
Angefertigt am
naturwissenschaftlichen Fachbereich FB 08, Biologie
in Zusammenarbeit mit dem
Institut für Medizinische Virologie, FB 11, Humanmedizin
der Justus-Liebig Universität Gießen

***Struktur und Funktion der Oberflächenproteine
von ungewöhnlichen Hepatitis B Virus-Varianten***

Inauguraldissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)
der naturwissenschaftlichen Fachbereiche
- Biologie -
der Justus-Liebig Universität Gießen

vorgelegt von
Dipl.-Biol. Mona Saniewski
aus Neuwied/Rhein

Gießen 2009

Dekan: **Prof. Dr. Volkmar Wolters**

Gutachter: **Prof. Dr. Albrecht Bindereif**
Institut für Biochemie, FB 08
Justus-Liebig Universität Gießen

Prof. Dr. phil. nat. Wolfram H. Gerlich
Institut für Medizinische Virologie, FB 11
Justus-Liebig Universität Gießen

Tag der Disputation: 17. Dezember 2009

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Das Hepatitis B Virus als Mitglied der Familie <i>Hepadnaviridae</i>	1
1.1.1	Historischer Überblick	1
1.1.2	Taxonomie	2
1.1.3	Morphologie und Genomstruktur	2
1.1.4	HBV Genotypen und Subtypen	7
1.1.5	Überblick über den Lebenszyklus von HBV	9
1.2	Klinische Aspekte der HBV Infektion	11
1.2.1	Transmission	11
1.2.2	Serologische Marker	12
1.2.3	Infektionsverläufe.....	13
1.2.3.1	Akute Hepatitis B (AHB)	14
1.2.3.2	Chronische Hepatitis B (CHB)	15
1.2.3.3	Immuntoleranz.....	16
1.2.3.4	Inaktiver oder „gesunder“ HBsAg-Trägerstatus	16
1.2.3.5	Okkulte HBV Infektionen (OBI).....	16
1.2.4	Immunpathogenese bei HBV	17
1.2.5	HBV-Mutanten und ihre Bedeutung für die Pathogenese	19
1.2.5.1	<i>Vaccine-escape</i> -Mutanten	20
1.2.5.2	Andere <i>Immune-escape</i> -Mutanten	20
1.2.5.3	<i>Diagnostik-escape</i> -Mutanten	21
1.2.5.4	<i>Therapie-escape</i> -Mutanten.....	21
1.2.6	HBV-Übertragung durch Blutspenden.....	21
1.3	Infektionssysteme für die experimentelle HBV-Infektion	23
1.3.1	<i>In vivo</i> -Infektion.....	23
1.3.2	<i>In vitro</i> -Infektion	23
1.4	Zielsetzung und experimentelle Ansätze der Arbeit	24

2	MATERIAL UND METHODEN.....	26
2.1	Material.....	26
2.1.1	Geräte und Verbrauchsmaterial.....	26
2.1.2	Chemikalien.....	27
2.1.3	Enzyme und <i>Kits</i>	28
2.1.4	Seren.....	29
2.1.5	Plasmide.....	30
2.1.6	Synthetisierte Oligonukleotide.....	30
2.1.7	Referenzgenome.....	31
2.1.8	Antikörper.....	32
2.1.9	DNA- und Protein-Längenstandards.....	32
2.1.10	Puffer und Lösungen.....	33
2.1.11	Viren.....	35
2.1.12	Bakterien.....	35
2.1.13	Zellkulturen.....	36
2.1.13.1	Etablierte Zelllinien.....	36
2.1.13.2	Primärzellen.....	36
2.1.14	Häufig verwendete Medien und Lösungen für Zellen.....	37
2.1.14.1	Prokaryotische Zellen.....	37
2.1.14.2	Eukaryotische Zellen.....	37
2.2	Methoden.....	40
2.2.1	Herstellung chemisch-kompetenter Bakterien.....	40
2.2.2	Transformation von Bakterien.....	40
2.2.3	Ultrazentrifugation von Serum durch ein Saccharosekissen.....	41
2.2.4	Aufreinigung von DNA aus Serumproben.....	41
2.2.5	Aufreinigung von PCR-Proben zur Reamplifikation.....	41
2.2.6	Amplifikation von DNA mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	41
2.2.6.1	Real Time-PCR im LightCycler®.....	42
2.2.6.2	Reaktionen im <i>Mastercycler</i> ®.....	42
2.2.7	Gelelektrophorese von DNA-Proben.....	47
2.2.8	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	48

2.2.9	Klonierung mit verschiedenen Vektorsystemen	48
2.2.9.1	pCR [®] 2.1-TOPO	48
2.2.9.2	pGEM [®] -T Vector System	49
2.2.9.3	pCR [®] -XL-TOPO	49
2.2.10	Isolation von Plasmid-DNA mittels alkalischer Lyse	51
2.2.10.1	Mini- und Maxipräparation	51
2.2.11	Sequenzanalyse der Klone	51
2.2.12	Zellkultur	52
2.2.12.1	Auftauen von Zelllinien	52
2.2.12.2	Passage von Zelllinien.....	52
2.2.12.3	Einfrieren von Zelllinien	53
2.2.13	Transfektion von Zellen mit <i>GeneJuice</i> oder <i>FuGene</i>	53
2.2.14	ELISA zum Nachweis des HBsAg.....	54
2.2.15	Aufreinigung von Hepatitis B Viren aus dem Plasma chronisch-infizierter Patienten mittels Dichtegradientenzentrifugation	54
2.2.16	Isolation von anti-HBs aus Serum mittels Protein L-Agarose.....	55
2.2.17	Auftrennung gereinigter Immunglobuline mittels SDS-PAGE	56
2.2.18	Silberfärbung der isolierten Immunglobuline	56
2.2.19	Messung von anti-HBs und HBeAg	57
2.2.20	Primäre Tupaia Hepatozyten (PTH).....	57
2.2.20.1	Beschichten der Zellkulturschalen	57
2.2.20.2	Isolation primärer Tupaia Hepatozyten	57
2.2.20.3	Versuche zur Neutralisation der HBV-Infektion	59
2.2.20.4	Überprüfung der Zellviabilität mittels WST1-Test	60
3	ERGEBNISSE	61
3.1	Sequenzanalyse des Arctic Squirrel Hepatitis Virus (ASHV) aus dem Serum eines Arktischen Hörnchens und eines experimentell infizierten Amerikanischen Waldmurmeltiers	61
3.1.1	Sequenzanalyse der ASHV- Klone	62
3.1.2	Evolutionäre Beziehungen von ASHV, WHV und GSHV	72
3.1.3	Nachweis von ASHeAg, GSHeAg und WHeAg	74

3.2	Untersuchung und Charakterisierung von Seren okkultter HBV-Träger mittels unterschiedlicher Klonierungsverfahren	75
3.2.1	Optimierung der Klonierungsmethode mittels unterschiedlicher PCR Techniken und Expressionssysteme.....	75
3.2.1.1	PCR Techniken	75
3.2.1.2	Expressionsvektoren	76
3.2.2	Übersicht der HBV-Klonierungen.....	77
3.2.3	Sequenzanalyse der HBV-Klone	78
3.2.4	Patientenkollektiv und analysierte Klon-Sequenzen	78
3.2.4.1	Patient mit chronischer HBV-Infektion (Kontrollprobe)	78
3.2.4.2	Sequenzanalyse (Kontrollprobe)	79
3.2.4.3	Tödliche HBV-Infektion nach Bluttransfusion (Fall A).....	82
3.2.4.4	Sequenzanalyse (Fall A).....	83
3.2.4.5	Okkult infizierter Blutspender, zehn Monate Verlaufsbeobachtung (Fall B)	86
3.2.4.6	Sequenzanalyse (Fall B).....	87
3.2.4.7	Blutspender mit mutiertem HBsAg und anti-HBs (Fall C)	94
3.2.4.8	Sequenzanalyse (Fall C)	95
3.2.4.9	Okkult infizierter Blutspender (Fall D)	101
3.2.4.10	Sequenzanalyse (Fall D)	101
3.2.4.11	Blutspenderin mit ausheilender okkultter HBV Infektion (Fall E)....	104
3.2.4.12	Sequenzanalyse (Fall E).....	104
3.2.5	Transmission von HBV in den Fällen A bis C	106
3.2.6	Nukleotidaustausche: Verhältnis von synonymen zu nicht-synonymen Austauschen	107
3.2.7	Variabilität der okkulten HBV Infektionen (OBI)	109
3.3	Expression von Hepatitis B Virusproteinen in humanen Hepatom-Zelllinien	112
3.4	Neutralisierungspotential aus Serum gereinigter Antikörper gegen die HBV Oberflächenproteine	117

3.4.1	Reinigung und Isolation von anti-HBs aus Serum.....	117
3.4.2	Neutralisierung der HBV-Infektion primärer Tupaia Hepatozyten mittels Protein L-gereinigter Antikörper	119
3.4.2.1	Antikörper aus einem vakzinierten, anti-HBs positiven Spender ...	119
3.4.2.2	Antikörper aus einem okkult HBV infizierten Blutspender.....	121
4	DISKUSSION	123
4.1	Sequenzanalyse des Arctic Squirrel Hepatitis Virus (ASHV) aus dem Serum eines Arktischen Hörnchens und eines experimentell infizierten Amerikanischen Waldmurmeltiers	123
4.2	Untersuchung und Charakterisierung von Seren okkult HBV-Träger mittels unterschiedlicher Klonierungsverfahren	127
4.3	Expression von Hepatitis B Virusproteinen in humanen Hepatom-Zelllinien	138
4.4	Neutralisierungspotential aus Serum gereinigter Antikörper gegen die HBV-Oberflächenproteine.....	142
5	ZUSAMMENFASSUNG	145
6	SUMMARY	147
7	LITERATURVERZEICHNIS	149
8	DANKSAGUNG	176
9	LEBENS LAUF	178
10	PUBLIKATIONEN UND KONGRESSBEITRÄGE	179
11	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG.....	180

Abkürzungen

A	A	Adenin (nt) oder Alanin (AS)	
	Abb.	Abbildung	
	ad	bis	
	Ag	Antigen	
	AHB	Akute Hepatitis B	
	Ak, ab	Antikörper, <i>antibody</i>	
	ALT	Alanin-Aminotransferase (alternative Abkürzungen: ALAT, GTP)	
	amp	Ampicillin	
	AS, aa	Aminosäure, <i>amino acid</i>	
	ASHV	<i>Arctic Squirrel</i> (Arktisches Erdhörnchen) Hepatitis Virus	
	B	bp	<i>basepair</i> , Basenpaar
		BCP	Basaler Core Promotor
		BSA	Bovines Serum Albumin (Rinder-Serumalbumin)
bzw.		beziehungsweise	
C		C	Cytosin (nt) oder Cystein (AS)
	°C	Grad Celsius	
	cccDNA	<i>covalently closed circular DNA</i> (kovalent geschlossene zirkuläre DNA)	
	CHB	Chronische Hepatitis B	
	CHBV	<i>Crane</i> (Kranich) Hepatitis B Virus	
	ChHBV	<i>Chimpanzee</i> (Schimpansen) Hepatitis B Virus	
	CMV	<i>cauliflower mosaic virus</i> (Blumenkohlmosaikvirus)	
	C-Terminus	Carboxyterminus	
	CTL	<i>Cytotoxic T-lymphocytes</i> (Zytotoxische T-Lymphozyten)	
	CXXC	Cystein-X-X-Cystein	
	D	D	Asparaginsäure
Da		Dalton	
del		Deletion	
d.h.		das heißt	
DHBV		<i>Duck</i> (Enten) Hepatitis B Virus	
dH ₂ O		destilliertes Wasser	
DMEM		<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>	
DMF		Dimethylformamid	
DMSO		Dimethylsulfoxid	
d _N		nicht-synonyme Substitution	
DNA		<i>Desoxyribonucleotide acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)	
dNTP		Desoxy-Nukleotidtriphosphat	
DR		<i>Direct Repeat</i>	
d _s		synonyme Substitution	
ds		<i>double stranded</i> (doppelsträngig)	
DTT		Dithiothreitol	

E	ε	<i>Encapsidation Signal</i> (Enkapsidierungssignal)
	E	Glutaminsäure
	E.coli	<i>Escherichia coli</i>
	EDTA	Ethylendiamintetraacetat
	ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
	ER	Endoplasmatisches Retikulum
F	F	Phenylalanin
	FB	Fachbereich
	FKS	Fötales Kälberserum
G	g	Gramm oder Gravitationskraft
	G	Guanin (nt) oder Glycin (AS)
	GE	<i>Genome Equivalents</i> (Genomäquivalente)
	GFP	Grün Fluoreszierendes Protein
	GiHBV	Gibbon Hepatitis B Virus
	GoHBV	Gorilla Hepatitis B Virus
	GRE	<i>Glucocorticoid Responsive Element</i>
	GSHV	<i>Ground Squirrel</i> (Erdhörnchen) Hepatitis Virus
	gt	Genotyp
GTHBV	<i>Grey Teal</i> (Weißkehlente) Hepatitis B Virus	
H	h	Stunde
	H	Histidin
	HBV	Hepatitis B Virus
	HDV	Hepatitis Delta Virus
	hHDV	Hepatitis Delta Virus mit humanem HBsAg
	HBcAg	<i>Hepatitis B core Antigen</i>
	HBsAg	<i>Hepatitis B e Antigen</i>
	HBIG	Hepatitis B Immunglobulin
	HBsAg	<i>Hepatitis B surface Antigen</i>
	HBxAg	<i>Hepatitis B x Antigen</i>
	HCC	<i>Hepatocellular carcinoma</i> (Hepatozelluläres Karzinom)
	HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
	HGM	<i>Hepatocyte Growth Medium</i>
	HHBV	<i>Heron</i> (Graureiher) Hepatitis B Virus
I	I	Isoleucin
	ID	Identifikationsnummer
	IFN γ	Interferon Gamma
	IgG/M	Immunglobulin G/M
	Ig's	Immunglobuline
	IU	<i>International Unit</i> (Internationale Einheit)
K	K	Konsiliarnummer oder Lysin
	kana	Kanamycin
	kb	Kilobasen
	kDa	Kilodalton
	kPEIU	Kilo-Paul Ehrlich Institut <i>Units</i>

L	I	Liter
	L	Leucin
	LB-Medium	<i>Luria Broth-Medium</i>
	LHBs	<i>Large Hepatitis B surface Protein</i> (Großes Hepatitis B Oberflächenprotein)
	LMV	Lamivudin
M	M	Methionin oder molar
	mA	Milli-Ampère
	MDHBV	<i>Maned Duck</i> (Mähnenente) Hepatitis B Virus
	mg	Milligramm
	µg	Mikrogramm
	MG	Molekulargewicht
	MHL	<i>Major hydrophilic loop</i> (Hydrophile HBsAg-Schleife)
	MHBs	<i>Middle Hepatitis B surface Protein</i> (Mittleres Hepatitis B Oberflächenprotein)
	min	Minuten
	mIU	Milli Internationale <i>Units</i>
	ml	Milliliter
	µl	Mikroliter
	mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> (Boten-RNA)
	MVB	<i>Multivesicular Body</i>
	MW	<i>Molecular weight</i> (Molekulargewicht)
N	N	Asparagin
	NaPP	Natriumphosphat-Puffer
	NAT	Nukleinsäure-Amplifikations-Test
	n.b	nicht bestimmt
	neg	negativ
	ng	Nanogramm
	nl	Nanoliter
	NLS	<i>Nuclear Localisation Signal</i> (Kernlokalisierungssignal)
	nm	Nanometer
	NPC	<i>Nuclear Pore Complex</i> (Kernporenkomplex)
	NRE	Negativ Regulierendes Element
	nt	Nukleotid
	N-Terminus	Aminoterminus
O	OBI	Okkulte Hepatitis B Infektion
	OD	Optische Dichte
	ORF	<i>Open Reading Frame</i> (Offener Leserahmen)
	OuHBV	Orang Utan Hepatitis B Virus
P	P	Prolin
	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
	PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)
	PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)

	PDH	<i>Primary Duck Hepatocytes</i> (Primäre Enten Hepatozyten)
	PEG	Polyethylenglykol
	PEIU	Paul-Ehrlich Institut <i>Units</i> (Einheiten)
	pg-mRNA	prägenomische mRNA
	PHH	<i>Primary Human Hepatocytes</i> (Primäre Humane Hepatozyten)
	pmol	Picomol
	POD	Peroxidase
	pol, P	HBV Polymerase
	pos	positiv
	präC/C	präCore/Core
	präS/S	präSurface/Surface
	PRE	Posttranskriptionales Regulatorisches Element
	PTH	<i>Primary Tupaia Hepatocytes</i> (Primäre Tupaia Hepatozyten)
Q	Q	Glutamin
R	R	Arginin
	RGHBV	Ross-Gans Hepatitis B Virus
	RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
	rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
	RT, rt	Reverse Transkriptase
S	S	Serin
	SDS	Sodiumdodecylsulfat (Natriumdodecylsulfat)
	sec	Sekunden
	SGHBV	<i>Snow Goose</i> (Schneegans) Hepatitis B Virus
	SHBs	<i>Small Hepatitis B surface Protein</i> (Kleines Hepatitis B Oberflächenprotein)
	ss	<i>single stranded</i> (einzelsträngig)
	STHBV	<i>Stork</i> (Weißstorch) Hepatitis B Virus
T	T	Thymin (nt) oder Threonin (AS)
	Tab.	Tabelle
	TAE	Tris-Acetat-EDTA
	Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
	TE	Tris-EDTA
	TFB	<i>Transformation Buffer</i> (Transformations-Puffer)
	TNE	Tris-Natrium-EDTA
	TNF α	Tumornekrosefaktor Alpha
	TP	Terminales Protein
	Tris	Trishydroxymethylaminimethan
U	UPGMA	<i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean</i>
	UV	Ultraviolett
	UZ	Ultrazentrifuge
	ü/N	über Nacht

V	V v/v	Volt oder Valin <i>volume per volume</i> (Volumen pro Volumen)
W	W wHDV WHeAg WHBsAg WHO WHV WMHBV w/w	Tryptophan Hepatitis Delta Virus mit WHBsAg <i>Woodchuck Hepatitis e Antigen</i> <i>Woodchuck Hepatitis surface Antigen</i> <i>World health organisation</i> (Weltgesundheitsorganisation) <i>Woodchuck</i> (Walddarmmeltier) Hepatitis B Virus <i>Wolley Monkey</i> (Wollaffen) Hepatitis B Virus <i>weight per weight</i> (Gewicht pro Gewicht)
Y	Y YMDD	Tyrosin Tyrosin-Methionin-Asparaginsäure-Asparaginsäure
Z	z.B	zum Beispiel

Sonstiges# Nummer

1 Einleitung

Nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation (*World Health Organisation*, WHO) gehört das Hepatitis B Virus (HBV) mit ca. 400 Millionen chronisch infizierten Menschen zu den zehn gefährlichsten Infektionserregern weltweit und ist 50-100 Mal infektiöser als HIV. Schätzungen zufolge hatten bereits 40 % der Weltbevölkerung Kontakt mit HBV und jährlich sterben bis zu 1 Millionen Menschen an den Folgen einer HBV-Infektion [Perz *et al.*, 2006; WHO, 2008]. Es gibt große Unterschiede in der Prävalenz, abhängig von ethnischer Zugehörigkeit und Gefährdungspotential. In den Hochendemiegebieten wie Südostasien und Zentral- und Südafrika liegt die Prävalenz für anti-HBc, Marker einer durchgemachten oder aktuellen HBV-Infektion, bei über 50 %. Eine Hepatitis B (griech.: hepar = Leber; -itis = Entzündung), die durch HBV hervorgerufene Erkrankung der Leber, kann in akuter oder chronischer Form auftreten. Menschen mit einer chronischen Lebererkrankungen haben ein bis zu 100-fach höheres Risiko an den Folgeerkrankungen wie der Leberzirrhose und dem hepatozellulären Karzinom (*Hepatocellular carcinoma*, HCC) zu sterben [Beasley *et al.*, 1981; Lavanchy, 2004]. Da HBV selbst nicht zytopathogen ist, wird die Pathogenese der akuten und chronischen Hepatitis durch die einsetzende Immunabwehr des Wirtes, insbesondere durch zytotoxische T-Lymphozyten, hervorgerufen [Chisari und Ferrari, 1995].

1.1 Das Hepatitis B Virus als Mitglied der Familie *Hepadnaviridae*

1.1.1 Historischer Überblick

Bereits im Jahr 1963 konnte das sog. Australien-Antigen (*Australia antigen*), ein 20 nm-Partikel ohne Nukleinsäure, im Blut eines australischen Ureinwohners nachgewiesen werden [Blumberg *et al.*, 1967], welches einige Jahre später mit dem Auftreten von Hepatitis in Verbindung gebracht wurde. Im Jahr 1970 konnten dann im Elektronenmikroskop neben den 17-25 nm großen sphärischen und filamentösen Partikel, auch 45 nm große Virus-ähnliche Partikel nachgewiesen werden, die alle das *Australia antigen* auf ihrer Oberfläche trugen [Dane *et al.*, 1970]. Aus den 45 nm-Partikeln (Dane-Partikeln) konnte ein Jahr später das *core*

antigen isoliert werden [Almeida *et al.*, 1971], in dem daraufhin eine endogene DNA-Polymerase [Kaplan *et al.*, 1973; Landers *et al.*, 1977; Robinson und Greenman, 1974] und die zirkuläre, partiell doppelsträngige DNA von ca. 3200 nt [Robinson *et al.*, 1974; Summers *et al.*, 1975] identifiziert wurde. Das *Australia antigen* wurde daraufhin als *Hepatitis B surface Antigen* (HBsAg) bezeichnet, die infektiösen Dane-Partikel als Hepatitis B Virus (HBV).

1.1.2 Taxonomie

Das humane Hepatitis B Virus (HBV) ist der Prototyp der Familie der *Hepadnaviridae* [Mason *et al.*, 2005], deren Name sich als Abkürzung von *Hepatitis-DNA-Viren* ableitet und der eine Vielzahl von HBV-ähnlichen Viren angehören. Die Mitglieder der Hepadnaviren zeichnen sich alle durch eine hohe Wirtsspezifität, einen ausgeprägten Hepatropismus und die Fähigkeit aus, sowohl akute als auch chronische Leberentzündungen zu verursachen [Robinson, 1991]. Taxonomisch lassen sich die Hepadnaviren in die zwei Genera der *Orthohepadnaviren* und der *Avihepadnaviren* unterteilen. Die Orthohepadnaviren der Säuger wurden sowohl in Altwelt-Primaten wie Gorilla (GoHBV), Orang Utan (OuHBV) oder Schimpanse (ChHBV), als auch in Neuwelt-Primaten wie dem Wollaffen (WMHBV) entdeckt. Ebenso dient eine Reihe von Nagetieren der Familie *Sciuridae* (Hörnchen) als Wirt, wie das Nordamerikanische Waldmurmeltier (WHV), das Kalifornische Erdhörnchen (GSHV) und das Arktische Erdhörnchen (ASHV). Die Avihepadnaviren dagegen infizieren diverse Vogelarten wie z.B. die Pekingente (DHBV), den Reiher (HHBV) und einige andere Arten von Enten und Gänsen (Tabelle 1-1).

1.1.3 Morphologie und Genomstruktur

Das umhüllte Hepatitis B Virus (Abbildung 1-1) hat einen Durchmesser von 42-47 nm [Dane *et al.*, 1970], die Sphären haben einen Durchmesser von 17-25 nm und die Filamente sind variabel in ihrer Länge [Robinson, 1977]. Sowohl das Virion als auch die subviralen Partikel besitzen eine Lipidhülle in der die HBV Oberflächenproteine (*Hepatitis B surface Antigen*, HBsAg) verankert sind [Almeida *et al.*, 1971], welche in drei unterschiedlichen Formen auftreten.

Tabelle 1-1 Mitglieder der Familie *Hepadnaviridae* unterteilt nach den Genera Orthohepadnaviren und Avihepadnaviren

Genus	Virus	Wirt	Referenz
Orthohepadnaviren	HBV	Mensch	[Dane et al., 1970]
	ChHBV	Schimpanse (Chimpanzee)	[Vaudin et al., 1988]
	GiHBV	Gibbon	[Norder et al., 1996]
	OuHBV	Orang Utan	[Warren et al., 1999]
	GoHBV	Gorilla	[Grethe et al., 2000]
	WMHBV	Wollaffe (Woolly Monkey)	[Lanford et al., 1998]
	WHV	Waldmurmeltier (Woodchuck)	[Summers et al., 1978]
	GSHV	Erdhörnchen (Ground Squirrel)	[Marion et al., 1980]
	ASHV	Arktisches Erdhörnchen (Arctic Squirrel)	[Testut et al., 1996]
Avihepadnaviren	DHBV	Pekingente (Duck)	[Mason et al., 1980]
	HHBV	Graureiher (Heron)	[Sprengel et al., 1988]
	RGHBV	Ross-Gans (Ross Goose)	[Naumann et al., 1993]
	SGHBV	Schneegans (Snow Goose)	[Chang et al., 1999]
	MDHBV	Mähnenente (Maned Duck)	[Li et al., 1998]
	GTHBV	Weißkehlente (Grey Teal)	[Li et al., 1998]
	STHBV	Weißstorch (Stork)	[Pult et al., 2001]
	CHBV	Kranich (Crane)	[Prassolov et al., 2003]

Das kleine Oberflächenprotein SHBs (*small HBs*), besteht aus der 226 AS großen S-Domäne. Das mittlere Oberflächenprotein MHBs (*middle HBs*) besitzt zusätzlich eine 55 AS lange aminoterminal präS2-Domäne, während das große Oberflächenprotein LHBs (*large HBs*) zusätzlich zur S- und präS2-Domäne noch eine präS1-Domäne von 108 AS bzw. 119 AS am N-Terminus aufweist, je nach Genotyp [Heermann *et al.*, 1984]. Das innerhalb der Virushülle liegende Nukleokapsid (*Core-Partikel*) hat eine Größe von 32 nm bzw. 36 nm und besteht aus 180 bzw. 240 Untereinheiten des *Hepatitis B core Antigen (HBcAg)* [Crowther *et al.*, 1994; Kenney *et al.*, 1995; Seitz *et al.*, 2007].

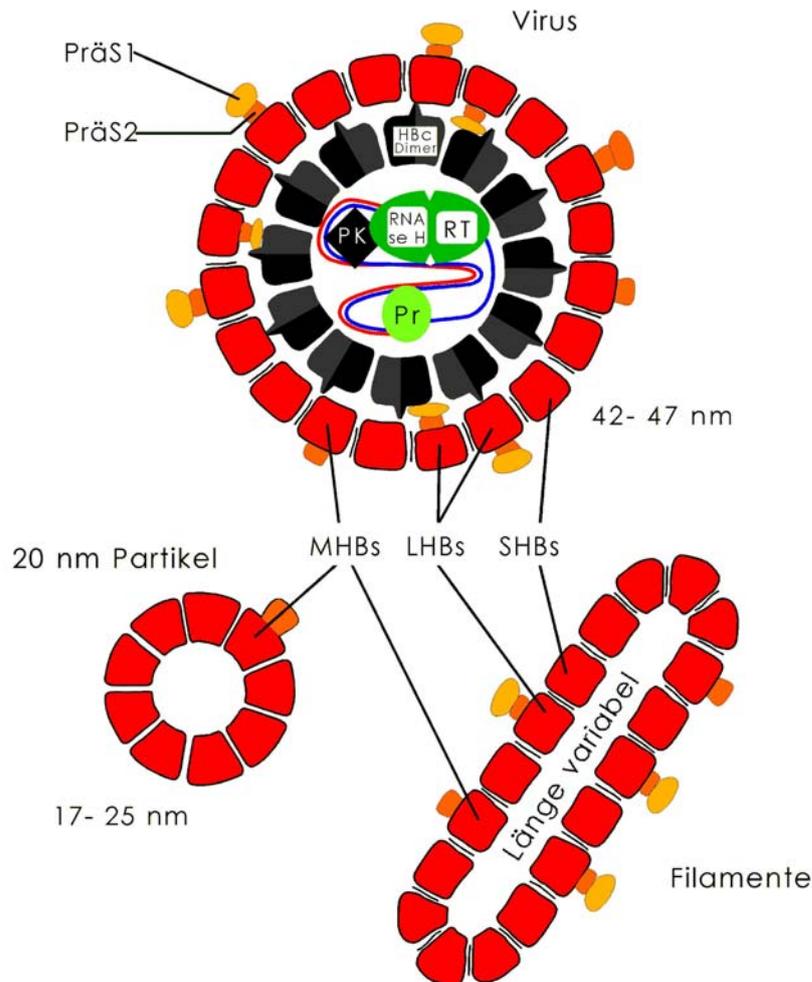


Abbildung 1-1 Schematische Darstellung des Virions und der subviralen Partikel (Sphären und Filamente) von HBV; Hüllproteine (LHBs, MHBs und SHBs) mit S-Domäne (rot), präS2-Domäne (orange) und präS1-Domäne (gelb); HbcAg-Dimere (schwarz); partiell doppelsträngige DNA (blau/rote Linie); Reverse Transkriptase (RT) mit RNaseH Funktion (grün) und Primerdomäne (hellgrün), PK: Proteinkinase.

