negativ getestet. Bei der Suche nach möglichen Ursachen für das Fehlen von anti-HBc bei diesen Patienten zeigte sich, dass neun Patienten immunsuppremiert waren bzw. bei ihnen eine HIV-Koinfektion vorlag. Bei 13 Patienten, fünf davon wurden perinatal infiziert, war allerdings keine Immunsuppression bekannt. Das HBc-Gen konnte bei sieben Patienten sequenziert werden. Dabei fanden sich keine Mutationen, die das negative Ergebnis im anti-HBc-Test erklären könnten.

Zur Reevaluation der Seren wurde ein neuer anti-HBc-Test entwickelt: Die im Serum enthaltenen Antikörper wurden dabei an Protein G beschichtete magentische Kügelchen gebunden und anti-HBc über ^{32}P-markiertes rekombinantes HBcAg nachgewiesen. Die radioaktive Markierung erfolgte durch carboxyterminale Phosphorylierung des HBcAg, wie sie auch Teil des natürlichen Replikationszyklus von HBV ist. Da rekombinant hergestellte Capside keine Proteinkinase enthalten wurde Proteinkinase C zu dissoziierten Capsiden zugefügt. So konnten die Core Proteine radioaktiv phosphoryliert werden. Anschließend wurden die Capside rekonstituiert. Die Spezifität der Immunpräzipitation (IP) konnte durch Kompetition mit unmarkiertem HBcAg kontrolliert werden. Um die Sensitivität zu überprüfen wurden Verdünnungsreihen parallel mittels IP und MEIA getestet. Dabei war die IP bei anti-HBe positiven Seren 1,8fach (1,3 - 2,9) sensitiver als der MEIA, während sie bei anti-HBe negativen Seren von chronisch Infizierten 6,5fach (5,8 - 7,4) sensitiver war.

Von den 34 HbsAg positiven, anti-HBc negativen Seren war von 27 ausreichend Volumen für die IP vorhanden. IP testete davon sieben Seren positiv, vier unspezifisch und 16 ebenfalls negativ. Auch mit der sensitiveren IP blieben Seren negativ. Ein negativer anti-HBc-Titer allein reicht damit nicht aus um eine Hepatitis B auszuschließen, weitere Tests (z.B. HBV-DNA) sind hierzu notwendig.

Summary

Core antigen (HBcAg) is the most immunogenic component of hepatitis B virus (HBV) and is believed to induce virtually always antibodies (anti-HBc) in infected individuals. Among 3309 hepatitis B surface antigen (HBsAg) positive sera 34 samples from 22 patients were identified to be negative for anti-HBc in commercially available (microparticle) enzyme immune assays (M / EIA). As possible reasons for the lack of anti-HBc in these patients nine patients were identified suffering from immunosuppression or HIV coinfection. Thirteen patients were immunocompetent; five of them were perinatally infected. Sequence data of the HBc gene were available from seven patients. None of the obsessed mutations should have affected the major epitopes and should have led to formation of aberrant anti-HBc.

For re-evaluation of these sera a new assay for anti-HBc was developed: Protein G-coated magnetic beads separated the antibodies and ^{32}P-labelled recombinant HBcAg marked the anti-HBc-antibodies. Labelling was achieved by carboxyterminal phosphorylation as it is part of the life cycle of HBV. Because recombinant capsids do not contain protein kinases, protein kinase C was added to dissociated capsids followed by radioactive phosphorylation of the core proteins and subsequent reconstitution of the capsids.

Specifity of the immune precipitation (IP) was controlled for by competition with unlabelled HBcAg. Sensitivity of the IP was controlled by testing dilutions of anti-HBc positive sera with and the MEIA in comparison. IP was found to be 1.8-fold (1.3 - 2.9) more sensitive than MEIA using anti-HBe positive sera, but 6.5-fold (5.8 - 7.4) more sensitive with anti-HBe negative sera of patients with chronic hepatitis B.

Out of the 34 HBsAg positive, anti-HBc negative serum samples 27 were available in sufficient volumes to perform IP. IP was positive in seven, unspecific in four and negative in 16 sera. Even with the more sensitive IP some serum samples remained negative. Therefore a negative titre of anti-HBc alone is not sufficient to rule out a hepatitis B, further testing (for example HBV-DNA) is necessary.

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. M. Kann für die Bereitstellung des Themas, die stetige Betreuung, die Hilfe und Geduld während der Entstehung dieser Arbeit.

Ich danke Herrn Prof. Dr. W. H. Gerlich für die Idee zum Thema und vielerlei Unterstützung.

Ich danke Herrn Dr. W. R. Willems, Herrn Dr. C. G. Schüttler, Frau Dr. P. Trimoulet, Herrn Prof. Dr. H. Fleury und Herrn Prof. Dr. W. H. Gerlich für die Auswahl und Bereitstellung der Seren.

Ich danke Herrn Prof. Dr. P. Pumpens und Frau Dr. I. Sominskaja für die *E. coli* exprimierten Capside.

Ich danke allen Mitarbeitern des Institutes für Medizinische Virologie für ihre Hilfsbereitschaft, insbesondere Uli Wend für die Genotypisierung und Sequenzierung einiger Proben.

Ich danke meinen Freunden, dass sie jahrelang mein Gejammer ertragen haben.

Ich danke Alex, meiner Laborkollegin und Freundin, für ihre Hilfe.

Ich danke meiner Familie, insbesondere meinem Vater für seine Beharrlichkeit, meinem Schwiegervater Werner Wagner für seine Begeisterung, meinem Bruder Jan für die „Technik“ und meinem Bruder Sven für seine Diskussionsbereitschaft.

Ich danke meinem Sohn Paul, dass er in den ersten Monaten seines Lebens soviel geschlafen hat.

Ich danke meinem Mann York.

Und natürlich danke ich Gott.

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichen und nicht veröffentlichen Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Gießen, den 12.08.2010

Vera Christin Kantelhardt