[nach Schäfer, Glebe und Gerlich, in Druck, 2009]

Innerhalb des *Core*-Partikels liegt das partiell doppelsträngige DNA-Virusgenom [Summers *et al.*, 1975], das je nach Genotyp in seiner Größe zwischen 3182 bp und 3248 bp variiert (Tabelle 1-2). Außerdem beinhaltet das Kapsid noch eine zelluläre Proteinkinase und die virale DNA-Polymerase. Die DNA-Polymerase besteht aus den vier Untereinheiten: *priming*-Domäne, *spacer*-Domäne, Reverse Transkriptase-Domäne, RNase H-Domäne und ist kovalent mit dem 5'Ende des Negativstranges verbunden (Abbildung 1-2) [Bartenschlager und Schaller, 1988; Gerlich und Robinson, 1980]. Der Negativstrang fungiert als kodierender Strang und überlappt an seinen beiden Enden in einem Bereich von 8-10 nt (terminale Redundanz). Dieser Bereich wird zusätzlich vom

komplementären Plusstrang überspannt [Sattler und Robinson, 1979], sodass dort das Genom dreisträngig vorliegt [Will *et al.*, 1987]. Der Plusstrang trägt am 5' Ende eine 18 nt lange, mRNA-ähnliche *Cap*-Struktur [Seeger *et al.*, 1986], die als Primer bei der Doppelstrangsynthese dient. Das 3' Ende des Plusstranges hingegen variiert zwischen 1100 nt und 2600 nt [Hruska *et al.*, 1977], je nachdem wie weit die DNA-Polymerase den Strang synthetisieren kann, bevor das Virus sekretiert wird. Des Weiteren gibt es zwei 11 nt lange, identische Sequenzbereiche DR1 und DR2 (*direct repeats*), die bei der Virusreplikation eine wichtige Rolle spielen [Will *et al.*, 1987].

Der Negativstrang kodiert für vier konservierte, teilweise überlappende, offene Leserahmen (*open reading frame*, ORF) [Gerlich, 1991; Schlicht und Schaller, 1989]. Die Funktion des X-Proteins (HBxAg), welches vom X-ORF kodiert wird, ist weitestgehend unbekannt, es scheint als Transaktivator zu fungieren. Der C-ORF kodiert das *Core*-Protein (HBcAg) und eine lösliche Form des *Core*-Proteins (HBeAg), die durch post-translationale Modifikation der vorangeschalteten prä*Core*-Region entsteht. Der P-ORF, der etwa 80 % der Genomlänge umfasst, kodiert für die DNA-Polymerase mit den bereits genannten vier Domänen. Dabei überlappt die Reverse Transkriptase-Domäne (RT) mit der S-Domäne der Oberflächenproteine (HBsAg: LHBs, MHBs und SHBs). Diese drei carboxyterminalen Oberflächenproteine werden vom S-ORF kodiert und entstehen durch die Nutzung unterschiedlicher Startkodons aber des gleichen Stop-Kodons [Heermann *et al.*, 1984]. Die Expression der ORFs wird durch mehrere Kontrollelemente reguliert. Es gibt mindestens vier Promotoren, zwei *Enhancer* [Tang *et al.*, 2001], das *glucocorticoid-responsive element* (GRE) und das *negative-regulating element* (NRE). Durch die Kodierung eines Polyadenylierungssignals wird die Transkription terminiert und alle viralen mRNAs weisen das gleiche 3' Ende auf [Ganem und Varmus, 1987]. Auf Ebene der mRNAs gibt es zusätzliche regulatorische Elemente wie das posttranskriptionale Regulationselement (PRE), welches das *splicing* der transkribierten RNAs unterdrückt und den Transport in das Zytoplasma ermöglicht [Huang und Liang, 1993]. Das *encapsidation signal* ϵ am 5' Ende der prägenomischen RNA [Junker-Niepmann *et al.*, 1990] ist zusammen mit der viralen Polymerase an der Enkapsidierung beteiligt [Bartenschlager *et al.*, 1990; Hirsch *et al.*, 1990]. Das ϵ -

Signal bildet eine Haarnadelstruktur, die in allen Hepadnaviren konserviert ist [Laskus *et al.*, 1994].

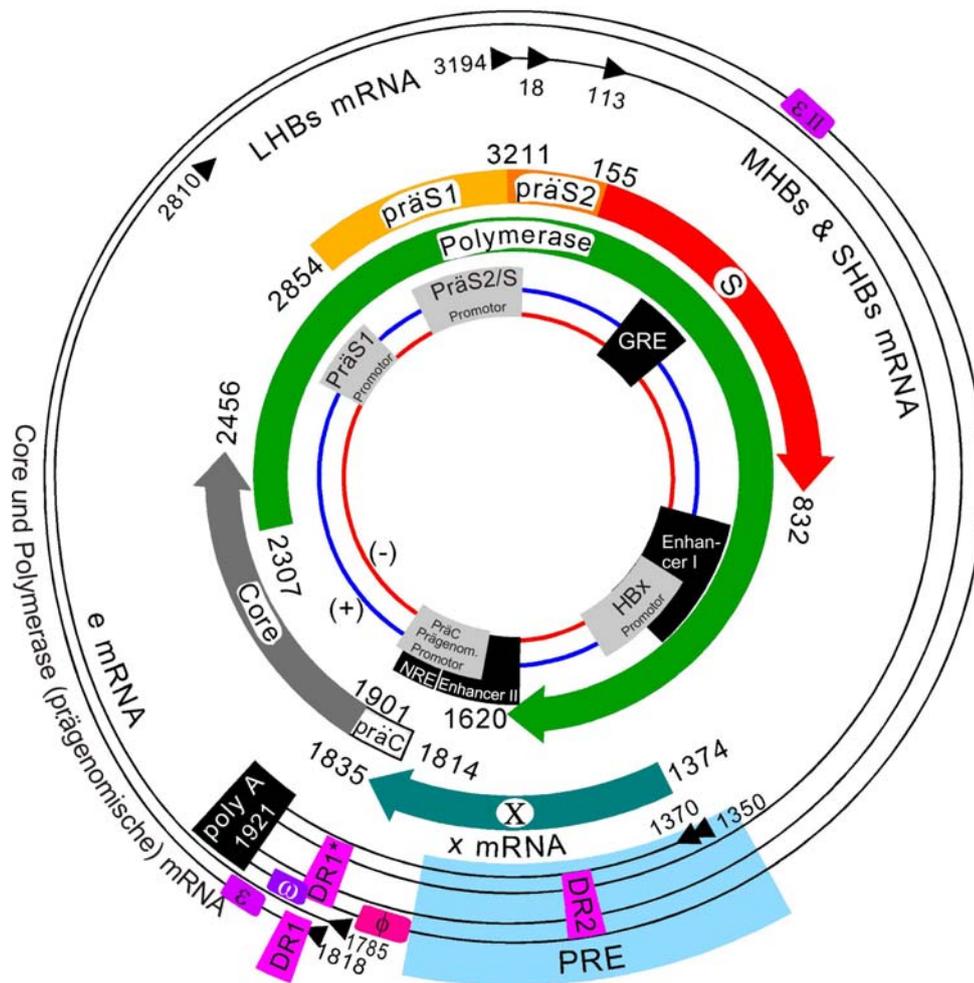


Abbildung 1-2 Schematische Darstellung der Genomstruktur von HBV mit den vier ORFs (innen) und den korrespondierenden Transkripten (außen); Innen sind die vier ORFs des Minusstrangs der HBV-cccDNA dargestellt mit den relevanten Start- und Stopkodons. Die Nummerierung gibt die Basenposition ab der EcoRI Schnittstelle im Genom von HBV Genotyp A2 (AJ012207) an. S-ORF (orange-rot) mit präS1, präS2 und S-Domäne, Pol-ORF (grün), X-ORF (türkis), C-ORF (grau) mit den jeweiligen Promotoren (grau), GRE: *glucocorticoid responsive element*, Enh: *enhancer I* und II, NRE: *negative regulating element*. Aussen sind die Transkripte mit dem Prägenom als äußersten Kreis dargestellt, mRNAs mit polyA-Schwanz (schwarz). PRE (blau): *posttranslational response element*, ε (lila): *encapsidation-Signal*, DR1 und DR2 (pink): *direct repeats*; Φ und εII sind Sequenzelemente, die für die Genomreifung benötigt werden. [modifiziert nach Schäfer, Glebe und Gerlich, in Druck, 2009]

1.1.4 HBV Genotypen und Subtypen

Das Hepatitis B Virus lässt sich in acht Genotypen (A bis H) klassifizieren [Arauz-Ruiz *et al.*, 2002; Naumann *et al.*, 1993; Norder *et al.*, 1994; Okamoto *et al.*, 1988; Stuyver *et al.*, 2000], die sich in mindestens 8 % bis maximal 14 % der Sequenz unterscheiden [Norder *et al.*, 2004; Okamoto *et al.*, 1988]. Die Identifikation eines angeblich neuen Genotyps (Genotyp I) [Huy *et al.*, 2008] konnte bislang nicht bestätigt werden, da das Kriterium der Nukleotid-Divergenz von 8 % nicht erfüllt ist [Kurbanov *et al.*, 2008]. Zusätzlich gibt es eine Reihe von Genosubtypen (A1-A3, B1-B5, C1-C5, D1-D5, F1-F4) [Schaefer, 2007], die in mindestens 4 % differieren [Kramvis und Kew, 2005]. Die Genotypen zeigen eine unterschiedliche geographische Verteilung [Bartholomeusz und Schaefer, 2004]. Genotyp A ist in Nordwesteuropa und USA (A2), sowie in Afrika und Indien (A1) lokalisiert, Genotyp B in China, Japan (B1, B2), Indonesien (B3), Vietnam (B4) und den Philippinen (B5). Genotyp C ist in Südostasien (C1, C2), sowie in Australien (C4) zu finden, während Genotyp D in Europa, im Mittleren Osten, Zentralasien (D1-D3) und in Australien (D4) vertreten ist. Genotyp E ist in West- und Zentralafrika verbreitet, Genotyp F und H in Mittel- und Südamerika (F1-F4) und Genotyp G ursprünglich in Mexiko. Es konnte eine Korrelation zwischen den einzelnen HBV-Genotypen und der Ethnizität festgestellt werden [Chu *et al.*, 2003]. Die Genotypen variieren in der Länge ihres Genoms (Tabelle 1-2).

Tabelle 1-2 HBV Genotypen und ihre Unterschiede in der Genomlänge
[modifiziert nach Schäfer, 2007]

Genotyp	Genomlänge (bp)	Unterschiede im ORF
A	3221	Insertion von AS 153 und 154 in HBc
B	3215	
C	3215	
D	3182	Deletion von AS 1-11 in präS1
E	3212	Deletion von AS 11 in präS1
F	3215	
G	3248	Insertion von AS 12 in HBc; Deletion von AS 11 in präS1
H	3215	

Dabei definieren die Aminosäuren an drei Positionen des SHBs die jeweilige Determinante. Befindet sich an Position 122 ein Lysin (K) gibt das die Subtyp-Determinante *d* an, ein Arginin (R) die Subtyp-Determinante *y*. An Position 160 gibt ein Lysin (K) die Determinante *w* an, ein Arginin (R) die Determinante *r*. Die Position 127 definiert in Kombination mit verschiedenen weiteren AS die Differenzierung in *w1-w4* [Norder *et al.*, 2004; Okamoto *et al.*, 1987a; Purdy *et al.*, 2007].

1.1.5 Überblick über den Lebenszyklus von HBV

Um in die Zelle zu gelangen, nutzt das HBV-Virion die auf der Hepatozyten-Oberfläche vorhandenen Heparansulfat-Proteoglykane (HSPGs) als *low-affinity*-Rezeptor [Leistner *et al.*, 2008]. Anschließend bindet es mit der präS1-Domäne des LHBs an einen noch unbekanntes *high-affinity*-Rezeptor [Glebe *et al.*, 2005] und wird dann vermutlich mit Hilfe der S-Domäne in die Zelle aufgenommen [Glebe *et al.*, 2003; Jaoude und Sureau, 2005]. Es wird davon ausgegangen, dass HBV über Endozytose in die Zelle gelangt. Das Nukleokapsid wird mutmaßlich aus dem Endosom freigesetzt und dann aktiv über Mikrotubuli zum Kern transportiert [Rabe *et al.*, 2006]. Um in den Kern zu gelangen, muss das Virusgenom durch den Kernporen-Komplex (NPC: *nuclear pore complex*) in den Kern transportiert werden. Dazu gelangt das Kapsid über sein NLS (*nuclear localisation signal*) mittels der Transportfaktoren Importin α/β an den NPC, desintegriert im *nuclear basket* und schleust dann das Genom ins Karyoplasma [Kann *et al.*, 1999; Rabe *et al.*, 2003]. Im Kern erfolgt dann die Replikation. Dafür wird zunächst das partiell doppelsträngige DNA-Genom durch die zelluläre DNA-Polymerase [Köck und Schlicht, 1993] und mehrere unbekannte DNA-Reparaturfaktoren in eine cccDNA (*covalently closed circular DNA*) vervollständigt, welche dann mit Histonen assoziiert als extrachromosomales Minichromosom vorliegt [Bock *et al.*, 1994]. Nach Synthese der cccDNA erfolgt die Transkription. Der Minusstrang wird durch die zelluläre RNA-Polymerase II in verschiedene mRNAs transkribiert, unter anderem eine prägenomische mRNA (pg-mRNA), die durch initiales Überlesen des Transkriptionsstops eine Übergenomlänge von 3,5 kb aufweist. Diese pg-mRNA wird nach Ausschleusen aus dem Kern in die Polymerase (pol) und das Core (HBcAg) translatiert und dient dann als Matrize für die reverse Transkription.

Auch die anderen drei mRNAs (2,4 kb, 2,1 kb und 0,7 kb) werden aus dem Kern transportiert und im Zytoplasma in HBsAg (LHBs; MHBs und SHBs) bzw. HBxAg translatiert.

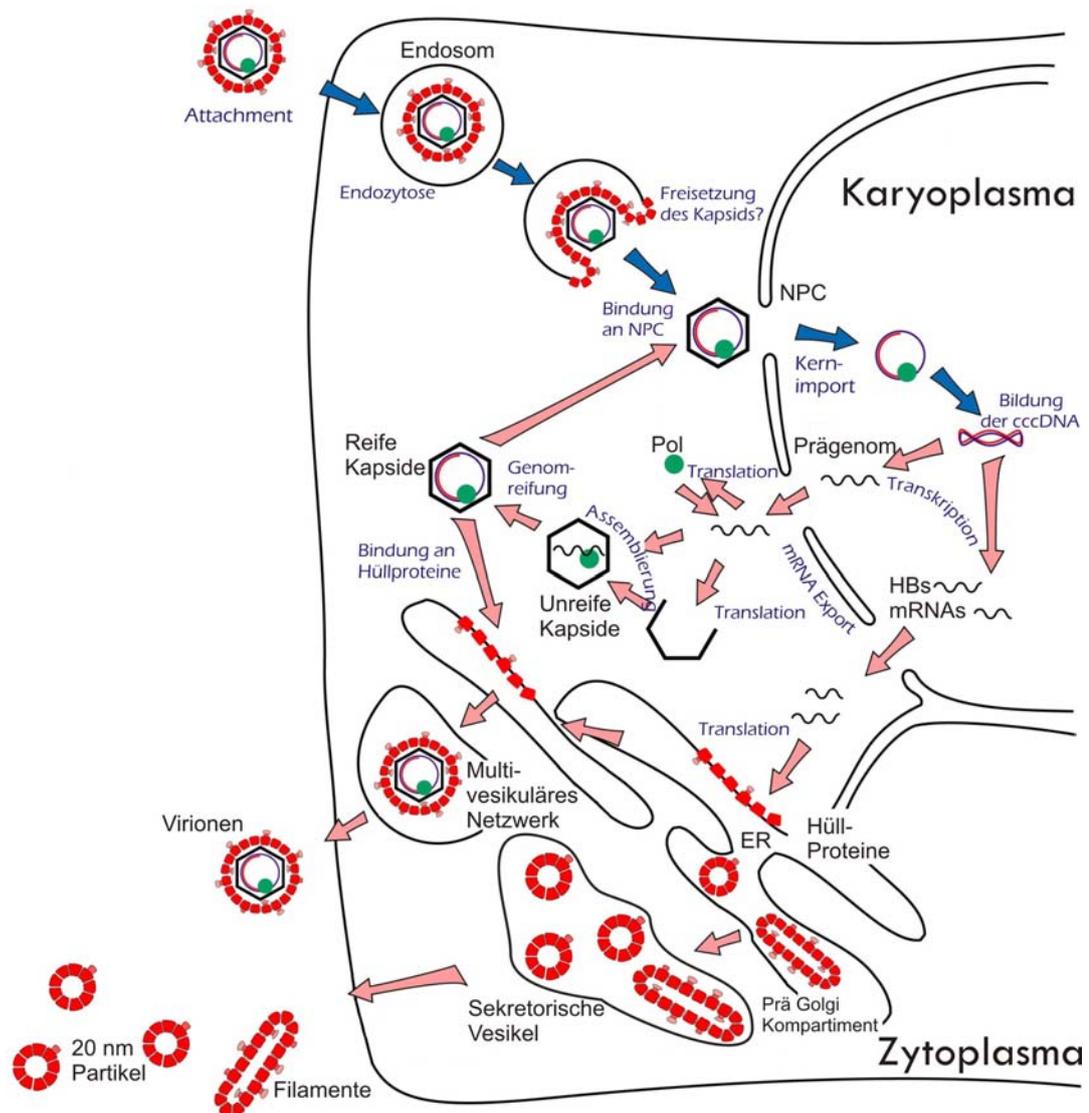


Abbildung 1-4 Intrazellulärer Lebenszyklus des Hepatitis B Virus; NPC: Kernporenkomplex; ER: Endoplasmatisches Retikulum. Die Synthese von HBeAg und HBxAg werden in dieser Abbildung vernachlässigt. Weitere Details sind im Text beschrieben.

[nach Schäfer, Glebe und Gerlich, in Druck, 2009]

Die pg-mRNA interagiert mittels ihrer ϵ -Struktur mit der viralen Polymerase und zellulären Chaperonen zu einem Komplex, der sobald genügend Core-Protein vorhanden ist, enkapsidiert wird [Hu und Seeger, 1996; Seifer *et al.*, 1993] und ein unreifes Kapsid bildet. Innerhalb des Core-Partikels dient nun die pg-mRNA als *template* für die reverse Transkription und die anschließende Plusstrang-Synthese. Nach vollendeter Minusstrangsynthese kann das nun reife Kapsid entweder erneut in den Kern wandern, was zu einer Amplifikation des intranukleären cccDNA-Levels führt, oder es kann mit HBsAg-haltigen Membranen umhüllt werden. Dann werden die Viren vermutlich über *multivesicular bodies* (MVBs) exozytiert [Lambert *et al.*, 2007]. Die viralen Hüllproteine können sich auch autonom am ER zu nicht-infektiösen, subviralen Partikeln zusammenschließen, die über den Golgi-Apparat sekretiert werden. Die bei HBV vorhandene Glykosylierung der Oberflächenproteine findet entweder kotranslational im ER statt (N-Glykosylierung) oder posttranslational im Golgi Apparat (O-Glykosylierung).

1.2 Klinische Aspekte der HBV Infektion

1.2.1 Transmission

Die Übertragung von HBV kann sowohl horizontal (sexueller Kontakt, Blut, Schleimhautkontakt) als auch vertikal (vorwiegend perinatal von der Mutter auf den Säugling) erfolgen. Bei hoch virämischen Trägern ($> 10^8/\text{ml}$) ist bereits eine sehr geringe Menge Serum (1 nl) infektiös, aber auch andere Körperflüssigkeiten (Speichel, Ejakulat, Vaginalsekret etc.) können eine Übertragung verursachen [Lavanchy, 2004]. Bei der Übertragung spielt neben dem Infektionstiter, auch die Häufigkeit und Intensität der Exposition und der Hygienestandard eine Rolle. Genomtiter von $< 10^6/\text{ml}$ scheinen selbst bei engem Kontakt kein Risiko darzustellen, so lange das Virus nicht direkt in die Blutbahn gelangt. Auch eine perinatale Übertragung scheint bei geringerer Virämie selten [Ip *et al.*, 1989].

1.2.2 Serologische Marker

Während der HBV-Infektion können unterschiedliche serologische Marker, abhängig vom Infektionsverlauf, detektiert werden. Die wichtigsten sind in Tabelle 1-3 aufgeführt.

Tabelle 1-3 Charakteristische serologische Marker der HBV Infektion.

[modifiziert nach WHO, 2008]

<i>Antigene</i>	<i>Antikörper</i>
<p>HBsAg</p> <p>Frühester Indikator einer akuten Infektion und bei Persistenz von mehr als 6 Monaten Indikator einer chronischen Infektion.</p>	<p>anti-HBs</p> <p>Spezifischer Antikörper zum HBsAg. Er erscheint ca. 1-4 Monate nach dem Ausbruch von Symptomen und indiziert die klinische Genesung mit folgender Immunität. Anti-HBs kann HBV neutralisieren und bietet Schutz gegen eine HBV-Infektion (z.B bei Impfung).</p>
<p>HBcAg</p> <p>Das HBcAg ist im Blutstrom nicht direkt nachweisbar, sondern nur umhüllt durch HBsAg. In der Leberzelle ist es histologisch nachweisbar und indiziert virale Replikation.</p>	<p>anti-HBc</p> <p>Spezifischer Antikörper zum HBcAg, der als IgM und IgG vorkommt und das Virus nicht neutralisiert. Die Präsenz von hohen IgM anti-HBc-Titern indiziert eine akute Infektion während IgG anti-HBc eher auf eine chronische oder überwundene Infektion hindeutet.</p>
<p>HBeAg</p> <p>Erscheint während einer akuten Infektion parallel zum HBsAg, wenn der Patient höchst infektiös ist. Wird nicht ins Virion inkorporiert sondern ins Serum sekretiert. Es existieren Mutanten die zwar replizieren, aber kein HBeAg sekretieren (z. B. präCore-Mutante).</p>	<p>anti-HBe</p> <p>Spezifischer Antikörper zum HBeAg. Während der Infektion kommt es zur Serokonversion (anti-HBe), welche das Ausheilen der Infektion anzeigt. Die Anwesenheit von anti-HBe im Blut des Patienten (anti-HBc⁺, HBsAg⁻) indiziert im Allgemeinen eine niedrige Ansteckungsgefahr bzw. Genesung.</p>

1.2.3 Infektionsverläufe

Nach HBV-Infektion können unterschiedliche Verläufe definiert werden, basierend auf den Ergebnissen von serologischen Tests für HBV-Antigene und deren korrespondierenden Antikörpern (Tabelle 1-3). Der Verlauf einer HBV-Infektion kann sehr vielfältig sein und hängt von mehreren Faktoren ab wie der Infektionsdosis, dem Immunstatus des Wirtes, sowie dessen körperlichen Beschaffenheiten (Alter, Geschlecht, Gesundheitszustand).

Ein akuter Infektionsverlauf (AHB: Akute Hepatitis B) entwickelt sich meist bei immunkompetenten Personen, die mit hoch infektiösem Serum oder Blut infiziert wurden. Die AHB heilt in 90-95 % der Fälle aus, in 0,5-1 % der akuten Fälle kommt es zu einem besonders schweren Verlauf, der fulminanten Hepatitis. Sie führt häufig innerhalb weniger Tage bis Wochen zum Leberversagen und verläuft in zwei Drittel der Fälle letal [Ganem und Prince, 2004]. Eine geringe Infektionsdosis führt bei immunkompetenten Personen hingegen meist zu einem inapparenten, symptomlosen Verlauf mit anschließender Immunität. In anderen Individuen persistiert HBV und es können, basierend auf den serologischen Markern, unterschiedliche klinische Bilder einer viralen Persistenz definiert werden: die chronische Hepatitis B (CHB), die Immuntoleranz, der inaktive oder „gesunde“ HBsAg-Trägerstatus und die okkulte HBV Infektion (OBI) (Tabelle 1-4).

Tabelle 1-4 Typische serologische Profile von Patienten mit einer HBV Infektion; AHB: Akute Hepatitis B; CHB: chronische Hepatitis B; OBI: okkulte HBV Infektion; +¹): > 10⁵ Kopien; +²): 10⁹-10¹⁰ Kopien; +³): < 10⁵ Kopien; +⁴): < 10³ Kopien; ges.: gesamt; Ausnahmen sind häufig.
[modifiziert und erweitert nach Torbenson und Thomas, 2002]

Serologie	HBV Impfung	AHB	Überstandende HB	CHB	Immun- toleranz	„Gesunder“ Träger	OBI
anti-HBs	+	-	+	-	-	-	+/-
anti-HBc (ges)	-	+	+	+	+	+	+/-
anti-HBe	-	-	+/-	+/-	+/-	+	+/-
HBsAg	-	+	-	+	+	+	-
HBeAg	-	+	-	+/-	+	-	+/-
HBV-DNA	-	+	-	+ ¹)	+ ²)	+ ³)	+ ⁴)

1.2.3.1 Akute Hepatitis B (AHB)

Die Symptome der AHB sind zu Beginn eher unspezifisch. Nach einer Inkubationsphase von mehreren Wochen folgt die Prodromalphase mit grippeähnlichen Symptomen wie Fieber, Kopf- und Gliederschmerzen, Müdigkeit oder Unwohlsein, die bis zu vier Wochen dauern kann. Anschließend folgen Symptome wie Übelkeit, Erbrechen, Schmerzen im rechten Oberbauch und in schweren Infektionsverläufen ein ikterisches Stadium. Für die Diagnose der AHB ist die Bestimmung der Alanin-Aminotransferase (ALT), ein Marker für die Hepatozytenschädigung, essenziell. Werte > 500 IU/l sind für eine akute Hepatitis charakteristisch [Thomas, 2000]. Der typische zeitliche Verlauf einer AHB ist in Abbildung 1-5 dargestellt. Der zuverlässigste Parameter einer AHB sind IgM-Antikörper gegen das HBcAg (IgM anti-HBc), die parallel mit dem Beginn der Symptome auftreten. Als weiterer klinischer Marker gilt das HBsAg im Serum, das während der Inkubationsphase ansteigt, typische Spitzen von 10^4 - 10^5 PEIU/ml erreicht und mit Beginn der Prodromalphase langsam bis zur vollständigen Genesung wieder abfällt. HBV-DNA erscheint während der Inkubationsphase und erreicht vor Beginn der Symptome Maximalwerte von 10^6 - 10^9 GE/ml. Rekonvaleszenz wird vermutet, wenn die ALT-Werte auf Normalniveau abgesunken sind. Das HBsAg verschwindet und anti-HBs erscheint einige Wochen später. Das IgM anti-HBc sinkt auf Werte unter 100 PEIU, während Antikörper des IgG-Typs (IgG anti-HBc) weiter bestehen, oft lebenslang.

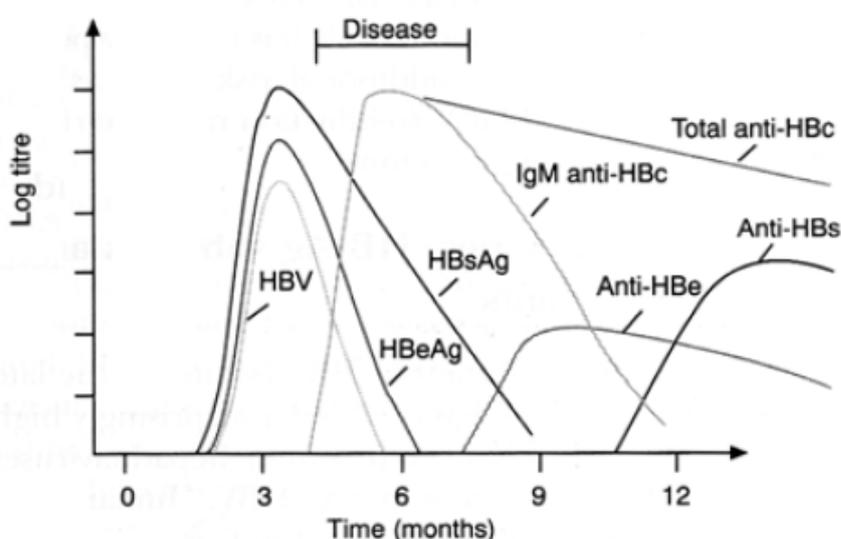


Abbildung 1-5 Serologische Marker einer ausheilenden, akuten Hepatitis B (AHB) im zeitlichen Verlauf (Monate). [nach Kann und Gerlich, 2005]

1.2.3.2 Chronische Hepatitis B (CHB)

Von einer chronischen Hepatitis B spricht man, wenn HBsAg länger als 6 Monate nach der akuten Infektion im Serum nachweisbar ist. Die Symptome der CHB sind gewöhnlich mild und unspezifisch und umfassen z.B. Antriebslosigkeit, Unwohlsein oder Gelenkschmerzen. In der frühen Phase der chronischen Infektion ist HBeAg oft vorhanden und die HBV-DNA detektierbar. Dennoch sind die Mengen an ALT, HBV-DNA, HBeAg und IgM anti-HBc oft instabil und fluktuieren, gelegentlich sind sie sogar negativ. Eine Besonderheit der späten Phase der CHB ist die Selektion von Varianten mit Deletionen oder Mutationen, die zu einer veränderten HBV-Expression führen können. Ein typisches Beispiel ist die präCore-Mutation, welche die Expression des HBeAg verhindert [Hadziyannis und Vassilopoulos, 2001]. Es können auch Mutationen in den Regionen der B-Zell-Epitope des HBcAg oder des präS auftreten (1.2.5). Der chronische Verlauf manifestiert sich bei 5-10 % der Erwachsenen, aber in 90 % der infizierten Neugeborenen [Ganem und Prince, 2004]. Bei der CHB besteht ein hohes Übertragungsrisiko und generell ist bei chronisch Infizierten das Risiko zur Entwicklung von Leberzirrhose und dem hepatozellulären Karzinom (HCC) um den Faktor 100 bis 200 erhöht [Beasley *et al.*, 1981].

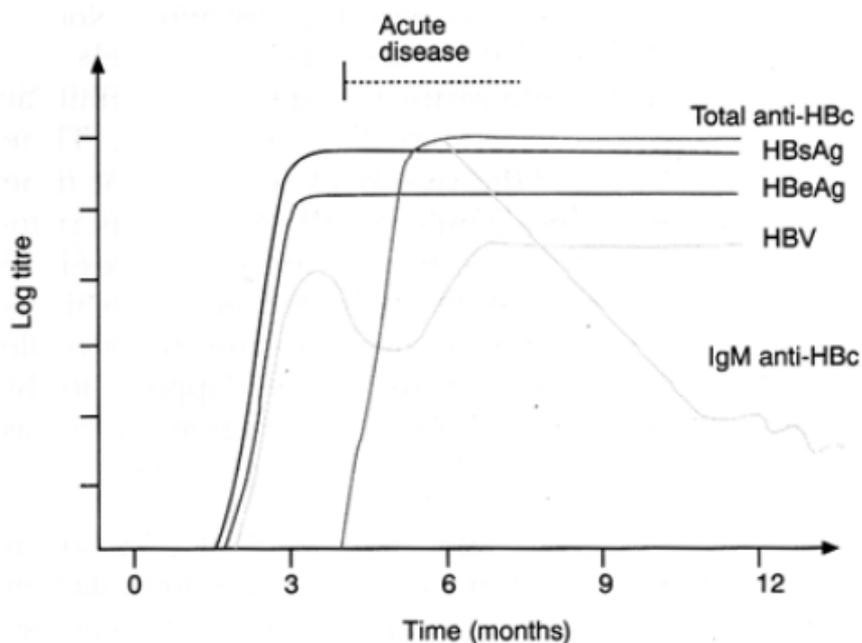


Abbildung 1-6 Chronischer Verlauf (Monate) nach akuter HBV Infektion ohne bzw. vor HBeAg Serokonversion. [nach Kann und Gerlich, 2005]

1.2.3.3 Immuntoleranz

Je nach Alter und Immunstatus des Infizierten kann die Immunabwehr gegen HBV stark verzögert oder sogar blockiert sein, so dass sich das Virus stark vermehren kann und eine Art Immuntoleranz des Wirtes auslöst. In diesem Fall liegt eine hohe Virämie vor und die immuntoleranten Individuen sind hoch infektiös. Im Serum können hohe Mengen an HBsAg, HBeAg und HBV-DNA (10^9 - 10^{10} GE/ml) nachgewiesen werden, die allerdings mit Einsetzen der Immunkontrolle wieder abnehmen.

1.2.3.4 Inaktiver oder „gesunder“ HBsAg-Trägerstatus

Von einem gesunden Träger spricht man, wenn in dessen Serum das HBsAg detektierbar bleibt, die Leberenzyme aber auf einen normalen Level sind, HBV DNA unter 10^4 Kopien/ml liegt und das HBeAg negativ ist. Das Fehlen von HBeAg geht meist mit einer niedrigen Virämie einher. Diese Individuen sind im normalen Umgang nicht infektiös, mit Ausnahme von Blutspenden. Außerdem besitzen sie ein geringes Risiko für die Entwicklung einer Zirrhose oder eines HCCs. Das Fehlen von IgM anti-HBc, in Anwesenheit von IgG anti-HBc, lässt ebenfalls auf eine niedrige Krankheitsaktivität und einen stabilen Trägerstatus schließen.

1.2.3.5 Okkulte HBV Infektionen (OBI)

Okkulte HBV Infektionen (OBI) sind dadurch charakterisiert, dass mit den momentan erhältlichen Testsystemen im Serum kein HBsAg nachweisbar ist und nur sehr niedrige, oft kaum detektierbare Mengen an HBV-DNA von $< 10^3$ Kopien/ml [Torbenon und Thomas, 2002] oder < 200 IU/ml [Raimondo *et al.*, 2008]. Bei der Umrechnung entspricht 1 IU ca. 5,4 GE [Saldanha *et al.*, 2001]. Im Lebergewebe kann die HBV-DNA mit Hilfe des sehr sensitiven NAT (Nukleinsäure-Amplifikations-Test) meist detektiert werden. Aufgrund der serologischen Marker kann die okkulte HBV Infektion in seropositive oder seronegative Formen unterteilt werden [Raimondo *et al.*, 2008]. Bei beiden Formen ist zwar kein HBsAg detektierbar, aber im Gegensatz zur seropositiven OBI können bei der seronegativen OBI auch anti-HBc und/oder das anti-HBs nicht nachgewiesen werden. In diesen Fällen sind die spezifischen HBV-Antikörper

entweder im Verlauf abhanden gekommen oder eventuell aufgrund einer serologisch stummen Infektion (primär okkulte Infektion), die sich auf das lymphatische System beschränkt, von Beginn an negativ sein [Michalak *et al.*, 2004]. Zusätzlich kann noch die „falsche“ OBI unterschieden werden. Bei diesen Fällen sind relativ hohe Mengen an HBV-DNA (> 200 IU/ml) im Serum nachweisbar und das HBsAg kann aufgrund von *escape*-Mutationen in den wesentlichen Epitopen des S-Gens nicht von den kommerziellen immunologischen Testsystemen erkannt werden (Abbildung 1-7). Solche Fälle können diagnostiziert werden indem die HBV-DNA mittels PCR nachgewiesen wird.

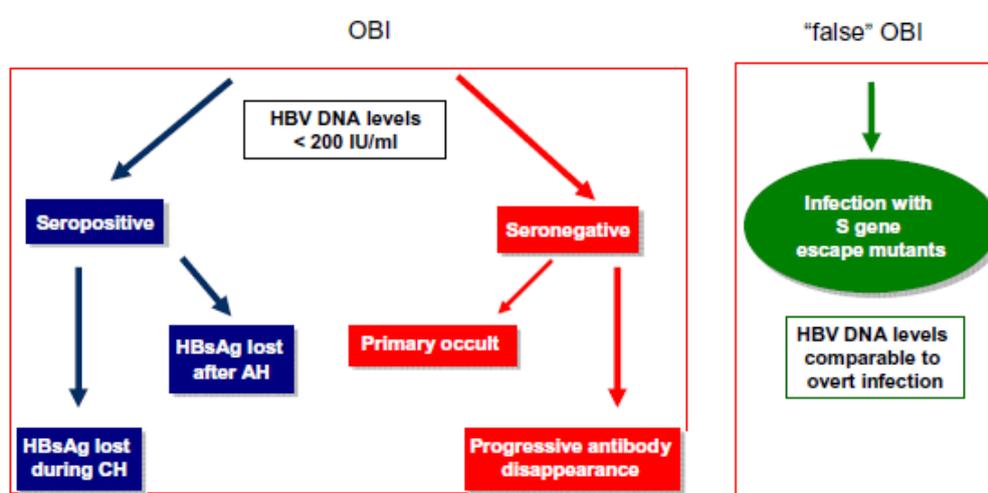


Abbildung 1-7 Schematische Darstellung der HBV Profile in echten okkulten HBV Infektionen (OBI) und „falschen“ OBI; CH: chronische Hepatitis, AH: akute Hepatitis. [nach Raimondo *et al.*, 2008]

1.2.4 Immunpathogenese bei HBV

Die Immunantwort des Wirtes ist entscheidend für den Verlauf der HBV-Infektion sowie den Erfolg einer HBV-Impfung. Für die Vermittlung des Vakzin-induzierten Schutzes spielen hauptsächlich Antikörper eine Rolle, die gegen das in allen Impfstoffen enthaltene HBsAg von HBV gerichtet sind. Dabei spielen besonders die Epitope der antigenen Determinante innerhalb der MHL (*major hydrophilic loop*) des HBsAg eine wichtige Rolle. Für die Pathogenese und die Viruselimination während der natürlichen HBV-Infektion sind insbesondere die

HBV-spezifischen T-Zellen (CD8⁺ T-Zellen) der zellulären Immunantwort verantwortlich [Chisari und Ferrari, 1995]. Die T-Zellantwort ist bei der akuten, selbst-limitierenden Infektion stark und multispezifisch, während sie bei der chronischen Infektion relativ schwach verläuft, abgesehen von den sogenannten spontan auftretenden *flares*. Die Effektorfunktion der CD8⁺ T-Zellen umfasst zwei unterschiedliche Mechanismen. Zum einen können sie durch die Sekretion antiviraler Zytokine wie Interferon Gamma (IFN γ) oder Tumornekrosefaktor Alpha (TNF α) zur Viruselimination beitragen [Guidotti *et al.*, 1996; Guidotti *et al.*, 1999], zum anderen können sie als zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) die infizierten Zellen direkt abtöten. Es wird angenommen, dass die frühe Phase der viralen *clearance* mit dem nicht-zytopathischen Effekt und dem Auftreten von IFN γ mRNA in der Leber assoziiert ist [Guidotti *et al.*, 1999; Thimme *et al.*, 2003]. IFN γ und TNF α inhibieren die Virusreplikation indem die HBV-mRNA und angeblich auch die cccDNA destabilisiert werden [Murray *et al.*, 2005]. Die finale Viruselimination und damit verbundene Rekonvaleszenz findet erst einige Wochen später statt und wird vermutlich durch die zytotoxische Effektorfunktion der CTLs ausgelöst [Guidotti *et al.*, 1999], was auch schon in *Woodchucks* gezeigt werden konnte [Guo *et al.*, 2000].

Es gibt allerdings immer mehr Hinweise für die Annahme, dass auch in rekonvaleszenten Patienten intrahepatische HBV-Genome existieren. Diese können nach Replikation gelegentlich ins Blut übergehen und dort eine *low-level* Virämie verursachen [Allain, 2004] oder sie können weiterhin die CD8⁺ T-Zellen stimulieren, welche die virale Expression und Replikation kontrollieren [Rehermann *et al.*, 1996]. Diese *low level persistence* erlaubt die Reaktivierung der HBV-Replikation, wenn zum Beispiel aufgrund einer Organtransplantation oder Chemotherapie, die T-Zellantwort supprimiert wird. Das kann fatale Folgen haben, da nach Beendigung der Therapie und der damit verbundenen Immunsuppression, die T-Zellen wieder proliferieren und es zu einer verstärkten Immunantwort kommt, bei der die Hepatozyten in großer Menge zerstört werden [Westhoff *et al.*, 2003]. Selbst ein hoher anti-HBs Level kann in diesem Fall nicht zuverlässig vor einer Reaktivierung schützen, da *escape*-Mutanten hochwachsen, die der Immunkontrolle entgehen können.

1.2.5 HBV-Mutanten und ihre Bedeutung für die Pathogenese

Aufgrund der fehlenden *proof-reading* Aktivität der reversen Transkriptase von HBV ist das Genom während der Replikation für Nukleotid-Substitutionen anfällig. Die Mutationen können sich ansammeln, so dass eine Reihe von genetisch unterschiedlichen, aber dennoch nahe verwandten „Quasispezies“ vorliegen. Einige dieser Varianten besitzen einen Selektionsvorteil und können sich somit gegen andere Varianten durchsetzen. Dieser Selektionsprozess liefert unterschiedliche Mutanten des Hepatitis B Virus, die mit unterschiedlichen klinischen Bildern manifestiert sind (Tabelle 1-5). Eine der ersten bei HBV entdeckten Mutationen ist die präCore-Stop-Mutation, die zu einem Verlust des HBeAg führt [Carman *et al.*, 1990; Liang *et al.*, 1991]. Andere Mutationen resultieren in einer veränderten Antigenerkennung und Immunantwort und sind in Gen-Bereichen des HBsAg lokalisiert [Zuckerman und Zuckerman, 2003]. Auch die Medikation mit antiviralen Substanzen kann zu Mutationen innerhalb des Polymerase-Gens und damit resultierenden assoziierten Resistenzen führen [Locarnini, 2008; Zoulim und Locarnini, 2009].

Tabelle 1-5 Einige HBV Varianten und ihr potentieller Einfluss auf die Pathogenese der HBV Infektion; angegeben ist die Region in der die Mutation auftritt, der daraus resultierende Phänotyp und die klinische Relevanz. [modifiziert nach Baumert *et al.*, 2007]

HBV-ORF	Phänotyp	Klinische Relevanz
präS/S	Virusretention, Defekter Zusammenbau Änderung der B- und T-Zell-Epitope	Fibrosierende cholestatische Hepatitis (FCH) Vakzin- <i>escape</i> Immun- <i>escape</i> Diagnostischer <i>escape</i>
präC	PräC-Stop Mutation → Verlust des HBeAg	Schwere Hepatitis
RT/Pol	Replikationsdefizienz Resistenz gegen Antivirale Substanzen	Virale Latenz, Persistenz Therapie- <i>escape</i>
Core-Promotor	verstärkte Replikation	Schwere Hepatitis

Daneben gibt es noch eine Reihe von Mutationen, die in regulatorischen Elementen, wie z.B dem *Core*-Promotor, auftreten. Die häufigste *Core*-Promotor-Mutante weist eine Doppelmutation auf (A1764T, G1766A), die zu einer verstärkten viralen Replikation führt [Baumert *et al.*, 1996].

1.2.5.1 Vaccine-escape-Mutanten

Vaccine-escape-Mutanten zeichnen sich dadurch aus, dass sie trotz der Anwesenheit von anti-HBs Antikörpern eine HBV-Infektion verursachen können. Im Rahmen eines Passiv-Aktiv-Impfprogramms in Italien wurde bei Kinder, trotz primärer Immunantwort gegen den HBsAg-Impfstoff, eine HBV-Infektion nachgewiesen. Die Bestimmung der HBV DNA-Sequenz zeigte, dass eines dieser Kinder mit einer HBV-Variante infiziert war, bei der in der S-Domäne das Glycin (G) an Position 145 zu Arginin (R) ausgetauscht war [Carman *et al.*, 1990; Waters *et al.*, 1992]. Diese Mutation führt zum Verlust der antigenen *a*-Determinante, welche das Hauptziel der Impfantwort darstellt. Somit kann sich trotz Anwesenheit von anti-HBs eine HBV-Infektion etablieren. Ähnliche Fälle, auch solche mit anderen Mutationen, wurden in Gambia [Fortuin *et al.*, 1994] und Japan [Yamamoto *et al.*, 1994] berichtet und sind weltweit verbreitet [Zuckerman und Zuckerman, 2003]. Neben dem *escape* auf dem Level der B-Zellen, kann es auch zu einem HBsAg-Epitop vermittelten *Vaccine-escape* auf T-Zell-Ebene kommen [Bauer *et al.*, 2002].

1.2.5.2 Andere Immune-escape-Mutanten

HBV kann der Immunkontrolle durch zytotoxische T-Lymphozyten entgehen, indem es die virus-spezifischen T-Zell-Epitope durch Mutationen verändert. Fälle von *Immune-escape*-Mutanten wurden bei Patienten nach einer Lebertransplantation beschrieben, die polyklonale anti-HBs Antikörper (HBIG, Hepatitis B Immunglobulin) verabreicht bekommen hatten um eine Reinfektion des Organs zu vermeiden [Carman *et al.*, 1996; McMahon *et al.*, 1992; Protzer und Schaller, 2000]. Ebenso konnte *Immune-escape* in anti-HBs positiven Individuen mit okkulten HBV-Infektion identifiziert werden [Yamamoto *et al.*, 1994].

1.2.5.3 Diagnostik-escape-Mutanten

Die meisten kommerziellen Testsysteme basieren auf dem Nachweis von HBsAg mittels anti-HBs Antikörper [Yamamoto *et al.*, 1994]. Befinden sich Mutationen innerhalb der antigenen Determinante der HBsAg-Schleife gegen die das anti-HBs des Tests gerichtet ist, so kann es zu einem diagnostischen *escape* kommen. Das Auftreten solcher Varianten kann zu einer okkulten HBV Infektion führen [Chemin und Trepo, 2005] bei der kein HBsAg nachweisbar ist und dazu beitragen, dass ein Testergebnis als falsch-negativ bewertet wird.

1.2.5.4 Therapie-escape-Mutanten

In den letzten Jahren wurden immer häufiger Mutationen im Polymerase-Gen bei chronisch HBV-infizierten Patienten identifiziert, die mit antiviralen Medikamenten behandelt wurden [Durantel *et al.*, 2005]. Besonders bei langjähriger Gabe von Nukleosid- oder Nukleotid-Analoga wie Lamivudin oder Adefovir treten Resistenzen in der reversen Transkriptase-Domäne auf, die sich auch auf die überlappende S-Domäne auswirken können [Locarnini, 2003]. Aufgrund der spontanen Fehlerrate der Polymerase akkumulieren sich während des natürlichen Infektionsverlaufs virale Mutanten. Werden diese durch die Gabe einer antiviralen Substanz einem Selektionsdruck ausgesetzt, werden diejenigen Mutanten selektioniert, die sich am besten unter Anwesenheit des Medikaments replizieren können. Besonders bekannt ist das in der katalytischen Domäne der RT vorliegende YMDD-Motiv, das durch Lamivudin-Therapie zu YIDD (rtM204I) oder YVDD (rtM204V) mutieren kann [Allen *et al.*, 1998]. Es gibt eine Reihe von antiviralen Substanzen, die für die Mutation bestimmter Nukleotid-Positionen im HBV-Genom verantwortlich sind.

1.2.6 HBV-Übertragung durch Blutspenden

Im Blutspendewesen müssen alle Blut- und Plasmaspenden auf das Vorhandensein von HBsAg getestet werden, wobei HBsAg-positive Spenden nicht verwendet werden dürfen. Die Vorfälle der HBV-Übertragung durch kontaminierte Blutspenden sind selten und die Wahrscheinlichkeit, dass eine infektiöse Spende

unerkannt bleibt, obwohl sie auf HBsAg getestet wurde, liegt in Deutschland bei 1:230.000 [Offergeld *et al.*, 2005]. Die Gründe, dass eine Spende trotz Testung HBV enthält, können vielfältig sein. Zum einen ist das HBsAg bei einem akuten Infektionsverlauf während der frühen und späten Fensterphase nicht detektierbar [Raimondo *et al.*, 2007]. Zum anderen können Varianten oder *escape*-Mutanten für den negativen HBsAg-Befund verantwortlich sein. Daher werden mittlerweile in einigen Ländern Blutspenden fakultativ mittels Nukleinsäure-Amplifikations-Tests (NAT) auf das Vorhandensein von HBV-DNA geprüft, um das Übertragungsrisiko zu senken [Nübling *et al.*, 2008]. In Deutschland wird dieses Verfahren seit 1997 routinemäßig angewendet [Hourfar *et al.*, 2008] und auch in Japan [Ohnuma *et al.*, 2001] ist die Anwendung üblich, während in anderen Ländern wie z.B der Schweiz [Niederhauser *et al.*, 2008] die routinemäßige Durchführung noch umstritten ist. Eine Studie des Deutschen Blutspendedienstes, in der über 30 Millionen Blutspenden mittels NAT getestet wurden, hat gezeigt, dass das Risiko einer unerkannten infektiösen Spende bei 1:360.000 liegt [Hourfar *et al.*, 2008]. Durch die Anwendung des *Minipool*-NAT konnten bereits einige HBV-Infektionen in der frühen Fensterphase detektiert werden [Meisel *et al.*, 2003; Minegishi *et al.*, 2003], dennoch ist auch dieses System nicht unfehlbar da ihm oftmals die Sensitivität fehlt. Seit 2006 wird zusätzlich auf einen weiteren HBV-Marker, das anti-HBc, getestet [Burger und Offergeld, 2005]. Das führt allerdings gerade in Gebieten mit hoher Prävalenz zu einer hohen Ausschlussrate an Blutspendern. Sind die Spender allerdings anti-HBs positiv, wird davon ausgegangen, dass die protektiven Antikörper übertragen werden und somit keine HBV-Transmission stattfindet. Dies wurde experimentell in Schimpansen-Versuchen überprüft [Prince *et al.*, 2001]. Neuerdings wurde aber trotz anti-HBs doch HBV übertragen [Levicnik-Stežinar *et al.*, 2008], so dass zusätzlich ein negativer HBV-DNA-Befund verlangt werden muss.

.

1.3 Infektionssysteme für die experimentelle HBV-Infektion

1.3.1 *In vivo*-Infektion

Die klassischen Labortiere wie Maus, Ratte oder Kaninchen eignen sich nicht für Studien der HBV-Infektion, da diese Tiere aufgrund der hohen Wirtsspezifität der *Hepadnaviridae* nicht für das Virus suszeptibel sind. Schimpansen gelten als sensitives Tiermodell für die Untersuchung der humanen HBV-Infektion [Barker *et al.*, 1975], aber aus ethischer und wirtschaftlicher Sicht ist dieses Modell eher ungeeignet und wird nur noch selten angewendet. Zur Erforschung der *in vivo*-Infektion bei Hepadnaviren wird derzeit meist das DHBV (*Duck Hepatitis B Virus*) der Ente oder das WHV (*Woodchuck Hepatitis Virus*) des amerikanischen Waldmurmeltiers eingesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass *Woodchucks* auch mit GSHV (*Ground Squirrel Hepatitis Virus*) [Seeger *et al.*, 1991] und ASHV (*Arctic Squirrel Hepatitis Virus*) [Lorenz, 2006] infiziert werden können.

1.3.2 *In vitro*-Infektion

Auch die *in vitro*-Infektion mit HBV erweist sich aufgrund der hohen Wirtsspezifität der Hepadnaviren als äußerst schwierig. Humane Hepatomzelllinien wie HepG2 oder Huh7 sind zwar in der Lage nach transienter oder stabiler Transfektion Virionen zu produzieren [Sells *et al.*, 1987], sind aber nicht suszeptibel für HBV [Qiao *et al.*, 1994]. Eine Ausnahme bildet die HepaRG Zelllinie, die nach vierwöchiger Kultivierung mit 1 % DMSO in Gegenwart von PEG für HBV suszeptibel ist [Gripon *et al.*, 2002]. Primäre humane Hepatozyten (PHH) können zwar mit HBV infiziert werden, sind allerdings schwer in Kultur zu nehmen, nicht regelmäßig verfügbar und zeigen keine homogene Suszeptibilität. Als Alternative kann mit primären Enten Hepatozyten (PDH) oder primären Tupaia Hepatozyten (PTH) gearbeitet werden. Ende der 80er Jahre konnte gezeigt werden, dass primäre Hepatozyten des ostasiatischen Spitzhörnchens (*Tupaia belangeri*) für HBV suszeptibel sind [Li *et al.*, 1995; Su, 1987; Yan *et al.*, 1996] und sich diese Hepatozyten sowohl *in vivo* als auch *in vitro* mit HBV infizieren lassen [Walter *et al.*, 1996]. Der Verlauf der HBV-Infektion ist analog zu der in humanen Hepatozyten [Glebe *et al.*, 2003].

1.4 Zielsetzung und experimentelle Ansätze der Arbeit

Zum Säuger-spezifischen Genus *Orthohepadnavirus* der Familie *Hepadnaviridae* gehören neben dem humanen Hepatitis B Virus (HBV) auch das *Arctic Squirrel* (Arktisches Erdhörnchen) *Hepatitis Virus* (ASHV), das *Ground Squirrel* (Erdhörnchen) *Hepatitis Virus* (GSHV) und das *Woodchuck* (Waldmurmeltier) *Hepatitis Virus* (WHV). Allen Hepadnaviren ist gemein, dass sie hepatotrop, nicht-zytopathogen und sehr wirtsspezifisch sind. In der vorliegenden Arbeit sollte die Struktur und Funktion natürlich auftretender Virus-Varianten im Genus *Orthohepadnavirus* untersucht werden. Dazu sollten sowohl Genome des *Arctic Squirrel Hepatitis Virus* (ASHV) als auch Genomabschnitte des humanen Hepatitis B Virus (HBV) zuerst kloniert und die erhaltenen Sequenzen dann mit publizierten Referenzgenomen verglichen werden.

Zunächst sollten im Rahmen einer Studie des Instituts für Medizinische Virologie in Kooperation mit Dr. Stephan Menne von der *Cornell University, Ithaka, USA*, zwei ASHV-Seren untersucht werden. Die eine Serumprobe stammte aus einem chronisch mit ASHV-infizierten *Arctic Squirrel* (Wildfang, Kolonie ASHV_3P), die andere Probe aus einem experimentell, akut mit ASHV-infizierten *Woodchuck* (ASHV#3537) [Lorenz, 2006]. Für den Sequenzvergleich sollten das bereits publizierte ASHV_{AGU29144} [Testut *et al.*, 1996] sowie die Genomsequenzen der beiden verwandten Hepatitisviren GSHV und WHV herangezogen werden.

Nach Analyse der Hörnchen (*Sciuridae*)-Virussequenzen, sollte dann das humane Hepatitis B Virus näher untersucht werden. Im Blickpunkt standen dabei hauptsächlich Seren von Blutspendern mit einer okkulten HBV Infektion (OBI). Diese Art der Infektion zeichnet sich dadurch aus, dass zwar moderate Mengen replikationskompetenter HBV-DNA in der Leber vorhanden sind, im Serum aber kein HBsAg nachgewiesen werden kann [Allain, 2004]. Grund dafür können *escape*-Mutationen in der S-Domäne des HBsAg sein, so dass die Veränderung der B- und T-Zell-Epitope zu einem *Vaccine*-, Immun-, oder Diagnostischen *escape* führen kann. In seltenen Fällen führt dieser *escape* bei Blut- oder Organspenden zur Transmission von HBV, da die infektiösen Spenden mit den kommerziellen HBsAg-Testsystemen nicht identifiziert werden können. Aufgrund der medizinischen Relevanz solcher okkulten Infektionen sollten klinisch interessante Serumproben von okkult infizierten Blutspendern charakterisiert

werden. Da die Vermehrung des Hepatitis B Virus bei OBI durch das Immunsystem kontrolliert wird, war ein hoher Selektionsdruck auf die im Serum nachweisbaren HBV-Genome zu erwarten und eine Vielzahl resultierender Quasispezies.

Im Zellkultursystem sollte dann geprüft werden, ob nach transienter Transfektion von klonierten HBV-Gesamtgenomen, virale Proteine exprimiert und ins Medium sekretiert werden. Dazu sollten die Überstände mittels ELISA auf HBsAg und HBeAg getestet werden. Besonders interessierte die Frage, ob anti-HBs, welches gegen normales HBsAg generiert wurde, in der Lage ist, die HBV-Infektion durch *escape*-Mutanten, *in vitro* zu inhibieren. Diese Frage sollte durch Neutralisationsversuche geklärt werden, bei denen die HBV-Infektion von primären Tupaia Hepatozyten inhibiert werden sollte.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Zum Ansetzen der Lösungen wurde das Wasser aus der Reinstwasser-Anlage (Ionenaustauscher, MILLIPORE, Eschborn) des Instituts verwendet. Alle Geräte, Chemikalien, *Kits*, Lösungen und sonstigen Materialien, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, sind unter dem jeweiligen Punkt aufgelistet und beschrieben.

2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterial

Geräte	Firma
Arterienklemme	MAGV, Rabenau-Londorf
AxSym [®] Plus	ABBOTT, Wiesbaden
Bakterienschalen	BD Biosciences, Heidelberg
Bakterienschüttler	INFORS AG, Bottmingen, CH
Brutschrank SteriCult 200	LABOTECT, Göttingen
Büchnertrichter	MAGV, Rabenau-Londorf
Einwegskalpelle	MAGV, Rabenau-Londorf
Einwegpipetten (5 ml, 50 ml)	BD Biosciences, Heidelberg
Elektrophoresekammer Agarosegele (Horizon 11•14)	GIBCO BRL, Life Technologies INC, USA
Elektrophoresekammer SDS PAGE (X-Cell Sure Lock™ Mini Cell)	INVITROGEN; Karlsruhe
ELISA-Schüttler ZLI164	AMERSHAM Biosciences, Braunschweig
ELISA-Washer COLUMBUS	TECAN Deutschland GmbH
Filterpapier WHATMAN (2mm)	SCHLEICHER & SCHUELL, Dassel
Glasbehälter (Messzylinder, Erlenmeyerkolben, Bechergläser etc.)	SCHOTT, Mainz
Kaffeemaschine TC60201	SIEMENS, München
Kanülen (0,9 x 40 mm)	TERUMO, BE
Laminar Flow Sterilbank HB 2448	HERAEUS, Hanau
LightCycler [®] PCR Gerät	ROCHE Diagnostics, Mannheim
LightCycler [®] Kapillaren	ROCHE Diagnostics, Mannheim
Mastercycler [®]	EPPENDORF, Hamburg
Mastercycler [®] gradient	EPPENDORF, Hamburg
Mikrotiterplatten MaxiSorb (ELISA)	NUNC, Wiesbaden
pH Meter 26	RADIOMETER, Kopenhagen, DK
Photometer DU 70	BECKMAN, München
Pipetten	GILSON, Limburg-Offheim
	EPPENDORF, Hamburg
Pipettierhilfen	INTEGRA Biosciences, Fernwald
Pipettenspitzen	SARSTEDT, Nümbrecht

Geräte	Firma
Pipettenspitzen, gestopft	VWR, Darmstadt
Präparierbesteck	MAGV, Rabenau-Londorf
Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	EPPENDORF, Hamburg
Reaktionsgefäße FALCON 15ml, 50 ml	BD Biosciences, Heidelberg
Siebdruckgaze (210 µm Porengröße)	MAGV, Rabenau-Londorf
SDS-Gele NuPAGE 12% Bis/Tris	INVITROGEN; Karlsruhe
Spannungsquelle Modell 200	GIBCO BRL, Life Technologies INC, USA
Stericup® Filter (22 µm Porengröße)	MILLIPORE, Schwalbach
Tischzentrifugen	EPPENDORF, Hamburg
▪ Centrifuge 5415C	
▪ Centrifuge 5417R	
Ultrazentrifuge	BECKMAN, München
▪ Rotor: SW41L	
UV-Transluminator TFX-20M	VILBER-LOURMAT, Torcy, FR
Vortexer	IKA Janke&Kunkel, Staufen
Wasserbad	
Zentrifuge CR422	JOUAN, Unterhachingen
▪ Rotor:	
Zentrifuge 5810R	EPPENDORF, Hamburg
▪ Rotor: A4-62	
Zentrifuge CENTRIKON H-401B	KONTRON Instruments, München
▪ Rotor: AS4.13	
Zentrifugenröhrchen für UZ	BECKMAN, München
Zellkulturschalen	BD Biosciences, Heidelberg
▪ 6 well, 12 well, 10 cm, 35 cm	

2.1.2 Chemikalien

Chemikalien	Firma
Agar	BD Biosciences, Heidelberg
Agarose (SEAKEM)	BIOZYM, Oldendorf
Ampicillin	ROTH, Karlsruhe
Antioxidans (SDS-PAGE)	INVITROGEN; Karlsruhe
Bacto™ Hefe Extrakt	BD Biosciences, Heidelberg
Bacto™ Trypton	BD Biosciences, Heidelberg
Bicarbonat	SIGMA, Taufkirchen
Bromphenolblau	SIGMA, Taufkirchen
BSA Fraktion V	ROTH, Karlsruhe
Casein 1% Lösung in PBS	PIERCE, Bonn
DECP Wasser	APPLICHEM, Darmstadt
Dexamethason	INVITROGEN; Karlsruhe
dNTP Mix	ROCHE Diagnostics, Mannheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	SIGMA, Taufkirchen
Dimethylformamid (DMF)	SIGMA, Taufkirchen
DMEM	INVITROGEN; Karlsruhe

Chemikalien	Firma
DMEM (Pulvermedium)	INVITROGEN; Karlsruhe
EDTA (0,5 M)	SIGMA, Taufkirchen
EGTA	SIGMA, Taufkirchen
Ethanol	RIEDEL DE HAEN, Seelze
Ethidiumbromid	SERVA, Heidelberg
FKS	PAN Biotech, Aidenbach
Glycerol	MERCK, Darmstadt
HBSS (ohne MgCl ₂ und CaCl ₂)	INVITROGEN; Karlsruhe
Isopropanol	MERCK, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	MERCK, Darmstadt
Kollagen Typ I	BD Biosciences, Heidelberg
Kanamycin	ROTH, Karlsruhe
Matrigel™ Basement Membrane Matrix	BD Biosciences, Heidelberg
Natriumchlorid	ROTH, Karlsruhe
NuPAGE LDS Probenpuffer (4X)	INVITROGEN; Karlsruhe
MOPS	ROTH, Karlsruhe
NaOH	MERCK, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin-Lsg. (100 X)	PAA, Pasching
Pyruvat	PAA, Pasching
Schwefelsäure	MERCK, Darmstadt
TMB X-tra (ready to use)	KEM-EN-TEC Diagnostics, Köln
Trypanblau (0,4 %)	SIGMA, Taufkirchen
Tween20	MERCK, Darmstadt
WST-1 Reagenz	ROCHE Diagnostics, Mannheim
X-Gal	SIGMA, Taufkirchen

2.1.3 Enzyme und Kits

Enzyme	Firma
Restriktionsenzyme (EagI, SapI, SacI, HindIII)	NEB, Frankfurt a.M.
Taq Polymerase, nativ	MBI FERMENTAS, St. Leon-Rot
GoTaq® Flexi DNA Polymerase	INVITROGEN; Karlsruhe
Trypsin	PROMEGA, Mannheim
Fast Start Taq SybrGreen Polymerase	SIGMA, Taufkirchen
Kollagenase IV	ROCHE Diagnostics, Mannheim
	SIGMA, Taufkirchen

Kits	Firma
AxSym® AUSAB Reagenz	ABBOTT, Wiesbaden
AxSym® AUSAB Standard Kalibratoren	ABBOTT, Wiesbaden
AxSym® Anti-HBe 2.0 Reagenz	ABBOTT, Wiesbaden
AxSym® Anti-HBe 2.0 Kontrollen	ABBOTT, Wiesbaden
Dynabeads® Protein G	DYNAL BIOTECH, Hamburg

Kits	Firma
<i>GenElute HP Plasmid Maxiprep Kit</i>	SIGMA, Taufkirchen
<i>GenElute HP Plasmid Megaprep Kit</i>	SIGMA, Taufkirchen
<i>High Pure Viral Nucleic Acid Kit</i>	ROCHE Diagnostics, Mannheim
<i>Montage Gel Extraction Kit</i>	MILLIPORE; Schwalbach
<i>NAb Spin Kit 0.2ml for Antibody Purification</i>	PIERCE, Bonn
<i>pGEM-T vector system I</i>	PROMEGA, Mannheim
<i>QIAGEN Plasmid Maxi Kit</i>	QIAGEN, Hilden
<i>QIAprep Spin Miniprep Kit</i>	QIAGEN, Hilden
<i>QIAquick PCR Purification Kit</i>	QIAGEN, Hilden
<i>QIAquick Gel Extraction Kit</i>	QIAGEN, Hilden
<i>TOPO XL PCR Cloning Kit</i>	INVITROGEN; Karlsruhe
<i>TOPO TA Cloning Kit</i>	INVITROGEN; Karlsruhe

2.1.4 Seren

Virus	Bezeichnung	Bemerkung
ASHV	3537	Serum aus experimentell akut infiziertem <i>Woodchuck</i>
	3P_1E5852	Serum aus chronisch infiziertem <i>Arctic Squirrel</i> , Wildfang
	3P_2D2521	Serum aus chronisch infiziertem <i>Arctic Squirrel</i> , Wildfang
	3P_123D4A	Serum aus chronisch infiziertem <i>Arctic Squirrel</i> , Wildfang
GSHV	3545	Serum aus experimentell, akut infiziertem <i>Woodchuck</i>
WHV	5389	Serum aus chronisch infiziertem <i>Woodchuck</i>
	98035	Serum aus chronisch infiziertem <i>Woodchuck</i>
	99252	Serum aus chronisch infiziertem <i>Woodchuck</i>
HBV	K301	Genotyp A, Serum aus Konsiliarlabor
	K444	Genotyp D, Serum aus Konsiliarlabor
	K443	Genotyp D, Serum aus Konsiliarlabor
	K442	Genotyp D, Serum aus Konsiliarlabor
	ID384	Genotyp A, Serum aus Konsiliarlabor
	ID398	Genotyp A, Serum aus Konsiliarlabor
	ID385	Genotyp A, Serum aus Konsiliarlabor
	ID386	Genotyp A, Serum aus Konsiliarlabor
	ID387	Genotyp A, Serum aus Konsiliarlabor
	K724	Genotyp D, Serum aus Konsiliarlabor
	K578	Genotyp D, Serum aus Konsiliarlabor
	K438	Genotyp A, Serum aus Konsiliarlabor
ID326	Genotyp D, Serum aus Konsiliarlabor	
K979	Genotyp G, Serum aus Konsiliarlabor	

2.1.5 Plasmide

Plasmide	Herkunft
pmax (GFP)	kodiert für das Grün Fluoreszierende Protein (GFP) (Amaya, LONZA, Köln)
pRVHBV1.5	enthält ein Überlängen-Genom (1,5mer) von HBV, Subtyp adw, im pBlueScript KS ⁺ Vektor [Bruss und Ganem, 1991]
pSVR45H	enthält das komplette LHBs Gen (präS1/präS2/S), Subtyp adw, unter der SV40 Promotor Kontrolle [Persing <i>et al.</i> , 1986]
pCX	kodiert für das HBV X-Protein [Schuster <i>et al.</i> , 2000]

2.1.6 Synthetisierte Oligonukleotide

Alle neu synthetisierten *primer* und *Standardprimer* wurden von Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) bezogen.

Bezeichnung	Art	Länge (bp)	Sequenz (5' → 3')
Standardprimer			
M13uni (-21)	s	18	TGT AAA ACG ACG GCC AGT
M13rev (-29)	as	18	CAG GAA ACA GCT ATG ACC
HBV primer			
HBV S6s	s	16	TGG ATG TGT CTG CGG C
HBV S6as	as	25	CKT TGA CAD ACT TTC CAA TCA ATAG (K:G/T) (D:A/G/T)
HBV preS1s	s	20	GTC ACC ATA TTC TTG GGA AC
HBV M1s	s	15	AGG CMA TGC AGT GGA (M:A/C)
HBV P1 [Günther <i>et al.</i> , 1995]	s	41	CCG GAA AGC TTG AGC TCT TCT TTT TCA CCT CTG CCT AAT CA
HBV P2 Günther, 1995 #265}	as	41	CCG GAA AGC TTG AGC TCT TCA AAA AGT TGC ATG GTG CTG G
HBV P1 (Genotyp G)	s	37	CGG GGT ACC GAG CTC TTC TTT TTC ACC TCT GCC TAA TCA
HBV P2 (Genotyp G)	as	35	CGG GGT ACC GAG CTC TTC AAA AAG TTG CAT GGT GCT GG
HBV Ds	s	25	TGT TCA TGT CCY ACT GTT CAA GCCT (Y:C/T)
HBV Das	as	22	CCC GAG ATT GAG ATC TTC TGC G
HBV X2s	s	24	GAC GTC CTT TGT YTA CGT CCC GTC (Y:C/T)
HBV X2as	as	24	TGC AGA GGT GAA GCG AAG TGC ACA

Bezeichnung	Art	Länge (bp)	Sequenz (5' → 3')
ASHV primer			
ASHV P1s	s	32	CCG GAG CTC TTC TTT TTC ACC TGT GCC TTG TT
ASHV P2as	as	33	CCG GAG CTC TTC AAA AAG ATA CAT GAT TGC GGC
preC18-37s	s	21	TGT GCC TTG TTT TTG CCT GTG
preS1_3-24as	as	22	GGT GAC TTT TAT GTT GTT GCC C
preS573-97s	s	25	TGT CTC CAC CAT ATT GTC TCC TCCC
X11-31as	as	22	GAA TCC AGT TGG CAA CAC AGG C
ASHV861s	s	22	CCT AAG GCT ACT AAA TAT TTT C
ASHV1382as	as	21	TGG GTT TGA TTT CGA AAG TTT
ASHV/GSHVpreS1s	s	21	CTT GGG RAC ACA GAC AGC TAG (R: G/A)
ASHV/GSHVpreS1as	as	21	GAG ACC TGA TGG TGA CAT CTC
All-Ortho primer			
S3as	as	24	CCC CAA WAC CAV ATC ATC CAT ATA (W:A/T; V:A/G/C)

2.1.7 Referenzgenome

Spezies	NCBI-Nummer	Referenz
ASHV	AGU29144	[Testut et al., 1996]
	NC001719	[Testut et al., 1996], entfernt aus NCBI
GSHV	NC001484	[Seeger et al., 1984]
	K02715	[Seeger et al., 1984]
WHV	AY628095	[Coffin et al., 2004]
	AY628096	[Coffin et al., 2004]
	AY334075	[Coffin et al., 2004]
	J02442	[Galibert et al., 1982]
	M90520	[Kew et al., 1993]
	J04514	[Girones et al., 1989]
	M11082	[Kodama et al., 1985]
	M19183	[Cohen et al., 1988]
	M18752	[Cohen et al., 1988]
NC004107	[Cohen et al., 1988]	
HBV (Genotyp D)	Y07587	[Stoll-Becker et al., 1997]
	J02203	[Borisova et al., 1984], neuer Name: V01460
	M32138	[Tong et al., 1990]
	U95551	(Rao, 1997)
	X97848	[Alexopoulou et al., 1996]

Spezies	NCBI-Nummer	Referenz
HBV (Genotyp D)	X65259	[Lai, 1992]
	X72702	[Preisler-Adams, 1993]
	X80924	[Karayiannis et al., 1995]
	X02496	[Bichko et al., 1985]
HBV (Genotyp A)	AJ012207	[Schaefer, 1998]
	X51970	[Koechel, 1990]
	AY738141	[Hass, 2004]
	AB116081	[Sugauchi et al., 2004]
	AY344098	[Araujo et al., 2004]
	AY344103	[Araujo et al., 2004]
	AY576426	[Kew, 2004]

2.1.8 Antikörper

Bezeichnung	Funktion/Herkunft
anti-HBs C20/02 (<i>monoklonal</i>)	monoklonaler Antikörper aus Maus-Hybridomaüberstand; erkennt konformationsabhängig die α -Determinante der S-Domäne von HBV
anti-HBs/Biotin Konjugat I (<i>monoklonal</i>)	monoklonaler anti-HBs-Biotin konjugierter Antikörper Enzygnost-HBsAg 5.0, DADE BEHRING, Marburg
Streptavidin-POD Konjugat II	Peroxidase-konjugiertes Streptavidin DIANOVA, Hamburg

2.1.9 DNA- und Protein-Längenstandards

Marker	Firma
DNA 1kb Leiter	INVITROGEN; Karlsruhe
pUC Mix 8 DNA Marker	MBI FERMENTAS, St. Leon-Rot
Mark12 Protein Marker	INVITROGEN; Karlsruhe

2.1.10 Puffer und Lösungen

DNA-Probenpuffer (6 X)	60 ml	Glycerin
	0,1 g	Bromphenolblau
	ad 100 ml	TAE
ELISA-Beschichtungspuffer (0,1M NaPP, pH 7.4)	77,4 ml	Na ₂ HPO ₄ (1M)
	22,6 ml	NaH ₂ PO ₄ (1M)
	ad 1000 ml	dH ₂ O
Fixierer (Silberfärbung)	120 ml	Fotofixierer
	ad 500 ml	dH ₂ O
MOPS/SDS-Puffer	1 M	Tris
	1 M	MOPS
	20,5 mM	EDTA
	69,3 mM	SDS
PBS (1 X)	137 mM	NaCl, pH 7,4
	2,7 mM	KCl
	8 mM	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O
	1,8 mM	KH ₂ PO ₄
	pH 7,4 einstellen	HCl
PBS ⁺⁺	5 ml	CaMg (100 X) (1,32 g CaCl ₂ + 2,133 g MgCl ₂ gelöst in 100 ml dH ₂ O)
	495 ml	PBS (1 X)
PBS/Tween20		PBS (1 X)
	0,01 %	Tween20 (v/v)

P1	50 mM	Tris-Cl, pH 8,0
	10 mM	EDTA
	100 µg/ml	RNase A
P2	200 mM	NaOH
	1 %	SDS (w/v)
P3	3 M	Kaliumacetat, pH 5,5
<i>Reducer</i> (Silberfärbung)	50 mg	Zitronensäure
	0,7 ml	Formalin 37%
	ad 1000 ml	dH ₂ O
Silbernitratlösung		
▪ Lösung A)	1,55 g	AgNO ₃
	8 ml	dH ₂ O
▪ Lösung B)	3,8 ml	NaOH (1 M)
	2,8 ml	Ammoniak (25 %)
	38,2 ml	dH ₂ O
Lsg. A) in Lsg. B) tropfen, ad	200 ml	dH ₂ O
TE (1 X)	50 mM	Tris-Cl, pH 8,0
	1 mM	EDTA
TAE (50 X)	242 g	Tris
	57,1 ml	Eisessig
	100 ml	EDTA (0,5 M)
	pH 8,0 einstellen	Essigsäure
TNE (1 X)	20 mM	Tris-HCl, pH 7,4
	140 mM	NaCl
	1 mM	EDTA

2.1.11 Viren

Die Infektionsversuche wurden mit gereinigten Hepatitis B Viren durchgeführt, die aus dem Serum eines chronisch HBV-infizierten Patienten mittels Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation isoliert wurden (ID 323, Fraktion 4; HBV gt D).

2.1.12 Bakterien

Mach1™ T1 *Phage-Resistant* (T1^R) chemisch kompetente *E. coli* (INVITROGEN)

Genotyp: F⁻ Φ80(*lacZ*)ΔM15 Δ*lacX74* *hsdR*(r_K⁻mK⁺) Δ*recA*1398 *endA1 tonA*

Die Vermehrung der chemisch kompetenten Bakterien erfolgte in eigener Herstellung. Die Puffer dafür wurden nach dem Ansetzen sterilfiltriert.

TFB 1 (*Transformation Buffer 1*)

10 mM MES (pH 6,2)	ROTH, Karlsruhe
100 mM RbCl	SIGMA, Taufkirchen
10 mM CaCl ₂ x 2 H ₂ O	SIGMA, Taufkirchen
50 mM MnCl ₂ x 4 H ₂ O	SIGMA, Taufkirchen
ad 500 ml dH ₂ O	
pH 5,8	mit Essigsäure einstellen

TFB 2 (*Transformation Buffer 2*)

10 mM MOPS	ROTH, Karlsruhe
10 mM RbCl	SIGMA, Taufkirchen
75 mM CaCl ₂ x 2 H ₂ O	SIGMA, Taufkirchen
15 % Glycerol (v/v)	MERCK, Darmstadt
ad 100 ml dH ₂ O	
pH 6,5	mit KOH einstellen

2.1.13 Zellkulturen

2.1.13.1 Etablierte Zelllinien

2.1.13.1.1 HepG2 [Aden und Fogel, 1979]

Diese Zelllinie ist 1975 aus dem Biopsiematerial eines Hepatoblastoms hervorgegangen und verfügt über zahlreiche differenzierte Leberzellfunktionen.

2.1.13.1.2 HepG2.2.15 [Sells et al., 1987]

Diese Zellen leiten sich von HepG2-Zellen ab. Sie haben in ihrem Genom durch stabile Transfektion zwei Tetramere des HBV Genoms integriert. Daher produzieren und sezernieren sie sowohl subvirale Partikel (HBsAg), sowie infektiöse Hepatitis B Viren.

2.1.13.1.3 Huh7 [Nakabayashi et al., 1982]

Diese Zellen wurden Anfang der 80er Jahre aus einem differenzierten hepatozellulären Karzinoms eines Japaners isoliert.

2.1.13.2 Primärzellen

2.1.13.2.1 Primäre Tupaia Hepatozyten (PTHs)

Für Infektionsversuche wurden frisch isolierte und dann für drei Tage kultivierte primäre Hepatozyten des ostasiatischen Spitzhörnchens *Tupaia belangeri* verwendet. Diese sind ebenso wie primäre humane Hepatozyten (PHH) für HBV suszeptibel [Glebe et al., 2003], [Köck et al., 2001]. Die Tiere stammen aus der Zucht, die am Institut für Anatomie und Zellbiologie, Justus-Liebig-Universität, Gießen unterhalten wird.

2.1.14 Häufig verwendete Medien und Lösungen für Zellen

2.1.14.1 Prokaryotische Zellen

LB-Medium	10 g	Bacto-Trypton
	5 g	Hefeextrakt
	10 g	NaCl
	ad 1000 ml	dH ₂ O

Vor Gebrauch wurde das Medium autoklaviert. Zur Herstellung von Agarplatten wurde dem Medium 2 % Agar zugefügt und in der Mikrowelle aufgekocht. Zur Herstellung von Selektionsmedium bzw. -platten wurde nach Abkühlen des Mediums 100 µg/ml Ampicilin oder 50 µg/ml Kanamycin hinzugefügt. Für die Blau-Weiß-Selektion wurden jeweils 40 µl X-Gal Lösung pro Schale ausplattiert.

X-Gal-Lösung (40 mg/ml)	40 mg	5-Brom-4-chlorindol-3-yl-β-D-galactopyranosid
	1 ml	N, N-Dimethylformamid

2.1.14.2 Eukaryotische Zellen

2.1.14.2.1 Medien für Zelllinien

Zur Kultivierung der Zellen wurde dem DMEM zwischen 1 % und 10 % Fötale Kälberserum (FKS) zugefügt. Nach Transfektion wurden die Zellen auf DMEM "Spezialmedium" gehalten, um ein zu schnelles Wachstum zu verhindern.

DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*)

		DMEM (Pulvermedium)
ad	10 l	dH ₂ O
	100 ml	Penicillin/Streptomycin- Lsg.(100 X)
	37 g	Bicarbonat
	100 ml	Pyruvat (100 mM)

DMEM “Spezialmedium“ zur Kultivierung nach Transfektion

		DMEM (Pulvermedium)
ad	10 l	dH ₂ O
	100 ml	Penicillin/Streptomycin- Lsg.(100 X)
	37 g	Bicarbonat
	100 ml	Pyruvat (100 mM)
	1 %	Fötale Kälberserum (FKS) (v/v)
	1 %	Dimethylsulfoxid (DMSO) (v/v)
	0,01 µM	Dexamethason

Gefriermedium (2 X)

6 ml	DMEM
2 ml	FKS
2 ml	DMSO

2.1.14.2.2 Medien für primäre *Tupaia* Hepatozyten

HBSS (ohne MgCl ₂ und CaCl ₂)	INVITROGEN, Karlsruhe
EGTA	SIGMA, Taufkirchen
DMEM	INVITROGEN, Karlsruhe
Kollagenase Typ IV	SIGMA, Taufkirchen
0,4% Trypanblau	SIGMA, Taufkirchen
Matrigel™ <i>Basement Membrane Matrix</i>	BD Biosciences, Heidelberg
Kollagen IV	BD Biosciences, Heidelberg

Waschmedium

	DMEM
20 mM	Hepes
0,2 %	BSA (v/v)

HGM (Hepatocyte Growth Medium)(nach [Block *et al.*, 1996] modifiziert)

1 l	DMEM	
10 ml	ITS-Mix	INVITROGEN, Karlsruhe
	0,5 mg/ml Insulin	
	0,5 mg/ml Transferrin	
	0,5 µg/ml Natriumselenit	
2 g	BSA	SIGMA, Taufkirchen
2 g	Glukose	MERCK, Darmstadt
2 g	Galaktose	MERCK, Darmstadt
0,1 g	Ornithin	SIGMA, Taufkirchen
0,03 g	Prolin	SIGMA, Taufkirchen
0,61 g	Nikotinamid	SIGMA, Taufkirchen
0,544 g	ZnCl ₂	SIGMA, Taufkirchen
0,75 g	ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	SIGMA, Taufkirchen
0,2 g	CuSO ₄ x 5 H ₂ O	SIGMA, Taufkirchen
0,025 µg	MnSO ₄	SIGMA, Taufkirchen
50 µM	Glutamax I	INVITROGEN, Karlsruhe
0,01 µM	Dexamethason	INVITROGEN, Karlsruhe
100 mg	Gentamycin	INVITROGEN, Karlsruhe
250 µg	Amphotericin B	INVITROGEN, Karlsruhe

2.1.14.2.3 Transfektionsagenzien*FuGene* (für HepG2-Zellen)

ROCHE Diagnostics, Mannheim

GeneJuice (für Huh7-Zellen)

INVITROGEN; Karlsruhe

2.2 Methoden

2.2.1 Herstellung chemisch-kompetenter Bakterien

Von einer Übernachtskultur *E.coli* Mach1 wurden 2 ml Bakteriensuspension in 40 ml LB-Medium überführt und bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert bis eine OD₅₅₀ von ca. 0,45 erreicht war. Anschließend wurde die Bakterienkultur in 50 ml Plastikröhrchen überführt und für 15 min auf Eis inkubiert. Bei allen folgenden Schritten wurde darauf geachtet, dass die Bakterien stets bei 4°C gehalten wurden. Nach Zentrifugation der Bakterien bei 2500 rpm für 15 min wurde das Zellpellet in 2 ml kaltem TFB1 aufgenommen und vorsichtig gelöst. Anschließend wurde das Volumen auf 16 ml mit TFB1 aufgefüllt und die Bakterien für weitere 15 min auf Eis inkubiert. Es wurde wiederum für 15 min bei 2500 rpm zentrifugiert und dann die Zellpellets in 1,6 ml kaltem TFB2 resuspendiert. Nach einer 15-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Bakterien aliquotiert und bei -70°C eingefroren. Die Kompetenz der Bakterien wurde mit einer Kontroll-Transformation getestet (2.2.2). Als DNA-*template* wurde das Plasmid pCX verwendet.

2.2.2 Transformation von Bakterien

Für sämtliche Transformationen wurden chemisch-kompetente *E.coli* Mach1 Bakterien verwendet, die max. 5-10 min vorher auf Eis angetaut wurden. Zu 50 µl Bakteriensuspension wurden dann von der zu transformierenden DNA (Plasmid oder Ligationsansatz) je nach Konzentration einige µl (zwischen 1-100 ng DNA) pipettiert und für 20-30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock im Wasserbad oder Heizblock bei 42°C für 30-45 sec, gefolgt von einer 2-minütigen Inkubationspause auf Eis. Dann wurden 250 µl bis 950 µl LB-Medium zu den Ansätzen gegeben und diese auf dem Schüttler bei 37°C für eine bis anderthalb Stunden inkubiert. Anschließend wurde von den Transformationsansätzen zwischen 50-200 µl auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Selektions-Antibiotikum und ggf. X-Gal ausplattiert. Die Bakterienkulturen wurden über Nacht bei 37°C invers (auf dem Kopf stehend) inkubiert. Das X-Gal wird als Substrat bei der Blau-Weiß-Selektion von Bakterien eingesetzt. Es kann durch das Enzym β-Galaktosidase gespalten werden, was zu einer Blaufärbung der Kolonie

führt. Wurde die gewünschte DNA ins Bakteriengenom integriert, so kann das Gen für die β -Galaktosidase nicht mehr abgelesen werden, und das X-Gal wird nicht gespalten (Weißfärbung der Kolonie).

2.2.3 Ultrazentrifugation von Serum durch ein Saccharosekissen

In die Zentrifugenröhrchen wurde ein diskontinuierliches Saccharosekissen aus 2 ml 20 % Sucrose/PBS [w/w] und 2 ml 10 % Sucrose/PBS [w/w] geschichtet. Anschließend wurden von dem gewünschten Serum ca. 8 ml aufgetragen und für 16 h bei 10°C und 26.000 rpm zentrifugiert (BECKMAN Coulter; Rotor SW 41L). Der Überstand wurde vorsichtig abgezogen und das Pellet in 50 μ l PBS resuspendiert. Anschließend wurde die virale HBV-DNA wie unter 2.2.4 isoliert.

2.2.4 Aufreinigung von DNA aus Serumproben

Die HBV-DNA aus der ultrazentrifugierten Serumprobe wurde mit dem *“High Pure Viral Nucleic Acid Kit“* von ROCHE laut Herstellerangaben aufgereinigt. Das gereinigte DNA-Pellet wurde in 50 μ l Reinstwasser eluiert. Anschließend konnte die vorliegende DNA mittels PCR spezifisch amplifiziert werden (2.2.6).

2.2.5 Aufreinigung von PCR-Proben zur Reamplifikation

Bei geringen DNA-Mengen in der Probe musste das Amplifikat reamplifiziert werden. Damit das möglich war, musste ein Aufreinigungsschritt durchgeführt werden um störende Salze etc. abzutrennen. Dafür wurden die Amplifikate mit dem *„QIAquick PCR Purification Kit“* von QIAGEN laut Herstellerangaben aufgereinigt und danach erneut in die PCR eingesetzt.

2.2.6 Amplifikation von DNA mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde je nach Fragestellung entweder der *LightCycler*[®] oder der *Mastercycler*[®] für die PCR verwendet. Bei sehr geringen DNA-Mengen im Serum und kleinen zu amplifizierenden Fragmenten wurde zunächst eine PCR im *LightCycler*[®] angesetzt, das Amplifikat anschließend mit

dem „QIAquick PCR Purification Kit“ aufgereinigt und die DNA dann im *Mastercycler*[®] reamplifiziert.

2.2.6.1 Real Time-PCR im LightCycler[®]

Der *LightCycler*[®] eignet sich eigentlich nur für die Amplifikation kurzer DNA Stücke von bis zu 800 bp, dennoch konnte das LHBs mit einer Größe von 1,4 kb erfolgreich amplifiziert werden. Das Ansetzen des *Master-Mixes* erfolgte nach dem folgendem Pipettierschema. In die PCR wurden jeweils 10 µl Probe plus 10 µl *Master-Mix* eingesetzt.

Tabelle 2-1 Pipettierplan für Fast Start Taq SybrGreen (ROCHE)

Komponente	Volumen
dH ₂ O	4 µl
10 pmol/µl <i>sense primer</i>	1 µl
10 pmol/µl <i>antisense primer</i>	1 µl
Fast Start Taq SybrGreen	4 µl
Gesamtvolumen	10 µl

Je nach Versuchsansatz wurden zwei unterschiedliche Programme verwendet. Die beiden Temperaturprofile für die PräS1-S6 PCR (amplifiziert das LHBs) und die S6-PCR (amplifiziert einen Teilbereich des SHBs) sind in Tabelle 2-2 und Tabelle 2-3 dargestellt.

2.2.6.2 Reaktionen im Mastercycler[®]

Im *Mastercycler* wurden unterschiedliche Polymerasen verwendet. Wenn die PCR besonders sensitiv sein sollte oder große DNA-Fragmente für die Klonierung der ASHV/HBV-Gesamtgenome amplifiziert werden sollten, wurde mit der Platinum[®] Taq DNA-Polymerase *High Fidelity* gearbeitet. Dieser Polymerase-Mix ist eine Mischung aus Taq-Polymerase und einer *Pyrococcus*-Spezies und besitzt eine *proof-reading*-Aktivität.

Tabelle 2-2 Programm der PräS1-S6 PCR zur Amplifikation des LHBs von HBV

	AKTIVIERUNG	AMPLIFIKATION				SCHMELZKURVE			KÜHLEN
<i>Cycles</i>	1	50				1			1
<i>Type</i>	<i>Regular</i>	<i>Quantification</i>				<i>Melting Curve</i>			<i>Regular</i>
<i>Target Temp.</i>	95°C	95°C	65°C	72°C	84°C	95°C	65°C	95°C	40°C
<i>Incubation Time</i>	10 min.	10''	15''	45''	1''	10''	30''	0''	30''
<i>Temp. Transition Rate</i>	20°C	20°C	20°C	5°C	5°C	20°C	20°C	0,1°C	20°C
<i>Second Target Temp.</i>			60°C						
<i>Step Size</i>			1						
<i>Step Delay</i>			1						
<i>Acquisition Mode</i>	<i>none</i>	<i>none</i>	<i>none</i>	<i>none</i>	<i>single</i>	<i>none</i>	<i>none</i>	<i>cont</i>	

Tabelle 2-3 Programm der S6-PCR zur Amplifikation eines Teilbereichs des SHBs von HBV

	AKTIVIERUNG	AMPLIFIKATION				SCHMELZKURVE			KÜHLEN
<i>Cycles</i>	1	50				1			1
<i>Type</i>	<i>Regular</i>	<i>Quantification</i>				<i>Melting Curve</i>			<i>Regular</i>
<i>Target Temp.</i>	95°C	95°C	69°C	72°C	82°C	95°C	65°C	95°C	40°C
<i>Incubation Time</i>	10 min.	10''	20''	25''	1''	10''	15''	0''	30''
<i>Temp. Transition Rate</i>	20°C	20°C	20°C	5°C	20°C	20°C	20°C	0,1°C	20°C
<i>Second Target Temp.</i>			60°C						
<i>Step Size</i>			1						
<i>Step Delay</i>			1						
<i>Acquisition Mode</i>	<i>none</i>	<i>none</i>	<i>none</i>	<i>none</i>	<i>single</i>	<i>none</i>	<i>none</i>	<i>cont</i>	

Für PCRs in denen kleinere Fragmente wie das Oberflächenprotein LHBs (1,4 kb) amplifiziert werden sollten, wurde die normale native *Taq* DNA-Polymerase von Invitrogen verwendet. Diese wurde auch eingesetzt, wenn nach der Gesamtgenom-Klonierung die positiven Klone darauf getestet wurden, ob auch wirklich das komplette Genom von 3,2 kb inseriert wurde. Für das generelle

Screening auf positive Klone wurde die *GoTag* von PROMEGA verwendet. Diese wird mit einem vorgefärbten Puffersystem geliefert, sodass nach der Amplifikation die Proben direkt auf das Gel aufgeladen werden können ohne erneut *Loading Buffer* dazugeben zu müssen, was eine enorme Zeitersparnis bedeutet. Im folgenden wird das Pipettierschema der jeweiligen Polymerase sowie die unterschiedlichen Temperaturprofile dargestellt.

2.2.6.2.1 *Platinum[®] Taq DNA-Polymerase High Fidelity*

Tabelle 2-4 Pipettierplan mit High Fidelity Taq Polymerase (INVITROGEN)

Komponente	Volumen
10 X Puffer (ohne Magnesium)	5 µl
50 mM MgSO ₄	2 µl
10mM dNTPs	1 µl
10 pmol/µl <i>sense primer</i>	1 µl
10 pmol/µl <i>antisense primer</i>	1 µl
DNA <i>template</i>	2 µl
Platinum [®] Taq DNA Polymerase High Fidelity (5 U/µl)	0,25 µl
dH ₂ O	37,75 µl
Gesamtvolumen	50 µl

Tabelle 2-5 Temperaturprofil der preS1-S6 PCR zur Amplifikation des LHBs mit High Fidelity Taq (INVITROGEN)

SCHRITT	TEMPERATUR	ZEIT	ZYKLEN
<i>Initial Denaturation</i>	94°C	2 min	1
<i>Denaturation</i>	94°C	45 sec	30
<i>Annealing</i>	55°C	30 sec	
<i>Extension</i>	68°C	1 min 40 sec	
<i>Final Extension</i>	68°C	10 min	1
<i>Hold</i>	4°C	unendlich	

Tabelle 2-6 Temperaturprofil der P1P2-PCR zur Amplifikation des HBV-Gesamtgenoms mit High Fidelity *Taq* (INVITROGEN)

SCHRITT	TEMPERATUR	ZEIT	ZYKLEN
<i>Initial Denaturation</i>	94°C	2 min	1
<i>Denaturation</i>	94°C	40 sec	35
<i>Annealing</i>	55°C	1 min 30 sec	
<i>Extension</i>	68°C	3 min 30 sec	
<i>Final Extension</i>	68°C	15 min	1
<i>Hold</i>	4°C	unendlich	

2.2.6.2.2 *Taq* DNA-Polymerase, *nativ*

Der folgende Pipettierplan bezieht sich auf die preS1-S6-PCR. Für die Gesamtgenom-PCR (P1P2-PCR) wurden pro Ansatz 2 µl MgSO₄, jeweils 5 µl *primer* und entsprechend weniger dH₂O eingesetzt.

Tabelle 2-7 Pipettierplan für *Taq* Polymerase (INVITROGEN)

Komponente	Volumen
10 X Puffer (ohne Magnesium)	5 µl
50 mM MgSO ₄	1,5 µl
10mM dNTPs	1 µl
10 pmol/µl <i>sense primer</i>	2,5 µl
10 pmol/µl <i>antisense primer</i>	2,5 µl
<i>template</i> DNA	2-5 µl
<i>Taq</i> Polymerase, <i>nativ</i> (5 U/µl)	0,25 µl
dH ₂ O	32,25 µl-35,25 µl
Gesamtvolumen	50 µl

Tabelle 2-9 Temperaturprofil der preS1-S6 PCR zur Amplifikation des LHBs mit Taq Polymerase (INVITROGEN)

SCHRITT	TEMPERATUR	ZEIT	ZYKLEN
<i>Initial Denaturation</i>	94°C	2 min	1
<i>Denaturation</i>	94°C	45 sec	30
<i>Annealing</i>	60°C	30 sec	
<i>Extension</i>	72°C	1 min 40 sec	
<i>Final Extension</i>	72°C	10 min	1
<i>Hold</i>	4°C	unendlich	

Tabelle 2-8 Temperaturprofil der P1P2-PCR zur Amplifikation des HBV-Gesamtgenoms mit Taq Polymerase (INVITROGEN)

SCHRITT	TEMPERATUR	ZEIT	ZYKLEN
<i>Initial Denaturation</i>	94°C	2 min	1
<i>Denaturation</i>	94°C	40 sec	35
<i>Annealing</i>	60°C	1 min 30 sec	
<i>Extension</i>	68°C	3 min 30 sec	
<i>Final Extension</i>	68°C	15 min	1
<i>Hold</i>	4°C	unendlich	

2.2.6.2.3 GoTaq® Flexi DNA Polymerase

Zum *Screening* der Klone wurde die *GoTaq® Flexi* DNA-Polymerase verwendet. Dabei wurden entweder die Kolonien der evt. positiven Klone direkt in die PCR eingesetzt oder zuvor eine Starterkultur angeimpft, von der dann einige µl in die PCR eingesetzt wurden .

Tabelle 2-10 Temperaturprofil der preS1-S6 PCR zur Amplifikation des LHBs mit GoTaq Flexi DNA-Polymerase (INVITROGEN)

SCHRITT	TEMPERATUR	ZEIT	ZYKLEN
<i>Initial Denaturation</i>	94°C	2 min	1
<i>Denaturation</i>	94°C	45 sec	20
<i>Annealing</i>	60°C	30 sec	
<i>Extension</i>	72°C	1 min 40 sec	
<i>Final Extension</i>	72°C	10 min	1
<i>Hold</i>	4°C	unendlich	

Tabelle 2-11 Pipettierplan für die *GoTaq* DNA-Polymerase (PROMEGA)

Komponente	Volumen
5 X <i>Green GoTaq Flexi Buffer</i>	10 µl
25 mM MgCl ₂	4 µl
10mM dNTPs	1 µl
10 pmol/µl <i>sense primer</i>	2,5 µl
10 pmol/µl <i>antisense primer</i>	2,5 µl
<i>template</i> DNA	2 µl oder Kolonie
<i>GoTaq</i> DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,25 µl
dH ₂ O	27,75 µl
Gesamtvolumen	50 µl

2.2.7 Gelelektrophorese von DNA-Proben

Die DNA-Fragmente wurden je nach Größe mittels Gelelektrophorese unter Verwendung von 0,8 % bis 2 % Agarosegelen aufgetrennt. Dazu wurde die entsprechende Menge Agarose abgewogen, in 1 X TAE Puffer gegeben und in der Mikrowelle aufgekocht. Nach Lösen der Agarose wurde Ethidiumbromid (0,1 µg/ml) hinzugegeben und das Gel in die vorbereiteten Gelkammer gegossen. Nach Auspolymerisation der Agarose wurde das Gel mit 1 X TAE überschichtet, die aufzutrennenden Proben mit DNA-Probenpuffer versetzt und in die Taschen des Gels geladen. Als Größenstandard wurden 5 µg der 1 kb DNA-Leiter oder des pUC-Mix Markers auf das Gel aufgetragen. Sollten die DNA-Fragmente nach Auftrennung wieder aus dem Gel extrahiert werden, wurde als Puffersystem das „modifizierte TAE“ aus dem „*Montage Gel Extraction Kit*“ verwendet und maximal 1,25 % Gele gegossen.

2.2.8 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Für die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde zu Beginn der Doktorarbeit das „*QIAquick Gel Extraction Kit*“ verwendet. Dann wurde aufgrund der schlechten Extraktionseffizienz das System gewechselt und mit dem „*Montage Gel Extraction Kit*“ gearbeitet. Die Extraktion erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

2.2.9 Klonierung mit verschiedenen Vektorsystemen

Je nach Größe des zu klonierenden Fragments wurden unterschiedliche Vektorsysteme verwendet. Für das LHBs (1,4 kb) wurde zunächst das *pCR*[®]2.1-*TOPO*-System verwendet aber aufgrund der schlechten Effizienz zum *pGEM*[®]-*T Vector*-System gewechselt. Zur Klonierung des HBV-Gesamtgenoms (ca. 3,2 kb) wurde das *pCR*[®]-*XL-TOPO*-System verwendet. Alle drei Systeme basieren auf dem Prinzip, dass das PCR-Produkt über TA-Überhänge in den Vektor ligiert wird.

2.2.9.1 pCR[®]2.1-TOPO

Für die Klonierung mittels pCR[®]2.1-TOPO wurde die Ligation nach dem folgenden Pipettierschema angesetzt.

Tabelle 2-12 Pipettierplan für pCR[®]2.1-TOPO (INVITROGEN)

Komponente	Volumen
PCR Produkt	1-3 µl
10X Ligationspuffer	1 µl
pCR [®] 2.1-TOPO Vektor (25ng/µl)	2 µl
dH ₂ O	3-5 µl
T4 DNA Ligase	1 µl
Gesamtvolumen	10 µl

Anschließend wurde der Ligationsansatz über Nacht bei 4°C inkubiert und dann in *E.coli* Mach1 transformiert (2.2.2). Das Ausplattieren erfolgte auf *amp*-Platten mit 40 µl X-Gal (40 µg/ml) für die Blau-Weiß-Selektion. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C invers inkubiert.

2.2.9.2 pGEM[®]-T Vector System

Für die Klonierung mittels pGEM[®]-T wurde die Ligation nach dem folgenden Pipettierschema angesetzt.

Tabelle 2-13 Pipettierplan für pGEM-T (PROMEGA)

Komponente	Volumen
PCR Produkt	1-3 µl
2X <i>Rapid ligation</i> Puffer	5 µl
pGEM-T Vektor (50ng/µl)	1 µl
dH ₂ O	0-2 µl
T4 DNA-Ligase	1 µl
Gesamtvolumen	10 µl

Anschließend wurde der Ligationsansatz über Nacht bei 4°C inkubiert und dann in *E.coli* Mach1 transformiert (2.2.2). Das Ausplattieren erfolgte auf *amp*-Platten mit 40 µl X-Gal (40 µg/ml) für die Blau-Weiß-Selektion. Die Platten wurden invers über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.9.3 pCR[®]-XL-TOPO

Für die Klonierung großer Fragmente bis zu 15 kb ist das pCR[®]-XL-TOPO Vektor geeignet. Dieser System wurde auch für die Klonierung des HBV-Gesamtgenoms verwendet. Dazu mussten die Amplifikate zunächst über ein Kristallviolett-Gel aufgereinigt werden und anschließend die DNA wieder aus dem Gel extrahiert werden. Danach erfolgte die Ligation in den Vektor und die Transformation.

2.2.9.3.1 *Aufreinigung der Amplifikate im Kristallviolett-Gel*

Nach der PCR wurden die Amplifikate zunächst über ein 0,8 % Kristallviolett-Gel aufgereinigt. Dazu wurden 80 µl Amplifikat mit 16 µl *Crystal Violet Loading Buffer* versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Anschließend wurde das Gel bei 80 V für ca. 15-20 min gefahren, die gewünschte Bande ausgeschnitten und gewogen.

2.2.9.3.2 *Aufreinigung über die S.N.A.P-Säule*

Zum ausgeschnittenen Gelstück wurde das 2,5-fache Volumen (0,1g Gel entsprechen 100 µl) Natriumjodid-Lösung (6,6 M) gegeben, gevortext und dann bei 42°C bis 50°C inkubiert bis die Agarose komplett geschmolzen war. Anschließend wurde das 1,5-fache Volumen Bindepuffer hinzu gegeben, gemischt und auf die S.N.A.P-Säule gegeben. Dann wurde bei 2900 g für 30 sec zentrifugiert und der Durchfluss wiederum auf die Säule gegeben. Dieser Schritt wurde noch zweimal wiederholt, dann wurde der Durchfluss verworfen. Auf die Säule wurden 400 µl *Final Wash Buffer* gegeben und erneut zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde wiederholt und erneut bei 10.000 g für 30 sec zentrifugiert. Die Elution der DNA erfolgte mit 40 µl TE-Puffer. Anschließend wurde auf einem 1 % Agarosegel das Vorhandensein der DNA kontrolliert.

2.2.9.3.3 *Ansetzen der Ligation*

Für die Klonierung mittels pCR[®]-XL-TOPO wurde die Ligation nach dem folgenden Pipettierschema angesetzt.

Tabelle 2-14 Pipettierplan für pCR[®]-XL-TOPO (INVITROGEN)

Komponente	Volumen
S.N.A.P.-gereinigtes PCR Produkt	4 µl
pCR [®] -XL-TOPO Vektor (10ng/µl)	1 µl
Gesamtvolumen	5 µl

Anschließend wurde der Ligationsansatz für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann die Reaktion mit 1 µl STOP-Lösung gestoppt. Dann erfolgte die Transformation in *E.coli* Mach1 Bakterien (2.2.2) und das Ausplattieren auf *Kana*-Platten. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C invers inkubiert.

Die Klone wurden mittels PCR (2.2.6.2.3) getestet. Von den positiven Klonen wurde dann eine Minipräparation gemacht und die isolierte Plasmid-DNA zum Sequenzieren (Eurofins MWG Operon, Ebersberg) geschickt.

2.2.10 Isolation von Plasmid-DNA mittels alkalischer Lyse

2.2.10.1 Mini- und Maxipräparation

Die Minipräparationen wurden mit dem *QIAprep Spin Miniprep Kit* von QIAGEN durchgeführt. Die Vorgehensweise entsprach der Bedienungsanleitung des Herstellers. Die Resuspension des Pellets erfolgte nicht in TE-Puffer sondern in DECP-Wasser, da dadurch eindeutigere Sequenzierergebnisse erreicht wurden. Für die Maxipräparation wurde das *GenElute HP Plasmid Maxiprep Kit* von SIGMA laut Herstellerangaben verwendet.

2.2.11 Sequenzanalyse der Klone

Die Minipräp-DNA wurde zum Sequenzieren verschickt (Eurofins MWG Operon, Ebersberg). Die erhaltenen DNA-Sequenzen der Klone wurden anschließend mit Hilfe des Programms DNASTAR Lasergene (GATC Biotech, Konstanz) ausgewertet. Dazu wurden die Sequenzen zunächst in *Seqman* geöffnet und dort auf ihre Richtigkeit geprüft. Anschließend wurden die Sequenzen in *MegAlign* geladen und mit der *ClustalV*-Methode [Higgins und Sharp, 1989] ein *Multiple Sequence Alignment (MSA)* erstellt, das die Basis für die Sequenzanalysen der klonierten Proben darstellte. Bei der *ClustalV*-Methode werden zunächst alle Sequenzen paarweise miteinander verglichen und die Distanz zweier Sequenzen berechnet. Die Distanz erlaubt eine Aussage über die durchschnittliche

Substitutionsrate und ist umso geringer, desto ähnlicher sich die beiden Sequenzen sind. Anschließend werden die Sequenzen anhand ihrer Ähnlichkeit in *Cluster* gruppiert. Das Programm errechnet nun, basierend auf der phylogenetischen Verwandtschaft, die Divergenzen von Sequenzpaaren. Für die Erstellung des phylogenetischen Stammbaums wurde der *bootstrap* Test mit der *UPGMA*-Methode (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean*) im Programm MEGA Version 4.0 [Tamura *et al.*, 2007] angewendet.

2.2.12 Zellkultur

Alle verwendeten Zelllinien und Primärzellen wurden auf Zellkulturschalen mit dem entsprechenden Medium im Brutschrank bei 37°C, 7% CO₂ und 96% Luftfeuchtigkeit kultiviert.

2.2.12.1 Auftauen von Zelllinien

Die Zellen wurden im Institut im Stickstofftank bei –158°C gelagert. Zum Auftauen wurde ein Röhrchen mit Zellen für ca. 1 min im 37°C warmen Wasserbad erwärmt. In der Zwischenzeit wurde in die Zellkulturschale 10 ml DMEM mit 10 % FKS vorgelegt. Die aufgetauten Zellen wurden nun vorsichtig auf die vorbereitete Schale getropft und diese kurz geschwenkt. Danach erfolgte eine Inkubation von 4 h im Brutschrank damit sich die Zellen anheften konnten. Anschließend wurde das Medium gewechselt und die Zellen weiter kultiviert.

2.2.12.2 Passage von Zelllinien

Im Abstand von zwei bis drei Tagen wurden die Zellen je nach weiterer Versuchsplanung passagiert. Dazu wurde das Medium abgesaugt, die Zellen anschließend kurz mit 1 X PBS gewaschen und dann abtrysiniert. Nach Resuspension in neuem Medium wurde ein Teil der Zellsuspension auf neue Kulturschalen mit Medium ausgesät.

2.2.12.3 Einfrieren von Zelllinien

Zum Einfrieren wurden die Zellen von der Kulturschale wie gewohnt abtrypsiniert und dann in DMEM (+ ggf. FKS) resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen bei 1500 rpm für 10 min abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Das Zellpellet wurde nun in Medium resuspendiert, wobei für die Zellzahl einer 10 cm Schale ca. 1 ml DMEM verwendet wurde. Dann wurden zu der Zellsuspension langsam 0,5 ml Gefriermedium (2 X) dazugetropft und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach vorsichtiger Zugabe von weiteren 0,5 ml Gefriermedium, wurden die 2 ml Gesamtvolumen auf zwei Cryo-Röhrchen verteilt und bei -70°C eingefroren. Am nächsten Tag erfolgte die Umlagerung der Röhrchen in den Stickstofftank (-158°C).

2.2.13 Transfektion von Zellen mit *GeneJuice* oder *FuGene*

Für die Transfektion der beiden Hepatom-Zelllinien wurden zwei unterschiedliche Transfektionsagenzien verwendet, um die DNA mittels Lipofektion in die Zelle zu schleusen. Für die Transfektion von Huh7-Zellen wurde mit *GeneJuice* (NOVAGEN) gearbeitet, für die Transfektion von HepG2-Zellen wurde *FuGene* (ROCHE) verwendet.

Beide Zelllinien wurden einen Tag vor der geplanten Transfektion auf 10 cm- oder 12 well- Zellkulturschalen ausgesät, so dass sie am nächsten Tag eine Konfluenz von 50-80 % aufwiesen. Die Transfektion von Huh7-Zellen erfolgte im Verhältnis 4:2 (μl Transfektionsagens zu μg eingesetzter DNA), die Transfektion von HepG2-Zellen erfolgte im Verhältnis 6:2. Die Durchführung entsprach den Herstellerangaben. Am nächsten Tag wurde der Transfektionsansatz von der Platte genommen und die Zellen mit PBS^{++} gewaschen. Die Huh7-Zellen wurden nun mit DMEM + 1 % FKS weiter kultiviert, die HepG2-Zellen wurden auf DMEM „Spezial“ (DMEM + 1 % FKS + 1 % DMSO + $0,01 \mu\text{M}$ Dexamethason) weiter gehalten. Zwei Tage nach dem Ansetzen konnte der Transfektionserfolg durch das Betrachten des exprimierten Grün Fluoreszierenden Protein (GFP) unter dem Mikroskop bestätigt werden. Alle zwei bis drei Tage wurde das Medium

abgenommen und eingefroren. Aus den Überständen wurde mittels ELISA das HBsAg bestimmt bzw. im AxSym (ABBOTT) das sekretierte HBeAg gemessen.

2.2.14 ELISA zum Nachweis des HBsAg

Für den Nachweis des HBsAg wurde zunächst eine 96 *well*-Platte mit je 100 µl des monoklonalen Antikörpers C20/02 bestückt. Der Antikörper wurde zuvor 1:1000 mit ELISA-Beschichtungspuffer verdünnt. Die beschichtete Platte wurde über Nacht bei 4°C aufbewahrt und am nächsten Tag zweimal mit PBS/0,1 % Tween20 und dann zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde geblockt indem je 200 µl 10 % FKS/TNE in jedes *well* gegeben wurde und die Platte für 2 h auf dem Schüttler bei 37°C inkubiert wurde. Danach folgte der schon beschriebene Waschschrift. Dann wurden der HBsAg-Standard und die Proben in 1 % Casein/PBS bis zur gewünschten Konzentration verdünnt und je 100 µl pro *well* auf die Platte aufgetragen. Die Inkubation der Proben erfolgte über Nacht bei 4°C. Am nächsten Tag wurde wiederum gewaschen und dann der erste Antikörper aufgetragen. Das anti-HBs-Biotin wurde dazu 1:40 in 0,1 % Casein/PBS verdünnt, dann wurden jeweils 100µl pro *well* aufgetragen und die Platte für 1 h bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Nach Waschen der Platte wurde der Zweitantikörper, das Streptavidin-POD in einer 1:500 Verdünnung, mit je 100µl pro *well* aufgetragen. Die Inkubationszeit betrug 30 min, dann erfolgte ein erneuter Waschschrift. Schließlich wurden je 100 µl des gebrauchsfertigen Substrats *TMB X-tra* in jedes *well* pipettiert und dann die Reaktion nach einigen Minuten mit 50 µl 1N Schwefelsäure abgestoppt. Die Messung der Extinktion erfolgte bei OD₄₅₀ mit der Referenzwellenlänge OD₆₂₀ im ELISA-Reader (LP 400, *Diagnostic Pasteur*).

2.2.15 Aufreinigung von Hepatitis B Viren aus dem Plasma chronisch-infizierter Patienten mittels Dichtegradientenzentrifugation

HBV kann mittels Ultrazentrifugation (BECKMAN Coulter; Rotor SW 28.38) durch einen diskontinuierlichen Saccharose-Gradienten von den subviralen Partikeln

abgetrennt werden. Für die Aufreinigung wurde das Plasma eines chronisch-infizierten Patienten (HBV Genotyp D) mit der ID-Nr. 323 verwendet. Das Serum wurde über Nacht im Kühlschrank aufgetaut und am nächsten Tag zur Abtrennung von ausgeflockten Serumbestandteilen kurz zentrifugiert. Dann wurde zunächst in silikonisierten Röhrchen ein diskontinuierliches Sucrosekissen erstellt aus 6 ml 15 % und 2 ml 10 % Saccharose/PBS [w/w]. Darauf wurden ca. 30 ml des aufzureinigenden Plasmas geschichtet, dann mit TNE austariert und anschließend für 18 h bei 25.000 rpm und 10°C ultrazentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 1 ml eiskaltem TNE resuspendiert. Nun wurde ein diskontinuierlicher Saccharose-Gradient geschichtet: 2 ml 60 %, 4 ml 45 %, 4 ml 35 %, 5 ml 25 %, 5 ml 15 % und 5 ml 5% Saccharose/PBS [w/w]. Auf diesen wurde das resuspendierte Pellet aufgetragen, wiederum mit TNE austariert und dann für 15 h bei 25.000 rpm und 10°C wiederum ultrazentrifugiert. Nach dem Lauf wurde der Gradient mit Hilfe einer Schlauchpumpe in 1 ml Fraktionen ausgetropft. Von den Fraktionen wurden Aliquots genommen um die Dichte der Saccharose im Refraktometer und den Proteingehalt im Photometer bei OD₂₈₀ zu bestimmen. Außerdem wurde von jeder Fraktion die Anzahl vorhandener Genomäquivalente mittels *real-time* PCR bestimmt.

2.2.16 Isolation von anti-HBs aus Serum mittels Protein L-Agarose

Für das Aufreinigen von Immunglobulinen aus Serum wurde das „*NAb Spin Kit 0.2ml for Antibody Purification*“ von PIERCE verwendet und jeweils 200 µl Serum der unterschiedlichen Proben aufgereinigt. Zunächst wurden die Protein L-Agarose-haltigen Säulchen equilibriert, indem 400 µl Bindepuffer auf die Matrix gegeben und dann bei 5.000 g für 1 min zentrifugiert wurde. Der Durchfluss wurde verworfen und der Equilibrierungsschritt wiederholt. Dann wurden 200 µl Serum auf die Säule gegeben, diese verschlossen und invers für 10 min inkubiert. Während dieser Zeit können alle Klassen von Immunglobulinen über den variablen Teil der leichten Kette an die Protein L-Agarose binden. Anschließend wurde die Säule wieder bei 5.000 g für 1 min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde aufgefangen, um ungebundene Proteinkomponenten analysieren zu können. Es

folgten drei Waschschriffe, in denen jeweils 400 µl Bindepuffer auf das Säulchen gegeben und anschließend zentrifugiert wurde. Dann wurden in die für den nächsten Schritt benötigten Auffanggefäße jeweils 40 µl Neutralisationspuffer vorgelegt. Es wurden 400 µl Elutionspuffer auf die Säule gegeben, vorsichtig gemixt und dann die Ig's durch Zentrifugation von der Agarose in das vorbereitete Auffanggefäß eluiert. Dieser Elutionsschritt wurde noch zweimal wiederholt, sodass am Ende drei Elutionsfraktionen zur Verfügung standen. Von jeder Fraktion wurde im Photometer bei OD₂₈₀ die Proteinkonzentration gemessen und anschließend ein SDS-Gel gefahren. Die Säulchen wurden gereinigt und konnten erneut verwendet werden. Die Reaktivität der aufgereinigten Immunglobuline (anti-HBs) wurde im AxSym (ABBOTT, Wiesbaden) gemessen.

2.2.17 Auftrennung gereinigter Immunglobuline mittels SDS-PAGE

Um die Proteine der Silberfärbung unterziehen zu können, wurden sie zunächst in der denaturierenden SDS-PAGE entsprechend ihres Molekulargewichts aufgetrennt [Laemmli *et al.*, 1970]. Dazu wurden die zu analysierenden Proteine mit DTT (Dithiothreitol) und SDS (Natriumdodecylsulfat) versetzt und für 10 min bei 72°C erhitzt. Durch die hohe Temperatur werden die Proteine vollkommen denaturiert, durch Zugabe des SDS nehmen sie eine negative Ladung an. Nach Zugabe von 4 X Probenpuffer wurden die Proben auf das SDS-Gel (INVITROGEN; NuPAGE 12 % Bis/Tris-Gel) aufgetragen. Die Proteine wanderten nun im elektrischen Feld entsprechend ihrer Ladung zur Anode. Als Puffersystem wurde 1 X MOPS-Puffer und zusätzlich 500 µl Antioxidans (INVITROGEN) in die Gelkammer gefüllt. Als Marker wurde der Proteinmarker Mark12 (INVITROGEN) verwendet. Das Gel wurde bei ca. 200 V für knapp eine Stunde gefahren und anschließend Silber-gefärbt.

2.2.18 Silberfärbung der isolierten Immunglobuline

Das SDS-Gel wurde über Nacht in eine Schale mit 50 % Methanol/dH₂O gelegt. Am nächsten Tag wurde das Gel zunächst ca. 15 min gründlich mit dH₂O gewaschen, dabei wurde das Wasser häufig gewechselt. Anschließend wurde das Gel für 20 min in einer Silbernitratlösung geschwenkt, danach erfolgte wiederum ein Waschschrift mit dH₂O. Zum Entwickeln wurde nun der *Reducer* dazugegeben, bis die gewünschte Bandenstärke erreicht war. Die Reaktion wurde mit Fixierer abgestoppt, indem das Gel für ca. 2 min in dieser Lösung geschwenkt wurde. Zur Dokumentation wurde das gefärbte Gel eingescannt.

2.2.19 Messung von anti-HBs und HBeAg

Die serologischen Marker anti-HBs und HBeAg wurden im AxSym (ABBOTT; Wiesbaden) laut Herstellerangaben gemessen. Dazu wurde jeweils ein Volumen von 300 µl der zu testenden Probe verwendet. Für die Messung des anti-HBs wurde mit dem AxSym[®] AUSAB-Kit gearbeitet, für die Messung von HBeAg wurde das AxSym[®] Anti-HBe 2.0-Kit verwendet.

2.2.20 Primäre Tupaia Hepatozyten (PTH)

2.2.20.1 Beschichten der Zellkulturschalen

Das aliquotierte MatriGel wurde bei Zimmertemperatur aufgetaut und anschließend 1:20 in Wasser verdünnt. Zur Beschichtung der 12 well Platten wurden jeweils 500 µl der MatriGel-Verdünnung in jede Vertiefung pipettiert, die Platte kurz geschwenkt und nach einigen Minuten wieder abgenommen. Nachdem das MatriGel angetrocknet war, wurden in jede Kavität 500 µl HGM + 10 % FKS vorgelegt.

2.2.20.2 Isolation primärer Tupaia Hepatozyten

Für die Infektionsversuche wurden primäre Hepatozyten von *Tupaia belangeri* isoliert und anschließend kultiviert. Da für die Infektion mit HBV der Differenzierungsgrad der Zellen eine entscheidende Rolle spielt, wurden stets frisch isolierte primäre Tupaia Hepatozyten verwendet, die durch Präparation nach der Zwei-Stufen-Kollagenase-Methode nach [Seglen und David, 1976] gewonnen wurden. Das zu präparierende Tier wurde durch Begasung mit CO₂ und anschließendem Genickbruch gemäß der Richtlinien des Tierschutzgesetzes getötet. Um semisterile Bedingungen zu schaffen, wurde das Tier für eine halbe Minute in ein Ethanolbad (70 % in Wasser) getaucht, bevor es auf den Rücken gelegt und auf einer Styroporunterlage mit Nadeln fixiert wurde. Anschließend wurde die Abdominal- und Thoraxhöhle entlang der *Linea alba* geöffnet, der Brustkorb entfernt und die Leber einschließlich der Pfortader (*Venae portae*) freigelegt. Die *Vena portae* wurde mit einer Braunüle (Vasocan; BRAUN, Melsungen) punktiert und die Kunststoffkanüle mit Hilfe einer kleinen Arterienklemme fixiert. Nach Durchtrennen der *Venae portae* wurde die Leber mit Hilfe eines an der Braunüle angeschlossenen Schlauchpumpensystems mit HBSS/5 mM EGTA perfundiert. Nach erfolgreicher Spülung der Leber, erkennbar durch die deutliche Aufhellung der Leberlappen, wurde sie von den Ligamenten gelöst und auf einen Büchnertrichter (MAGV, Rabenau-Londorf) transferiert. Nun erfolgten zwei weitere Perfusionsschritte. Im ersten Schritt wurde die Leber mit HBSS (ohne EGTA) für 20 min gespült, im Zweiten wurde mit einer im rezirkulierenden System laufenden Kollagenaselösung für weitere 15-20 min perfundiert, bis die Leberkapsel porös wurde. Die Kollagenaselösung wurde im Vorfeld durch Lösen von 250 mg Kollagenase IV in 200 ml, 37°C warmen DMEM mit anschließender Sterilfiltration hergestellt. Nun wurde die Leber in eine Zellkulturschale überführt und unter der Sterilbank nach Abtrennen der Galle mit zwei Einmalskalpellen zerkleinert. Die Gewebestücke wurden mit der zur Perfusion verwendeten Kollagenaselösung in einem sterilen Erlenmeyerkolben aufgeschwemmt und für 10-15 min auf dem Schüttler (80-100 rpm) bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurde die Lebersuspension mit Hilfe einer Siebdruckgaze (Porengröße 210 µm) filtriert, um nicht perfundierte Gewebeteile abzutrennen. Das Filtrat wurde gleichmäßig auf vorgekühlte 50 ml Plastikröhrchen

verteilt und dann in einer vorgekühlten Zentrifuge (EPPENDORF 5810R, Rotor A4-62) bei 4°C und 40 g für 6 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet vorsichtig in 10 ml kaltem DMEM resuspendiert. Anschließend wurde das Volumen auf 40 ml mit kaltem DMEM aufgefüllt und wiederum für 6 min bei 40 g und 4°C zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde insgesamt drei Mal durchgeführt und anschließend das Zellpellet in 30-40 ml kaltem HGM + 10 % FKS gelöst. Die Viabilität der frisch isolierten Hepatozyten wurde mittels Trypanblau-Probe überprüft, indem 10 µl Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau (0,4 %) auf einem Objektträger vermischt wurden und anschließend unter dem Mikroskop die farblosen, lebenden Zellen von den blauen, toten Zellen unterschieden werden konnten. Bei erfolgreicher Hepatozyten-Isolation lag die Viabilität zwischen 90-95 %. Je nach Zelldichte wurden dann zwei bis drei Tropfen der Zellsuspension in jede Kavität einer 12 *well* Zellkulturschalen getropft, so dass eine Zellzahl von 10^5 pro *well* vorlag. Die Platten wurden im Vorfeld mit MatriGel beschichtet und mit HGM + 10 % FKS befüllt (2.2.20.1). Nach Austropfen der Hepatozyten erfolgte eine vierstündige Inkubationspause im Brutschrank damit sich die Zellen anheften konnten. Anschließend wurde das Medium gegen 600 µl HGM (ohne FKS) pro Vertiefung ausgetauscht und die Zellen weitere drei Tage bis zu Beginn der Infektionsversuche kultiviert.

2.2.20.3 Versuche zur Neutralisation der HBV-Infektion

Nachdem die anti-HBs Reaktivität der Protein L-gereinigten Immunglobuline im AxSym (ABBOTT; Wiesbaden) bestimmt war, konnten nun definierte Mengen des anti-HBs in den Versuch eingesetzt werden. Es wurden Proteinmengen (entsprechend 300 mIU-0 mIU anti-HBs absolut) einer anti-HBs positiven, geimpften Person eingesetzt und diese mit den korrespondierenden Proteinmengen einer anti-HBs negativen, nicht geimpften oder HBV infizierten Person vermischt. Zu jedem dieser Ansätze wurden jeweils 2.5×10^6 GE gereinigtes HBV eines chronisch infizierten Trägers (ID323, Fraktion 4, Genotyp D) gegeben und die Gesamtansätze (300 µl) für 1 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden diese Virusansätze auf die in 12 *well* Schalen drei Tage kultivierten primären Tupaia Hepatozyten gegeben und

diese für 16 h im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden das Inokulat abgenommen und die Zellen mit Waschmedium zweimal vorsichtig gewaschen. Anschließend wurden die Hepatozyten für weitere 15 Tage kultiviert, wobei jeden dritten oder vierten Tag ein Mediumwechsel mit 600 µl HGM durchgeführt wurde. Von den Mediumüberständen wurde das sekretierte HBsAg im ELISA nachgewiesen. Nachdem das System für die Inhibition der HBV-Infektion durch das anti-HBs eines geimpften Spenders stand, wurden im Anschluss Neutralisationsversuche mit Protein L-gereinigten Ig's eines okkult infizierten Blutspenders (ID 384-ID389) nach derselben Methode durchgeführt. Hier wurden Proteinmengen entsprechend 300 mIU eingesetzt.

2.2.20.4 Überprüfung der Zellviabilität mittels WST1-Test

Am Tag 15 des Infektionsversuches wurde die Viabilität der primären Tupaia Hepatozyten überprüft. Dazu wurde zunächst das Medium abgenommen, jeweils 300 µl einer 1:50 Verdünnung des WST-1 Reagenz auf die Zellen pipettiert und dann für 1 h bei 37°C inkubiert. Während dieser Zeit kann das Tetrazoliumsalz WST-1 durch die zellulären Enzyme der noch lebenden PTH gespalten werden, sodass gelbes Formazan entsteht. Dieser Farbumschlag kann im ELISA-Reader bei OD₄₅₀/OD₆₂₀ gemessen werden und ist proportional zur Menge noch lebender Zellen. Für die Messung wurden jeweils 100 µl des farbigen Überstandes auf eine 96 well Platte gegeben.

3 Ergebnisse

Zu den Orthohepadnaviren gehören neben dem humanen Hepatitis B Virus und einigen Primaten-spezifischen Hepatitisviren auch die Hepadaviren einiger Hörnchen-Arten (*Sciuridae*), wie das ASHV (*Arctic Squirrel Hepatitis Virus*), das GSHV (*Ground Squirrel Hepatitis Virus*) und das WHV (*Woodchuck Hepatitis Virus*), deren natürliche Wirte das Arktische Erdhörnchen, das Kalifornische Erdhörnchen bzw. das Nordamerikanische Waldmurmeltier sind. Im Rahmen einer Studie des Instituts für Medizinische Virologie in Zusammenarbeit mit Dr. Stephan Menne von der *Cornell University, Ithaca, USA*, wurden Seren aus ASHV-infizierten *Arctic Squirrels* gesammelt und *Woodchucks* damit experimentell infiziert. In der vorliegenden Arbeit wurden zum einen das im *Woodchuck* replizierende ASHV, zum anderen das ASHV aus dem eigentlichen Wirt, einem chronisch ASHV-infizierten *Arctic Squirrel*, untersucht. Des Weiteren wurde das humane Hepatitis B Virus in insgesamt 14 klinisch interessanten Serumproben, teilweise von Blutspendern mit okkulten HBV Infektion, analysiert.

3.1 Sequenzanalyse des Arctic Squirrel Hepatitis Virus (ASHV) aus dem Serum eines Arktischen Hörnchens und eines experimentell infizierten Amerikanischen Waldmurmeltiers

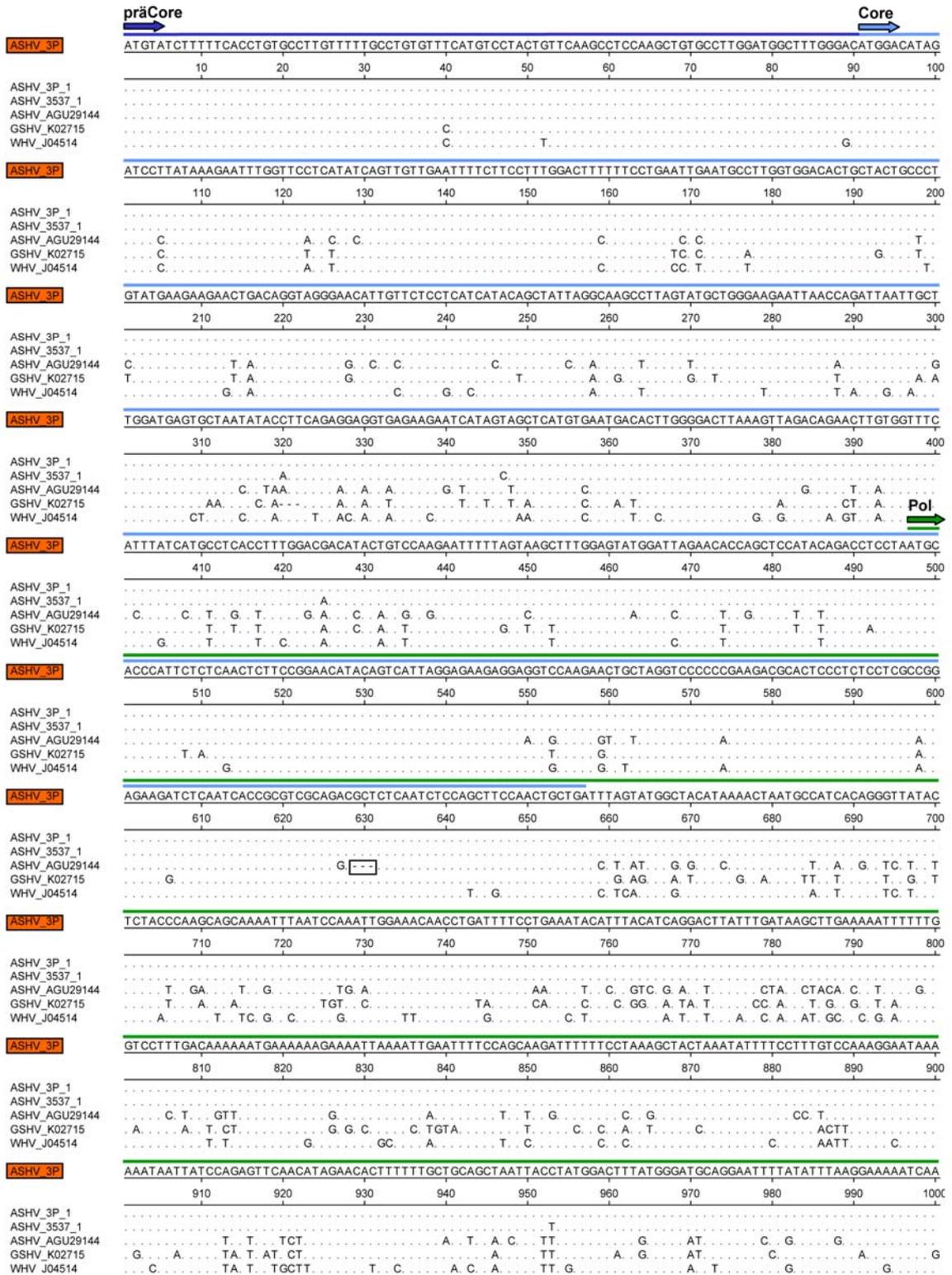
Es wurden Serumproben aus der experimentellen, akuten Infektion von *Woodchucks* mit ASHV (Tier 3537, Woche 16, log ASHV DNA: 9,42 GE/ml) und aus dem natürlichen Isolat eines chronisch infizierten *Arctic Squirrels* (Wildfang, Kolonie 3P_1E5852) verwendet und die virale DNA isoliert. Anschließend wurde das Gesamtgenom mit ASHV-spezifischen Primern amplifiziert und in den *pCR[®]-XL-TOPO cloning vector* kloniert (2.2.9.3). Von der Probe 3537 wurden zwei Klone, von der Probe 3P_1E5852 nur ein Klon untersucht, die im folgenden als ASHV_{3537_#1} bzw. ASHV_{3537_#2} und ASHV_{3P_#1} bezeichnet werden. Für die Analyse der Klone wurden, von dem publizierten ASHV-Referenzgenom AGU29144 ausgehend [Testut *et al.*, 1996], die passenden Primer konstruiert und das Gesamtgenom stückweise sequenziert (MWG, Martinsried). Anschließend wurden die Sequenzen in *MegAlign* (Programm DNASTAR Lasergene) ausgewertet.

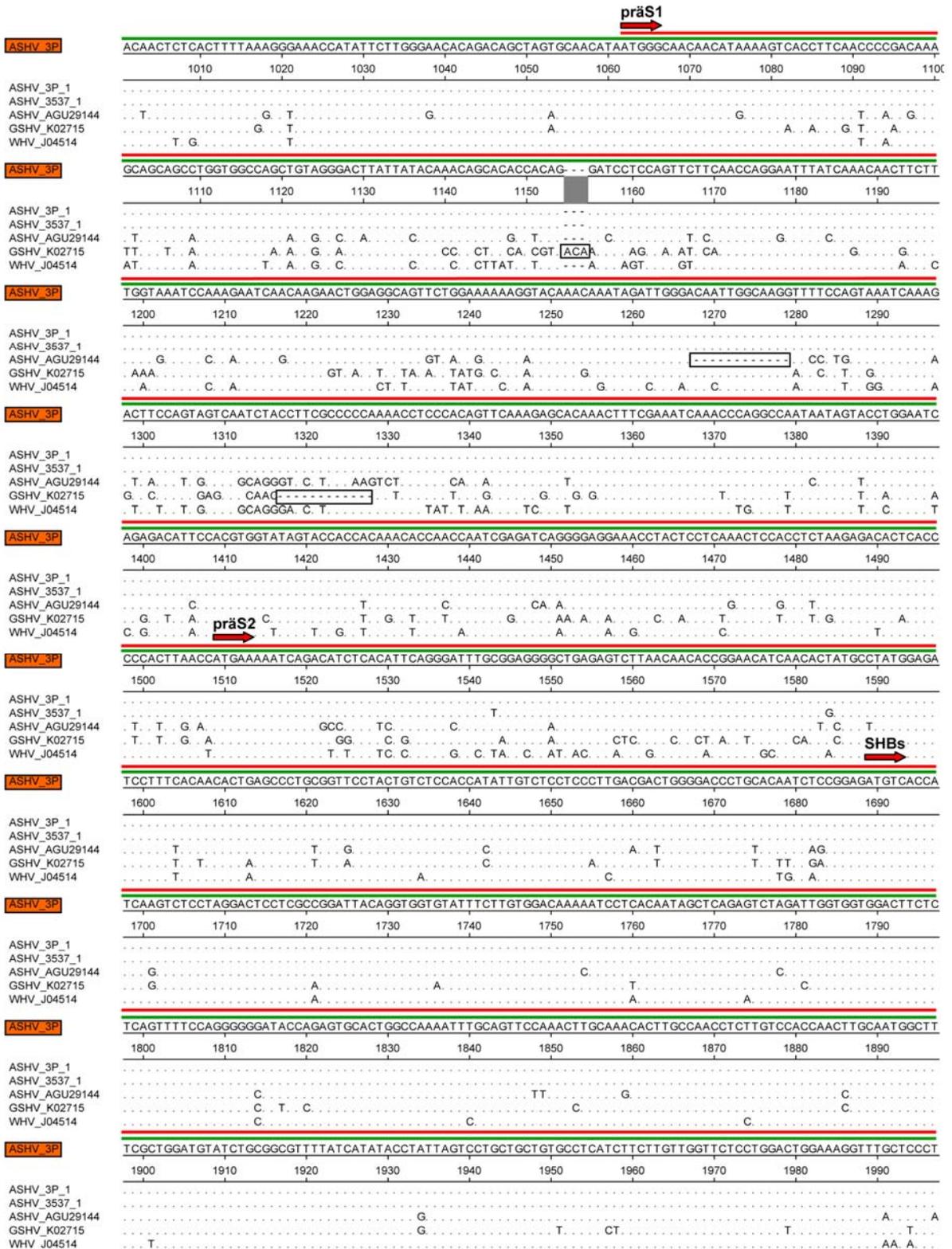
3.1.1 Sequenzanalyse der ASHV-Klone

Für die Analyse der Sequenzen wurde die *ClustalV*-Methode [Higgins und Sharp, 1989] angewendet, bei der Sequenzpaare auf übereinstimmende Muster in ihrer Nukleotidsequenz geprüft werden. Das daraus resultierende *alignment* bildet die Basis für Sequenzanalysen und phylogenetische Untersuchungen. Zunächst wurde das *alignment* der beiden ASHV-Gesamtgenome aus dem *Woodchuck* (ASHV_{3537_#1} und _{3537_#2}) erstellt. Da diese beiden Sequenzen zu 99,9 % übereinstimmen, wurde für die weitere Analyse mit dem Klon ASHV_{3537_#1} gearbeitet. Für die *alignments* der Hörnchen-Hepadnaviren wurde als Konsensus-Sequenz der Klon ASHV_{3P_#1} verwendet und die Sequenzen des Klons ASHV_{3537_#1}, des publizierten ASHV_{AGU29144} sowie die Sequenzen von GSHV_{K02715} und WHV_{J04514} mit dem Konsensus verglichen. Es wurden die *alignments* der Gesamtgenomsequenzen auf Nukleotidebene (Abbildung 3-1) und die der vier ORFs auf Aminosäureebene (Abbildung 3-2) erstellt. Des Weiteren werden die Divergenzen der vergleichenden Sequenzpaare in Tabelle 3-2 dargestellt. Bei der Sequenzanalyse fällt als erstes auf, dass die Gesamtlänge aller drei Klone insgesamt 3323 Nukleotide beträgt und somit 21 nt länger ist als bei der bisher publizierten ASHV_{AGU29144}-Sequenz. Die ASHV-Klone entsprechen in ihrer Länge der Sequenz von WHV_{J04514} (Tabelle 3-1).

Tabelle 3-1 Genomlängen der Hepadnaviren der Hörnchen (*Scuiridae*)

Spezies	Isolat	Genomlänge (bp)	Referenz
WHV	WHV _{J04514}	3323bp	[Girones <i>et al.</i> , 1989]
GSHV	GSHV _{K02715}	3311bp	[Marion <i>et al.</i> , 1980]
ASHV	ASHV _{AGU29144}	3302bp	[Testut <i>et al.</i> , 1996]
ASHV	ASHV_{3P_#1}	3323bp	diese Arbeit
ASHV	ASHV_{3537_#1}	3323bp	diese Arbeit
	ASHV_{3537_#2}	3323bp	diese Arbeit





ASHV_3P	GTCTGTCTCTGAAACCATCAACAGAAACAAGTAACTGCAGACAATGCACAATCTCTGCTCAAGACATCTCTTAACTCCTTACTGTTGTTGTTAA
ASHV_3P_1	2000 2010 2020 2030 2040 2050 2060 2070 2080 2090
ASHV_3537_1
ASHV_AGU29144	A CA AC C G T T C T C
GSHV_K02715	A CA TG G T C A A G A A C T C
WHV_J04514	TC CA C T A A G A A C T C
ASHV_3P	AACCCACGGCAGGAAATTGCACCTGTTGGCCCATCCCTTCATCATGGACTTTAGGAAGCTACCTATGGGAGTGGGCCTCAGCCCGTTTCTCTCGGCTCAG
ASHV_3P_1	2100 2110 2120 2130 2140 2150 2160 2170 2180 2190
ASHV_3537_1
ASHV_AGU29144	T C G T T T
GSHV_K02715	T T T G G A T T
WHV_J04514	T T T G G A T T
ASHV_3P	TTTACTAGTGCCTTGCTTCAATGGTAGGAGAAATTTCCCTCACTGTGGCTTTTGCCTAATGGATGATTTGGTTTGGGGCCCGTACTCATGAGC
ASHV_3P_1	2200 2210 2220 2230 2240 2250 2260 2270 2280 2290
ASHV_3537_1
ASHV_AGU29144	A C T T C
GSHV_K02715	A C T T C
WHV_J04514	A C T T C
ASHV_3P	ATCTTACCGCCATTTATCCCAATTTTCTCTGTTTTCTTGATCTGGGCATACATTTAAATGTTAATAAACTAAATGGTGGGACATCATTTACATTT
ASHV_3P_1	2300 2310 2320 2330 2340 2350 2360 2370 2380 2390
ASHV_3537_1
ASHV_AGU29144	T AGCC
GSHV_K02715	G GG A T T C A C A C
WHV_J04514	T T G C A C
ASHV_3P	TATGGGATATGTTAATACAGTACAGGAGTTTCCCCAGGAAACATGTGCAAAAGGTAAACACCTACTACAATCTCTTCTGTTAATCAGCCTTTA
ASHV_3P_1	2400 2410 2420 2430 2440 2450 2460 2470 2480 2490
ASHV_3537_1
ASHV_AGU29144	C T CTG AG A A A T A T A T A T A T GA CA AC C CA A
GSHV_K02715	C C ACC TG G G A T A T A T A T A T A T A T A T A C
WHV_J04514	C G CT T T A A A C T A G A A T T C C G T T G C G G A A C G
ASHV_3P	GATTAACAAATCTGTGAAAGATTAACCTGGTATATGAATATGTTGCACCTTTTACCAAAATGTTGGATATGCTGCTCATGCCCTTGTATAATGCGATAG
ASHV_3P_1	2500 2510 2520 2530 2540 2550 2560 2570 2580 2590
ASHV_3537_1
ASHV_AGU29144	T G A C T C T T C A T T
GSHV_K02715	T A G G C T C T C T C T C T C T C T C T C T C T C T C T
WHV_J04514	T G G C T C T C T C T C T C T C T C T C T C T C T C T
ASHV_3P	CTTCGCATACAGCATTTGTTTCTCCTCTGTATAAAAATTTGGTACTGTCACTTATTCTGAGTGTGGCCCGTGGCAGGCAACGTGGTGTGGTGTG
ASHV_3P_1	2600 2610 2620 2630 2640 2650 2660 2670 2680 2690
ASHV_3537_1
ASHV_AGU29144	G G G T T C C C G C G G C G C G G G T T
GSHV_K02715	T T
WHV_J04514	C G T G T C A C T A C C T G G A G G T T T T T T T T T T T T
ASHV_3P	CTCTGTGTTGCTGACGCAACCCCACTGGTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAACTCATTTCCGGGACTTTCCGCTTCGCCCTCCCGATTGCCACGGCT
ASHV_3P_1	2700 2710 2720 2730 2740 2750 2760 2770 2780 2790
ASHV_3537_1
ASHV_AGU29144	T T
GSHV_K02715	A T
WHV_J04514	A T
ASHV_3P	GAACTTATCGCCGCTGCCTTCTCGCTGCTGGCAGGAGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAAATCCGTGGTCTTGTGGGCAAGCTCACGTCCTCCCAT
ASHV_3P_1	2800 2810 2820 2830 2840 2850 2860 2870 2880 2890
ASHV_3537_1
ASHV_AGU29144	CG C T C T C T C T C T C T C T C T C T C T C T C T C T
GSHV_K02715	G A C T T A T C G C C G C T G C C T T C T C G C T G C T G G C A G G A G C T C G G C T G T T G G C A C T G A C A A T C C G T G G T C T T G T G G G C A A G C T C A C G T C C T C C C A T
WHV_J04514	C A C T T A T C G C C G C T G C C T T C T C G C T G C T G G C A G G A G C T C G G C T G T T G G C A C T G A C A A T C C G T G G T C T T G T G G G C A A G C T C A C G T C C T C C C A T
ASHV_3P	GGCTGCTCGCCTGTGTGCCAACTGGATTCTCGCGGGGACGTCCTTCTGCTACGTCGGGCTGGGGGACAATCCAGCGGACCTGCCGTCTCGCGGCTCTTCT
ASHV_3P_1	2900 2910 2920 2930 2940 2950 2960 2970 2980 2990
ASHV_3537_1
ASHV_AGU29144	T G C T A C G G
GSHV_K02715	T T
WHV_J04514	C T



Abbildung 3-2 Alignment der Aminosäuresequenzen der einzelnen ORFs von den Hepadnaviren der Hörnchen (*Scuiridae*); Der Klon ASHV_3P bildet die Konsensus-Sequenz mit dem die Sequenzen des klonierten ASHV_{3537#1} und die publizierten Referenzgenome von ASHV_{AGU29144}, GSHV_{K02715} und WHV_{J04514} verglichen wurden. Übereinstimmung mit dem Konsensus werden durch einen Strich dargestellt, Abweichungen durch die jeweilige AS; Markierungen (Linien) der vier ORFs: präC/C: blau; pol: grün; präS/S: rot; X: gelb; Pfeile: Translationsstartpunkte; YMDD-Motiv im pol-frame; Glyc: N-Glykosylierungsstellen im präS/S-ORF.

Der Sequenzvergleich des Klon ASHV_{3537_#1} aus dem ASHV-infizierten *Woodchuck* mit dem aus dem *Arctic Squirrel* direkt stammenden Klon ASHV_{3P_#1} zeigt eine geringe Divergenz von 0,3 % zwischen diesen beiden Klonen (Tabelle 3-2). Lediglich neun Positionen: nt 320, 347, 425, 953, 1543, 1584, 2123, 2145, 2190 (Abbildung 3-1) variieren, von denen es sich in zwei Dritteln (nt 320, 347, 425, 1584, 2145, 2190) um nicht-synonyme Substitutionen handelt, was sich in einer Änderung der AS-Sequenz widerspiegelt (Abbildung 3-2). Der Vergleich der Gesamtgenomsequenzen der beiden Klone ASHV_{3P_#1} und ASHV_{3537_#1} mit den publizierten Sequenzen der Hörnchen zeigt Divergenzen von 13,0 % bzw. 12,9 % zu ASHV_{AGU29144}, eine Divergenz von 14,3 % zu WHV_{J04514} und 15,9 % zu GSHV_{K02715} (Tabelle 3-2). Bei Betrachtung der einzelnen ORFs fällt auf, dass die präCore-Region im C-ORF bei allen Hörnchen sehr konserviert ist, während im Core-Bereich eine Reihe von Unterschieden auftreten. Auf nt-Ebene divergieren die ASHV-Klone zu ASHV_{AGU29144} um 10,0 % bzw. 9,9 %, zu GSHV_{K02715} um 9,9 % und zu WHV_{J04514} um 10,5 % bzw. 10,7 % (Tabelle 3-2). In der AS-Sequenz des C-ORFs fällt auf, dass das publizierte ASHV_{AGU29144} eine Deletionen von einer AS (AS 210, C-ORF, Abbildung 3-2) innerhalb des SPRRRR-Motivs aufweist, die in den Klonen nicht bestätigt wurde und auch nicht bei GSHV oder WHV auftritt. Die präS-Region im präS/S-ORF ist der heterogenste Bereich der vier ORFs. Auf Nukleotidebene weichen die ASHV-Klone im präS-Bereich um 16,2 % bzw. 16,6 % von ASHV_{AGU29144} ab, um 21,2 % bzw. 21,0 % von WHV_{J04514} und sogar um 25,0 % bzw. 25,5 % von GSHV_{K02715}. Die S-Domäne dagegen ist der am stärksten konservierte Bereich. Hier weichen die Klon-Sequenzen nur um 4,5 % bzw. 4,3 % von ASHV_{AGU29144}, um 6,8 % bzw. 6,6 % von GSHV_{K02715} und um 6,4 % von WHV_{J04514} ab (Tabelle 3-2). Auf AS-Ebene sind im präS/S ebenfalls etliche Positionen zu erkennen, an denen das publizierte ASHV_{AGU29144} von den ASHV-Klonen sowie von GSHV_{K02715} und/oder WHV_{J04514} abweicht. Neben Austauschen wie I5M, W72L, Q131K, T150N, T155S, K232N, Q264L, A374V oder I404T fällt besonders die Deletion von vier Aminosäuren (AS 73-76) bei ASHV_{AGU29144} auf, die weder bei den ASHV-Klonen noch bei GSHV_{K02715} und WHV_{J04514} auftritt (Abbildung 3-2). Im P-ORF weichen die Sequenzen der ASHV-Klone von ASHV_{AGU29144} um 13,3 % ab, von WHV_{J04514} um 14,9 % bzw. 14,7 % und von GSHV_{K02715} um 16,5 % bzw. 16,4 % (Tabelle 3-2).

Tabelle 3-2 Divergenzen [%] der Hepadnaviren der Hörnchen (ASHV, GSHV und WHV) auf nt-Ebene.

Dargestellt sind die Divergenzen der Sequenzpaare bezogen auf die Gesamtsequenz und zusätzlich differenziert in die einzelnen Genomabschnitte der korrespondierenden ORFs; präC/C: gesamter C-ORF; präS: präS1 und präS2-Domäne; S: nur S-Domäne; pol: gesamter P-ORF, X: gesamter X-ORF; Die Bereiche präS und S wurden getrennt aufgeführt um die Heterogenität klarer darzustellen. Sind zwei Werte angegeben bezieht sich der Erste auf die Divergenz zu Klon ASHV_{3P}, der zweite Wert auf die Divergenz zu Klon ASHV_{3537#1}.

Vergleich der Hepadnaviren		Divergenzen [%] auf nt-Ebene						
Sequenzpaare		Gesamt	prä C/C	präS	S	pol	X	
VON...	ZU...							
ASHV _{3P}	ASHV ₃₅₃₇	0,3	0,5	0,3	0,5	0,2	0,0	
ASHV _{3P} bzw. 3537	ASHV _{AGU29144}	13,0/12,9	10,0/9,9	16,2/16,6	4,5/4,3	13,3	13,9	
ASHV _{3P} bzw. 3537	GSHV _{K02715}	15,9	9,9	25,0/25,5	6,8/6,6	16,5/16,4	18,7	
ASHV _{3P} bzw. 3537	WHV _{J04514}	14,3	10,5/10,7	21,2/21,0	6,4	14,9/14,7	13,1	
ASHV _{AGU29144}	GSHV _{K02715}	16,5	9,4	26,6	6,3	17,2	20,7	
ASHV _{AGU29144}	WHV _{J04514}	16,7	11,1	23,9	7,6	17,3	15,7	
GSHV _{K02715}	WHV _{J04514}	18,0	10,9	27,5	8,9	18,7	17,5	

Auf AS-Ebene treten zusätzlich zu den zwei schon beschriebenen Deletionen noch zwei weitere Deletionen im P-ORF des publizierten ASHV_{AGU29144} auf, die nicht in den ASHV-Klonen oder GSHV_{K02715} und WHV_{J04514} detektiert wurden. Dort sind die beiden Positionen AS 701 und AS 738 konserviert und nicht deletiert (Abbildung 3-2).

Der X-ORF weist ebenso wie der präS-Bereich eine sehr hohe Heterogenität in der Sequenz auf. Die ASHV-Klone zeigen hier eine Variabilität von 13,9 % zu ASHV_{AGU2914}, 18,7 % zu GSHV_{K02715} und 13,1 % zu WHV_{J04514} (Tabelle 3-2), die sich auch in der AS-Sequenz widerspiegelt (Abbildung 3-2). Die wichtigsten Unterschiede der ASHV-Klone zum publizierten ASHV_{AGU2914} sind in Tabelle 3-3 zusammengefasst.

Tabelle 3-3 Zusammenfassung der im publizierten ASHV_{AGU2914} auftretenden Deletionen die durch Sequenzvergleich mit den Klonen ASHV_{3P_#1} und ASHV_{3537_#1}, sowie den Referenzgenomen GSHV_{K02715} und WHV_{J04514} detektiert wurden; Die Nummerierung bezieht sich auf die Sequenzen der ASHV-Klone ASHV_{3P_#1} und ASHV_{3537_#1} aus Abbildung 1-1 und Abbildung 1-2.

Deletionen bei ASHV_{AGU2914} (im Vergleich zu den Klonen ASHV_{3P_#1} und ASHV_{3537_#1})		
nt-Position im Gesamtgenom	nt-Position, ORF (nt-Sequenz)	AS-Position, ORF, (AS-Sequenz)
629-631	629-631, präC/C 133-135, pol (GCT)	210, präC/C, (R) 45, pol, (A)
1268-1279	210-221, präS1 775-786, pol (CAATTGGCAAGG)	73-76, präS1, (QGFP) 259-262, pol, (QLAR)
2595-2597	2103-2105, pol (TAG)	701, pol, (I)
2706-2708	2214-2216, pol (TTG)	738, pol, (F)
Fazit	Vier Deletionen bei ASHV _{AGU2914} von insgesamt 21nt (7aa) und somit kürzere Genomlänge von nur 3302 nt anstatt 3323nt wie bei den Klonen ASHV _{3P_#1} und ASHV _{3537_#1}	

3.1.2 Evolutionäre Beziehungen von ASHV, WHV und GSHV

Basierend auf dem *alignment* können phylogenetische Beziehungen untersucht werden. Für jedes Sequenzpaar wird automatisch eine Distanz errechnet, die ein Maß für die durchschnittliche Substitutionsrate des Paares darstellt. Je geringer die Distanz, also die Substitutionsrate ist, desto höher ist die Ähnlichkeit, also die Identität des Sequenzpaares. Anhand der Distanzen wird dann ein phylogenetischer Baum konzipiert (Abbildung 3-3) und mathematisch die Divergenz abgeleitet (Tabelle 3-2). Für die Erstellung des phylogenetischen Baums in Abbildung 3-3 A wurde der *bootstrap*-Test mit der UPGMA-Methode (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean*) angewendet (Programm Mega 4.0) [Tamura *et al.*, 2007]. An jedem Knotenpunkt wird ein *bootstrap*-Wert angezeigt, der sich auf die Wahrscheinlichkeit der Verzweigung bezieht. Je näher dieser Wert an 100 liegt, desto wahrscheinlicher ist, dass die wahre Phylogenie gefunden wurde [Hillis und Bull, 1993]. In Abbildung 3-3 A wird deutlich, dass sich zuerst GSHV von den anderen Hörnchen abspaltet, danach erfolgt die Auftrennung von WHV und ASHV. Innerhalb der ASHV-Gruppe erfolgt am ersten Knotenpunkt dann die Abzweigung der drei ASHV-Klone von den bekannten ASHV-Referenzgenomen. Die *bootstrap*-Werte liegen für alle diese Verzweigungen nahezu bei 100, so dass von der Richtigkeit der Verzweigung ausgegangen werden kann. Für die Erstellung des zweiten phylogenetischen Baums (Abbildung 3-3 B) wurde *MegAlign* verwendet. Hier gibt die Zweiglänge die genetischen Unterschiede der einzelnen Taxa wieder und zeigt somit die verwandtschaftliche Beziehungen an. Es wird deutlich, dass GSHV die entfernteste Verwandtschaft zu WHV und ASHV aufweist da es sich zuerst von der Gruppe abspaltet. Danach erfolgt die Abtrennung des publizierten ASHV, bevor sich schließlich die ASHV-Klone vom WHV trennen. Diese Abbildung zeigt, dass die ASHV-Klone mehr Ähnlichkeit mit WHV aufweisen, also enger mit WHV verwandt sind, als das publizierte ASHV_{AGU29144}. Das wird auch anhand der Divergenzen in Tabelle 3-2 deutlich. Die ASHV-Klone weisen zum WHV_{J04514} eine Divergenz von 14,3 % auf, während das publizierte ASHV_{AGU29144} zu WHV_{J04514} um 16,7 % variiert. Es kann gefolgert werden, dass die neuen ASHV-Isolate näher mit den anderen Hörnchen verwandt sind als das publizierte ASHV, was sich auch durch die Deletionen von ASHV_{AGU29144} belegen lässt (Tabelle 3-3).

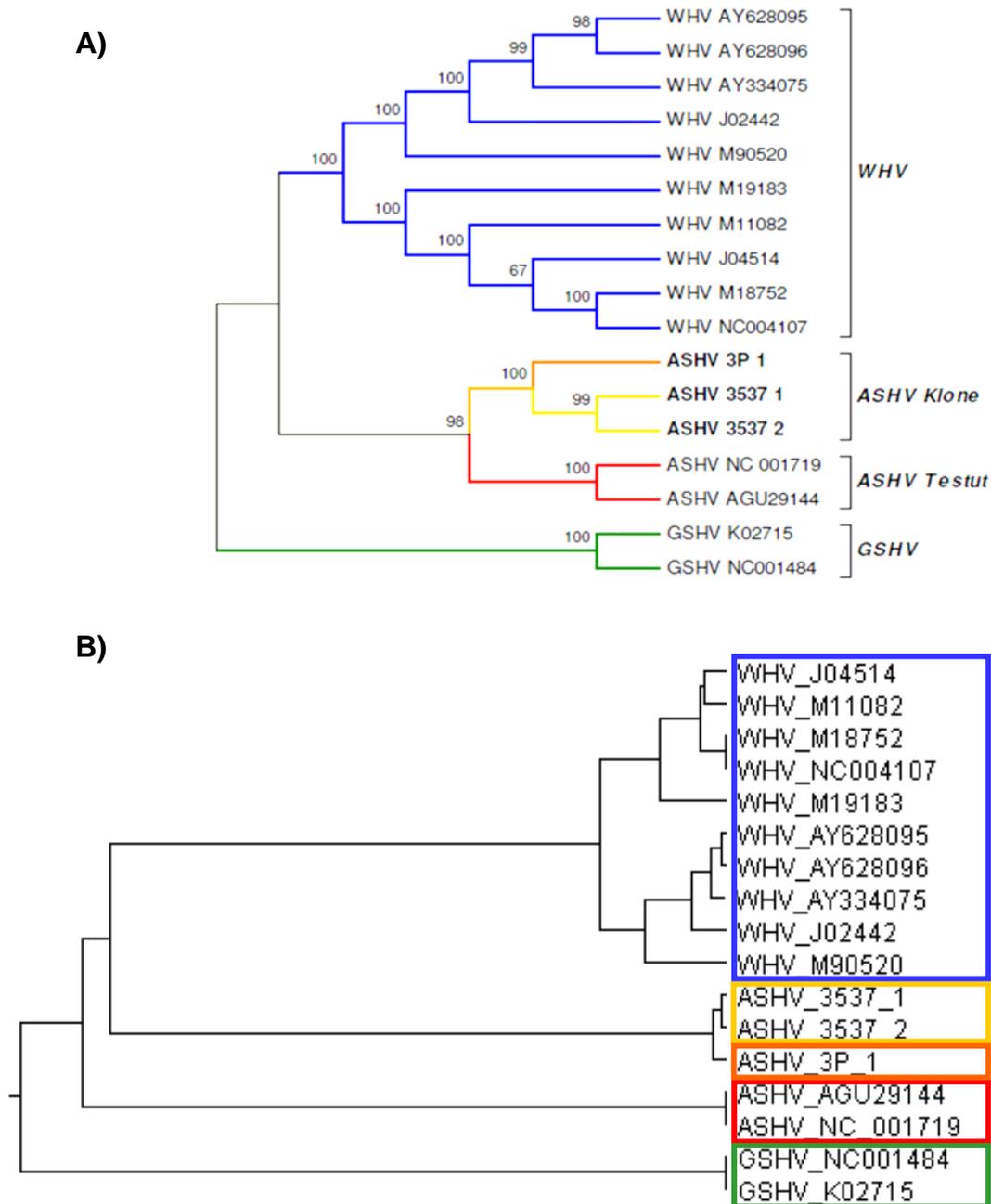


Abbildung 3-3 Phylogenetische Bäume der ASHV-Klone und der Referenzgenome von WHV, ASHV und GSHV basierend auf der *alignen* Gesamtgenomsequenz; A) *bootstrap*-Test mit der UPGMA-Methode (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean*), Programm MEGA 4.0.; an jedem Knotenpunkt ist der *bootstrap*-Wert angegeben; Äste sind entsprechend ihrer taxonomischen Zuordnung farbig markiert (s.u.) B) *ClustalV*-Methode, Programm *MegAlign*, Zweiglänge gibt Nukleotidunterschiede an und spiegelt somit verwandtschaftliche Beziehung wider; farbige Umrandung entsprechend der taxonomischen Zuordnung: blau: WHV, gelb/orange: Klone $ASHV_{3P\#1}$ und $ASHV_{3537\#1/\#2}$, rot: ASHV, grün: GSHV; jede Referenz wird mit ihrer *Accession*-Nummer der NCBI-Datenbank angegeben.

3.1.3 Nachweis von ASHeAg, GSHeAg und WHeAg

Nach Sequenzanalyse sollte abschließend noch getestet werden, ob das dem humanen HBeAg vergleichbare ASHV eAg mit den Antikörpern des humanen HBeAg-Testsystems kreuzreagiert und in den ASHV-Serumproben (ASHV#3537, ASHV_3P_1E5852) detektierbar ist. Des Weiteren wurde untersucht, ob das eAg der beiden anderen Nagetier-Gattungen (GSHeAg und WHeAg) ebenfalls im Test nachweisbar ist. Dazu wurden unterschiedliche Serumproben 1:10 verdünnt und im AxSym (ABBOTT, Wiesbaden) getestet (2.2.19).

Die Tabelle 3-4 zeigt, dass alle Proben im AxSym positiv reagieren, auch wenn die eAg-Werte unterschiedlich hoch liegen. Die Sekretion des eAg der drei Nagetier-Gattungen kann also mit dem humanen Testsystem detektiert werden.

Tabelle 3-4 Messung des HBeAg aus ASHV, GSHV und WHV-haltigen Serumproben (1:10 Verdünnung), die aus *Woodchucks* und *Arctic Squirrels* isoliert wurden; farbige Unterlegung: Proben, die auch kloniert wurden, ASHV#3537 = *Woodchuck* mit experimenteller, akuter ASHV-Infektion, ASHV_3P = drei unterschiedliche *Arctic Squirrel* Kolonien die chronisch mit ASHV infiziert sind, GSHV#3545 = *Woodchuck* mit akuter GSHV-Infektion; WHV#5389, WHV#98035, WHV#99252 = *Woodchucks* mit chronischer WHV-Infektion, n.b = nicht bekannt.

Probe	Wirt	Infektionsverlauf	Abnahme (Woche)	log DNA (GE/ml)	eAg (S/CO) gemessen (1:10)
ASHV ₃₅₃₇	<i>Woodchuck</i>	akut	09/11/03 (16)	9,42	200,08
ASHV _{3P_1E5852}	<i>Arctic Squirrel</i>	chronisch	n.b	n.b	135,51
ASHV_3P_2D2521	<i>Arctic Squirrel</i>	chronisch	n.b	n.b	5,13
ASHV_3P_123D4A	<i>Arctic Squirrel</i>	chronisch	n.b	n.b	6,91
GSHV #3545	<i>Woodchuck</i>	akut	07/03/03 (6)	8,86	135,10
WHV #5389	<i>Woodchuck</i>	chronisch	n.b	n.b	10,42
WHV #98035	<i>Woodchuck</i>	chronisch	n.b	n.b	22,86
WHV #99252	<i>Woodchuck</i>	chronisch	n.b	n.b	27,76

3.2 Untersuchung und Charakterisierung von Seren okkultter HBV-Träger mittels unterschiedlicher Klonierungsverfahren

Für die Untersuchung und Charakterisierung von Quasispezies der HBV-Varianten wurden Serumproben analysiert, die zum Teil von Blutspendern mit einer okkulten HBV Infektion (OBI) stammten. Bei der OBI liegen geringe Mengen replikationskompetenter HBV-DNA in der Leber vor, aber im Serum ist kein HBsAg nachweisbar. Insgesamt wurden 14 klinisch interessante Serumproben analysiert und 134 Klone erhalten, die dann sequenziert und verglichen wurden.

3.2.1 Optimierung der Klonierungsmethode mittels unterschiedlicher PCR Techniken und Expressionssysteme

Aus Patientenseren sollte zunächst die virale DNA isoliert, diese dann mittels PCR amplifiziert und anschließend sequenziert werden. Die Fälle, die in der Direktsequenzierung interessante Mutationen im Bereich der Oberflächenproteine zeigten, sollten anschließend kloniert werden, indem Teile oder wenn möglich das komplette HBV-Genom in einen Expressionsvektor eingesetzt werden. Die resultierenden Klone sollten nach Sequenzierung dann auf Heterogenitäten im HBsAg analysiert werden. Da die Methodik zu Beginn der Arbeit nicht ausreichend empfindlich für die Analyse der OBI war, musste sowohl die Methodik der PCR als auch die verwendeten Klonierungssysteme zunächst optimiert werden.

3.2.1.1 PCR Techniken

Da sich teilweise nur sehr geringe Mengen HBV-DNA (< 310 GE/ml) in den zur Verfügung stehenden Serumproben befanden, war es nicht möglich das Gesamtgenom in der *Mastercycler*-PCR oder im *LightCycler* zu amplifizieren. Aus diesem Grund wurde zunächst die DNA aus einer Probe (K301) mit hoher Viruslast (10^8 GE/ml) isoliert und amplifiziert. Da vor allem der Bereich der Oberflächenproteine bei den Untersuchungen interessierte, wurde zunächst ein Protokoll für die Amplifikation des LHBs im *LightCycler* erarbeitet. Trotz Amplifikation waren bei Serumproben mit wenig Genomäquivalenten auch nach durchgeführter PCR die DNA-Mengen noch so gering, dass die PCR-Produkte

zunächst aufgereinigt und anschließend im *Mastercycler* reamplifiziert wurden. Bei Serumproben mit hoher Viruslast ($> 10^5$ GE/ml) wurde die Amplifikation mittels *Mastercycler*-PCR durchgeführt und wenn möglich das komplette HBV-Genom amplifiziert. Je nach Fragestellung wurde mit unterschiedlichen Polymerasen gearbeitet. Für die Amplifikation des HBsAg (ca. 1,4 kb) wurde eine normale *Taq*-Polymerase verwendet, für die Amplifikation von Gesamtgenomen (ca. 3,2 kb) wurde eine Polymerase (Platinum[®] *Taq* DNA-Polymerase *High Fidelity*) mit *proof-reading*-Aktivität verwendet (2.2.6.2.1).

3.2.1.2 Expressionsvektoren

Nach Amplifikation der LHBs-Sequenz wurde das ca. 1,4 kb große DNA-Fragment mit Hilfe von TA-Überhängen in den Vektor *pCR[®]2.1-TOPO* des *TOPO TA Cloning Kit* kloniert. Wegen der beobachteten geringen Klonierungseffizienz (nur ca. 30 % potentiell positive Klone) wurde dann auf ein anderes Klonierungssystem zurückgegriffen. Die nachfolgenden Klonierungen von HBsAg oder Fragmenten dieser Größenordnung wurden mit dem *pGEM[®]-T* Vektor aus dem *pGEM-T Cloning Kit* von PROMEGA durchgeführt. Hier lag die Ausbeute an positiven Klonen im Durchschnitt bei ca. 80 %. Für die Klonierung von Gesamtgenomen wurde der Vektor *pCR[®]-XL-TOPO* von INVITROGEN verwendet (2.2.9.3).

3.2.2 Übersicht der HBV-Klonierungen

Die Tabelle 3-5 zeigt eine Übersicht über alle klonierten Patientenproben mit der Anzahl der analysierten Klone. Die ersten elf Patientenseren (K301-K578) wurden zwecks Sequenzanalyse kloniert, von den letzten drei Seren wurden das Gesamtgenom kloniert, um sie später im Transfektionsversuch testen zu können.

Tabelle 3-5 Übersicht der Patientenseren mit den verwendeten *Cloning kits*;
 Tabellarische Auflistung der klonierten Proben mit entsprechendem HBV-Genotyp, verwendetem Klonierungsvektor und Informationen zum klonierten Insert, sowie der Anzahl der untersuchten Klone; oberhalb gestrichelter Linie: Patientenseren für Sequenzanalyse, unterhalb gestrichelter Linie: Klonierungsansätze für Transfektionsversuche.

ID-Nr.	HBV Genotyp	Expressionsvektor	Insert (ORF)	Größe (kb)	Klone (analys.)
K301	A	pCR [®] 2.1-TOPO / pGEM [®] -T	LHBs	1,4	31
K444	D	pCR [®] 2.1-TOPO / pGEM [®] -T	LHBs	1,4	12
K443	D	pCR [®] 2.1-TOPO / pGEM [®] -T	LHBs	1,4	9
ID384	A	pGEM [®] -T	LHBs	1,4	10
ID389	A	pGEM [®] -T	LHBs	1,4	7
ID385	A	pGEM [®] -T	SHBs	0,6	8
ID386	A	pGEM [®] -T	LHBs	1,4	12
ID387	A	pGEM [®] -T	LHBs	1,4	10
K442	A	pGEM [®] -T	LHBs	1,4	19
K724	D	pGEM [®] -T	LHBs	1,4	10
K587	D	pCR [®] -XL-TOPO	Gesamtgenom	3,2	3
K438	A	pCR [®] -XL-TOPO	Gesamtgenom	3,2	1
ID326	D	pCR [®] -XL-TOPO	Gesamtgenom	3,2	1
K979	G	pCR [®] -XL-TOPO	Gesamtgenom	3,2	1

3.2.3 Sequenzanalyse der HBV-Klone

Nach Klonierung und Blau-Weiß Selektion wurden die resultierenden Klone mittels PCR *gescreened*. Von den positiven Klonen wurden Übernacht-Kulturen angeimpft, die Plasmid-DNA mittels Minipräp (QIAGEN, Hilden) aus den Bakterien isoliert und anschließend sequenziert (Eurofins MWG Operon, Ebersberg). Die Auswertung der Sequenzen erfolgte in *Seqman* und mit der *ClustalV*-Methode in *MegAlign* (Programm DNASTAR Lasergene) (2.2.11). In den folgenden Abschnitten werden jeweils kurz der Patientenhintergrund und tabellarisch die serologischen Marker dargestellt. Dabei wird aus Datenschutzgründen und zur besseren Einordnung des Patienten dessen Identifikationsnummer (ID) oder Konsiliar-Nummer (K) angegeben. Zusätzliche Informationen sind: HBsAg (*PEIU/ml* oder $\mu\text{g/ml}$ oder *S/N*: je nach verwendetem Testsystem), HBeAg (*PEIU/ml*), anti-HBs, anti-HBc und anti-HBe (*S/CO: signal to cutoff ratio*), sowie HBV-DNA (*GE/ml: Genomäquivalente/ml*). Anschließend werden die detektierten Mutationen beschrieben. Bei der Sequenzanalyse wurde in erster Linie der S-ORF betrachtet, aber auch die Auswirkungen im P-ORF berücksichtigt. Nach Analyse der Sequenzen wurde dann die Anzahl der nt-Substitutionen gezählt, wobei zwischen nicht-synonymen (d_N) und synonymen (d_S) Austauschen unterschieden und der Quotient (d_N/d_S) errechnet wurde (Tabelle 3-26). In einem letzten Schritt wurde die Anzahl der AS-Substitutionen (AS_{sub}) ins Verhältnis zur Gesamtzahl untersuchter Aminosäuren (AS_{total}) gesetzt (Tabelle 3-27).

3.2.4 Patientenkollektiv und analysierte Klon-Sequenzen

3.2.4.1 Patient mit chronischer HBV-Infektion (Referenzprobe)

Bei Patient (K301) handelte es sich nicht um einen okkulten HBV-Infizierten, da im Serum große Mengen an HBsAg nachgewiesen werden konnten und auch große Mengen ($> 10^8 \text{GE/ml}$) HBV-DNA (Tabelle 3-6). Die erhaltenen Daten dieses „normalen“ HBsAg⁺ Patienten dienen somit als Kontrolle bzw. Referenzprobe. Bei diesem Patienten handelt es sich um eine Person, die sexuellen Kontakt zu einem HBV-Risikopatienten hatte und deshalb untersucht wurde. Die diagnostische

Untersuchung ergab, dass es sich um einen hoch virämischen, immuntoleranten (HBeAg⁺) HBV-Träger handelte (Tabelle 3-6), der bei der Direktsequenzierung des HBsAg ein Gemisch aus HBV Genotyp A und G aufwies. Der „Genotyp-Hemmtest“ ergab, dass das vorhandene anti-HBs mit Genotyp D gehemmt werden konnte, mit Genotyp A war keine Hemmung möglich.

Tabelle 3-6 Serologische Marker des Patienten K301; n.b: nicht bestimmt; pos: positiv; (+): schwach positiv; (++): positiv; (+++): stark positiv.

ID-Nr.	HBsAg (kPEIU/ml)	HBsAg (S/N)	anti-HBs (S/CO)	anti- HBc (S/CO)	HBeAg (PEIU/ml)	anti- HBe (S/CO)	HBV- DNA (GE/ml)
K301	51	pos (+++)	225 (AxSym)	n.b	pos (++)	n.b	1,5x10 ⁹

3.2.4.2 Sequenzanalyse (Referenzprobe)

Von der Klonierung des LHBS wurden insgesamt 31 Klone sequenziert und bei 16 Klonen insgesamt 26 Mutationen festgestellt (Tabelle 3-7). Bei den Klonen trat nur Genotyp A2 auf, Genotyp G konnte nicht nachgewiesen werden. Auf nt-Ebene konnten insgesamt 97 Austausche (gegenüber der sieben Genotyp A-Referenzgenome, 2.1.7) festgestellt werden, von denen mehr als zwei Drittel (69 Substitutionen) keine Auswirkung auf die AS-Sequenz haben (synonyme Austausche). Die restlichen 28 nt-Substitutionen sind nicht-synonym. Auf AS-Ebene konnten in der präS1-Domäne elf Mutationen bei acht unterschiedlichen Klonen detektiert werden, die präS2-Domäne weist nur zwei Austausche auf. Im SHBs befinden sich in den 31 Klonen insgesamt zwölf Mutationen, davon sind vier in der HBsAg-Schleife lokalisiert und von diesen, zwei in der *a*-Determinante (sN131D: 1 Klon, sC139R: 2 Klone). Allerdings kam diese Mutation nur in zwei der 31 Klone vor. Insgesamt fällt auf, dass bei diesem Patienten, verglichen mit den folgenden Fällen, nur wenige Mutationen auftreten. Die serologischen Marker

(hoch virämisch, HBeAg⁺) lassen auf eine Immuntoleranz des Patienten schließen, wodurch die geringe Variabilität des Virus zu erklären wäre, die für die gesamte LHBs-Sequenz bei 0,21 % liegt. Dieser Wert wurde als Vergleichswert bei den nachfolgenden Berechnungen der anderen Patienten (Tabelle 3-27) hinzugezogen. Für den präS1-Bereich ergibt sich eine leicht höhere Variabilität von 0,3 %, für die HBsAg-Schleife liegt sie bei 0,23 %.

Tabelle 3-7 Übersicht der Mutationen in 31 untersuchten Klonen von Patient K301; orange: in mehreren Klonen vorkommend; schwarz: Einzelmutation; in Klammern: Bezeichnung des Klons.

präS1/ präS2-Domäne (Klonnummer)	SHBs ohne HBsAg-Schleife (Klonnummer)	HBsAg – Schleife AS 100-170 (Klonnummer)
präS1 prM12T (C13)	sF20S (C21)	sT114A (M16)
prL16P (C6)	sS34L (C9)	sN131D (C22)
prS17P (A3)	sS64P (C6)	sC139R (C7, C8)
prP19S (C5)	sM75T (A3)	sA166T (M16)
prF34S (C15)	sR78Q (M9)	
prN39S (A3)	sI86V (C14)	
prD50H (C4)	sS171Y (C27)	
prQ57R (C21)	sS187F (C9)	
prI84T (C13)		
prS89L (M9)		
prD114E (C6)		
präS2 prA130G (C17)		
prT168I (C27)	Klone: 31, Substitutionen: 26	

Bei der Untersuchung des Polymerase-Leserahmens konnten insgesamt zehn Substitutionen festgestellt werden (Tabelle 3-8). Davon sind sieben Austausche mit dem S-ORF assoziiert, d.h. die Änderung auf Nukleotidebene hat sowohl eine Auswirkung auf den P-ORF als auch auf den überlappenden Leserahmen der

Oberflächenproteine. Die Variabilität im Bereich der analysierten Pol-Sequenz beträgt 0,14 % und liegt damit noch unter der des LHBs (0,21 %) (Tabelle 3-27). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei diesem Patienten die Variabilität innerhalb der untersuchten Sequenzen des HBsAg und der Polymerase nur in sehr geringem Umfang schwankt und keine Mutante selektiert wurde.

Tabelle 3-8 Mutationen im P-ORF und die korrespondierende Assoziation mit dem S-ORF bei Patient K301; fette Schrift: Mutation mit Auswirkung auf S-ORF; orange: in mehreren Klonen vorkommend; schwarz: Einzelmutteration; in Klammern: Bezeichnung des Klons.

P-ORF (Klonnummer)	Assoziiert mit S-ORF
rtL72P (C6)	sS64P
rtH94R (C14)	sI86V
rtS117F (C4)	
rtN122S (M16)	sT114A
rtQ139R (C22)	sN131D
rtL144F (A3)	
rtL146P (C7,C8)	sC139R
rtI162V (C4)	
rtG174D (M16)	sA166T
Klone: 31, Substitutionen: 10	

3.2.4.3 Tödliche HBV-Infektion nach Bluttransfusion (Fall A)

Fall A wurde in Dänemark identifiziert, nachdem eine 60-jährige Patientin (K443) mit einer Autoimmunhepatitis nach Transfusion von 33 Blutspenden sechs Monate später an akutem Leberversagen verstarb. Die Patientin war vor der Transfusion in regelmäßigen Abständen auf alle serologischen HBV-Marker negativ getestet worden. Nach der Transfusion wurde bei der Untersuchung der serologischen Marker eine HBV-Infektion als Ursache des Leberversagens diagnostiziert und der Fall retrospektiv betrachtet. Der Spender einer der Blutkonserven (K444) stammte aus einem hoch endemischen Gebiet und wurde anti-HBc positiv und anti-HBs negativ getestet (Tabelle 3-9). Das HBsAg war beim Spender mit mehreren Testkits negativ, bei der Patientin war ein Test negativ, aber vier weitere positiv. Die Blutspenden waren nicht auf HBV-DNA untersucht worden.

Tabelle 3-9 Übersicht der serologischen Marker im Fall A; K444 Blutspender; K443 Blutempfängerin; neg: negativ; n.b: nicht bestimmt; pos: positiv; (+): schwach positiv; (++): positiv; (+++): stark positiv.

ID-Nr.	HBsAg (S/N)	anti-HBs (S/CO)	anti-HBc (S/CO)	HBeAg (PEIU/ml)	anti-HBe (S/CO)	HBV-DNA (GE/ml)
K444 Spender	neg (Murex) neg (AxSym) neg (Prism) neg (Ortho) neg (Dade)	neg	pos (+++) (AxSym)	neg	neg	240
K443 Empfängerin	neg (Ortho) pos+++ (Murex) pos+++ (AxSym) pos+++ (Prism) pos+++ (Dade)	neg	pos (+)	pos (+)	pos (++)	17.000

3.2.4.4 Sequenzanalyse (Fall A)

Von dem Blutspender (K444) wurden zwölf Klone sequenziert, von der korrespondierenden Empfängerin (K443) konnten neun Klone analysiert werden. In Tabelle 3-10 sind die Mutationen im Bereich des HBsAg (präS1, präS2 und SHBs mit HBsAg-Schleife) aufgelistet, die in den untersuchten Klonen detektiert werden konnten. Auf nt-Ebene konnten beim Spender 290 Austausche (2,07 %) detektiert werden, von denen 102 Substitutionen (0,73 %) stille Mutationen darstellen. Die Empfängerin wies 221 nt-Austausche auf (2,10 %), von denen 66 (0,63 %) stille Austausche sind. Durch die hohe Übereinstimmung der in allen Klonen auftretenden Mutationen bei Spender und Empfängerin konnte die Übertragung vom Spender auf die Patientin bestätigt werden. Während in der präS1 und präS2-Domäne nur wenige Mutationen bei beiden Patienten auftreten (prD16F, prN87T, prR156K), ist in der S-Domäne eine Häufung von Mutationen erkennbar. Neben den vier Mutationen im S-Gen (außerhalb der HBsAg-Schleife) die bei beiden Patienten vorkommen (sF8L, sY206H, sP211L, sF220L), besitzt der Spender noch sechs weitere Austausche und eine Stop-Mutation. Die Empfängerin besitzt sogar zwölf zusätzliche Substitutionen und eine Stop-Mutation. Betrachtet man die HBsAg-Schleife, fällt dort das *Cluster* von Mutationen innerhalb der α -Determinante auf (sP142L, sS143L, sD144E, sG145K) mit der klassischen *escape*-Mutante an Position 145. In diesem Fall wurde allerdings das Glycin gegen Lysin und nicht gegen Arginin ausgetauscht. Eine weitere in 90 % der Klone auftretende Mutation (sQ101H) ist nur in der Empfängerin zu finden.

Zusammenfassend lassen sich auf AS-Ebene beim Spender insgesamt 167 Mutationen innerhalb der zwölf Klone detektieren, bei der Empfängerin sind es 147 Mutationen in neun Klonen. Das entspricht einer Variation des gesamten LHBs-Leserahmen von 3,58 % beim Spender (K444) und 4,20 % bei der Empfängerin (K443) und liegt somit 17-20 Mal höher als beim der Referenzpatienten K301 (0,21 %). Betrachtet man nur die HBsAg-Schleife so liegen die Werte für die Variation sogar bei 8,69 % (K444) bzw. 10,16 % (K443) (Tabelle 3-27). Im Vergleich zu K301 (0,23 %) ist hier also die Variabilität um 37 bzw. 44 Mal höher.

Tabelle 3-10 Mutationen im Bereich des HBsAg beim Blutspender (K444; 12 Klone) und der Empfängerin (K443; 9 Klone); blau: in 100% der Klone vorkommend, grün: in > 80 % der Klone vorkommend; schwarz: Einzelmutteration; rot: Stop-Mutante; in Klammern: Bezeichnung des Klons.

Bereich	Übereinstimmende Mutationen	Zusätzliche Mutationen	
	Blutspender und Empfängerin	Blutspender	Empfängerin
präS1	prD16E	prF23S (M7)	prV47E (D1)
	prN87T	prA28T (E10)	prT57I (M7)
		prQ89stop (M11)	prP68S (D1)
			prL74P (D8)
präS2	prR156K	prF116L (E10)	prD122E (M8)
		prV140G (C5)	prS135P (D33)
			prG138R (D8)
			prT139S (M8)
SHBs ohne HBsAg-Schleife	sF8L	sI4T (M2)	sT23A (M15)
	sY206H	sS34P (C5)	sQ30H (M8)
	sP211L	sG43R (M17)	sS34L (D8)
	sF220L	sL176I (E19)	sW35stop (M8)
		sV190D (E19)	sV47M (M10)
		sW196R (E19)	sC48R (M10)
		sL216stop (E19)	sQ51L (M8)
			sQ54H (M8)
			sS55P (M8)
			sS58F (D16)
			sC76Y (M10)
			sI81T (M17)
		sL173R (M15)	
HBsAg-Schleife AS 100-170	sP142L	sL104stop (E19)	sQ101H (außer D8)
	sS143L	sG112stop (E19)	sC149Y (M17)
	sD144E	sS114stop (E19)	sA157V (D8)
	sG145K	sN146K (E19)	
	sI150T		
	sF158L		

Im P-ORF konnten sechs unterschiedliche Mutationen festgestellt werden, die sowohl beim Spender als auch der Empfängerin in 100 % der Klone vorkommen (Tabelle 3-11). Davon sind drei mit dem S-ORF assoziiert (fett gedruckt). Daneben treten beim Spender (K444) noch 19 zusätzliche, bei der Empfängerin (K443) sechs zusätzliche Mutationen auf, davon sind neun (K444) bzw. fünf (K443) mit dem S-ORF assoziiert (fett gedruckt). Das entspricht einer Variation des P-ORFs von 3,53 % beim Spender und 2,75 % bei der Empfängerin (Tabelle 3-27).

Tabelle 3-11 Mutationen im P-ORF und assoziierte Mutationen im SHBs (fett gedruckt) von K444 und K443; blau: in 100% der Klone vorkommend, grün: in > 80 % der Klone vorkommend; orange: in mehreren Klone vorkommend; schwarz: Einzelmutteration; rot: Stop-Mutante; in Klammern: Bezeichnung des Klons.

K444 + K443		Blutspender (K444)		Empfänger (K443)	
P-ORF	SHBs	P-ORF	SHBs	P-ORF	SHBs
rtI16T	sF8L	rtV27I (E12,19,24,M6,11)		rtD31G (M15)	sT23A
rtR153K	sG145K	rtH35Y (M16)		rtE39stop (M8)	sQ30H
rtI187L		rtL42P (C5)	sS34P	rtV44M (M8)	
rtV190M		rtR51K (M17)	sG43R	rtR55H (M10)	sV47M
rtV214A	sY206H	rtL101F (E19)		rtV56A (M10)	sC48R
rtL229M		rtS105T (E12,19,24,M6,11)		rtV63S (M8)	sS55P
		rtV112A (M7)			
		rtR120M (E19)	sG112stop		
		rtF122L (E19)	sS114stop		
		rtT128P (E19)			
		rtL132M (E19)			
		rtL155M (E19)	sN146K		
		rtT184N (E19)	sL176I		
		rtC198R (E22) rtC198stop (E19)	sV190D		
		rtM204K (E19)	sW196R		
		rtS219P (M11)			
		rtV224A (E10)			
		rtL228P (M2)			

3.2.4.5 Okkult infizierter Blutspender, zehn Monate Verlaufsbeobachtung (Fall B)

Bei Fall B handelt es sich um einen Blutspender, der in den regulären HBsAg *Screening*-Tests stets negativ getestet wurde und über einen langen Zeitraum Blut spendete. Nachdem im Jahre 2006 bei Blutspenden jedoch das *Screening* eines zusätzlichen serologischen Markers (anti-HBc) eingeführt wurde [Burger und Offergeld, 2005], wurde er als sogenannter „*anti-HBc-only*“ positiver Blutspender rückwirkend identifiziert. Von diesem Spender standen fünf zeitlich aufeinander folgende Plasmaspenden (ID384-ID389) zur Verfügung, in denen nur sehr geringe Mengen an HBV-DNA nachgewiesen werden konnten (Tabelle 3-12). Das Rückverfolgungsverfahren ergab, dass fünf von 13 Rezipienten von Erythrozyten-Konzentraten anti-HBc positiv waren, allerdings gab es keine HBV-spezifische Patientendaten, die vor der Transfusion protokolliert wurden. Fälle von Hepatitis wurden nicht beschrieben. Die Empfänger von gefrorenem Frischplasma dieses Spenders waren **alle** (elf Rezipienten) anti-HBc positiv.

Tabelle 3-12 Serologische Marker des Patienten aus Fall B zu unterschiedlichen Zeitpunkten (ID384: Jan.2005; 389: Mrz.2005; ID385: Mai 2005; ID386 Aug.2005; ID387: Okt.2005); neg: negativ; n.b: nicht bestimmt; (++): positiv.

ID-Nr.	Abnahme- datum	HBsAg (S/N)	anti- HBs (S/CO)	anti-HBc (S/CO)	HBeAg (PEIU/ml)	anti- HBe (S/CO)	HBV- DNA (GE/ml)
ID384	01/2005	neg	neg	pos (++)	n.b	n.b	20
ID389	03/2005	neg	neg	pos (++)	n.b	n.b	9
ID385	05/2005	neg	neg	pos (++)	n.b	n.b	+, <50
ID386	08/2005	neg	neg	pos (++)	n.b	n.b	59
ID387	10/2005	neg	neg	pos (++)	n.b	n.b	25

3.2.4.6 Sequenzanalyse (Fall B)

Von diesem Patienten standen fünf aufeinander folgende Plasmaspenden (ID384-ID389) zur Verfügung. Die HBV-DNA, in den fünf innerhalb von zehn Monaten gespendeten Proben, wurde sowohl direkt sequenziert als auch kloniert, um einen besseren Überblick von der Vielfalt der Quasispezies zu erhalten. Insgesamt wurden zwischen sieben und zwölf Klone der jeweiligen Klonierungen untersucht. Leider war eine Amplifikation des kompletten präS/S Bereichs von Probe ID385 nicht möglich, so dass eine Sequenzanalyse der Klone erst ab Position 76 des SHBs möglich war. In der präS1-Sequenz treten zwei Mutationen (prD27A, prI91N) auf, die sowohl in allen fünf Direktsequenzen als auch in 100 % der Klone aller fünf Klonierungen vorkommen (Tabelle 3-13). Zusätzlich ist eine Deletionsmutante (prK10del) in den Direktsequenzen zu finden, die sich in den klonierten Proben nicht detektieren ließ. Eine weitere Mutation (prQ104K), die zu einem früheren Zeitpunkt noch nicht zu erkennen ist, tritt erst in der letzten Probe ID387 auf. Innerhalb der präS2-Domäne ist die Mutation prT173K in allen untersuchten Sequenzen vorherrschend. Ein weiterer Austausch (prR135K) ist nur in der zweiten Probe (ID389) nachweisbar, dort allerdings in 100 % der sieben untersuchten Klone (Tabelle 3-13). Daneben treten noch eine Reihe von Einzelmutationen innerhalb der präS1/präS2 Domäne der untersuchten Klone auf (Tabelle 3-15). Bei Betrachtung der S-Domäne sind eine Vielzahl von Mutationen erkennbar (Tabelle 3-14). Zehn der dort 23 auftretenden Mutationen dominieren sowohl in den Direktsequenzen als auch in den insgesamt 47 untersuchten Klonen (sN3I, sV14A, sI68T, sM103I, sL109H, sP120Q, sS132F, sT143S, sV209G, sP217L). Dagegen treten einige Mutationen im zeitlichen Verlauf der Probennahme auf wie z.B. sG10R, sS117G und sT118P, die nur in der letzten Abnahme ID387 erkennbar sind. Ein anderes Beispiel ist die Mutation sG112V, welche in der Direktsequenz in der dritten (ID385) bis zur fünften Probe (ID389) nachweisbar ist. In den Klonen tritt diese Mutation nur transient auf. Sie ist in der zweiten (ID389) und fünften Probe (ID389) detektierbar, allerdings nicht in der dritten (ID385) und vierten (ID386) Probe.

Tabelle 3-13 Austausch im präS1/präS2 Bereich bei Direktsequenzen und Klonierungen von Patient ID384-D389;
blau: in 100% der Klone vorkommend, grün: in > 80 % der Klone vorkommend, türkis: neu auftretende Mutation
violett: Deletionsmutante.

Bereich	ID384		ID389		ID385		ID386		ID387	
	Direkt-Sequenz	Klonierung								
präS1	prK10del	/	prK10del	/	prK10del		prK10del	/	prK10del	/
	prD27A	prD27A	prD27A	prD27A	prD27A	keine	prD27A	prD27A	prD27A	prD27A
	prI91N	prI91N	prI91N	prI91N	prI91N	Sequenz	prI91N	prI91N	prI91N	prI91N
	/	/	/	/	/	vorhanden	/	/	prQ104K	prQ104K
präS2	/	/	/	prR135K	/		/	/	/	/
	prT173K	prT173K	prT173K	prT173K	prT173K		prT173K	prT173K	prT173K	prT173K

Tabelle 3-14 Übersicht über Mutationen im SHBs von ID384-ID389; blau: in 100% der Klone vorkommend, grün: in > 80 % der Klone vorkommend; schwarz: Einzelmutation; türkis mit *: neu auftretende Mutation, schwach vorhanden; Querstrich: diese Mutation in dieser Klonierung nicht vorkommend, in Klammern: Bezeichnung des Klons.

ID384		ID389		ID385		ID386		ID387	
Direkt-Sequenz	Klonierung								
sN3I	sN3I								
/	/	/	/	/	keine	/	/	sG10R*	sG10R/K
sV14A	sV14A	sV14A	sV14A	sV14A	Sequenz	sV14A	sV14A	sV14A	sV14A
sR24K	sR24K	sR24K	/	sR24K	vorhanden	/	sR24K	/	/
/	sG44E	/	/	/	/	/	/	/	/
/	sV47A	/	/	/	/	/	/	/	/
sI68T	sI68T	sI68T	sI68T	sI68T	/	sI68T	sI68T	sI68T	sI68T
/	/	/	/	/	sF80L	/	/	/	/
/	/	/	sY100S	/	/	/	/	/	/
sM103I	sM103I								
sL109H	sL109H								
/	/	/	sG112V	sG112V*	/	sG112V	/	sG112V	sG112V
/	/	/	/	/	/	/	/	sS117G*	sS117G
/	/	/	/	/	/	/	/	sT118P*	sT118P
sP120Q	sP120Q								
/	/	/	/	/	/	sA128V	/	/	sA128V (2)
sG130S	sG130S	sG130S	sG130S	sG130S	sG130S	/	sG130S	sG130N	sG130N
/	sN131K								
sS132F	sS132F								
sT143S	sT143S								
sV209G	sV209G								
/	sI213L	/	/	/	/	/	/	/	sI213T (10)
sP217L	sP217L								

Neben den gerade beschriebenen dominanten Mutationen, die in allen Klonen vorherrschen, konnte auch eine Reihe von Mutationen detektiert werden, die nur in einzelnen Klonen auftreten (Tabelle 3-15). Lediglich die Austausche an Position 5 (sT5A/I) und an Position 75 (sM75L/V) im SHBs sind in mehreren Klonen vertreten. Daneben sind in einigen Klonen Stop-Mutationen zu finden.

Tabelle 3-15 Zusätzlich auftretende Mutationen in den analysierten Klonen; schwarz: Einzelmutation; orange: in mehr als einem Klon vorkommend; rot: Stop-Mutation; in Klammern: Bezeichnung des Klons.

Bereich	ID384 Klonierung	ID389 Klonierung	ID 385 Klonierung	ID 386 Klonierung	ID 387 Klonierung
präS1	prS5P (5)	prS5P (3)		prP19S (7)	prF25L (10)
	prL67F (7)	prM12I (5)	keine	prF45L (7)	prF43stop (2)
	prS115R (1)	prR103G (9)	Sequenz	prW77R (9)	prS89P (2)
		prI108T (5)	vorhanden		prS101P (2)
				prP105A (4)	
präS2	prF127L (5)	prW122stop (8)		prF127S (6)	prI164V (11)
	prI157V (5)	prL139P (6)		prQ129R (1)	prR167G (10)
		prG169R (9)		prA158V (1)	
SHBs	sW35R (10)	sL84P (9)	sF85L (6)	sI4T (6)	sT5A (8,9,11,12) sT5I (10)
	sC76R (1)	sW172stop (7)	sS136A (10)	sP11L (3)	sW35stop (12)
	sI110V (5)	pG202R (8)	sI152V (12)	sN52D (3)	sI86V (7)
	sT116A (2)		sP153L (7) sP153S (9)	sM75L/V (2,5)	sT148A (11)
			sS154P(11)	sC76R (11)	sW156stop (8) sW156R (9)
			sQ181H (9)	sP111L (9)	sE164K (2)
				sK122R (10,12)	sW182R (10)
				sS136A (3)	sP211H (alle außer Klon2)
				sS193L (8)	
				sI218T (2)	

Um eine bessere Übersicht zu erlangen wurden alle Mutationen nochmals schematisch dargestellt (Abbildung 3-4). Da von ID385 nicht der komplette Bereich des LHBs kloniert werden konnte, wurde für die Übersichtszeichnung ein Teil der Direktsequenz dargestellt. Allgemein lässt sich sagen, dass im Bereich der präS1-Domäne nur relativ wenig Mutationen auftreten und dort die Variation innerhalb der klonierten Proben zwischen 1,89 % (ID386) und 2,86 % (ID389) schwankt. Damit liegen die Werte dennoch 6-10 Mal höher als bei der Kontrollprobe K301. Innerhalb des SHBs, insbesondere der antigenen Schleife, treten bei dem okkult Infizierten vermehrt Mutationen auf. In der HBsAg-Schleife variiert die Sequenz innerhalb der Abnahmen zwischen 10,29 % (ID384) und 14,43 % (ID387) und weist damit eine 45-63 Mal höhere Variabilität auf als die Referenzprobe (0,23 %).

Auch bei diesem Fall wurde der P-ORF analysiert und die auftretenden Mutationen dargestellt (Tabelle 3-16). Insgesamt treten in den fünf untersuchten Proben elf Mutationen auf, die dominant in allen Klonen der jeweiligen Klonierung vorherrschen (rtD7E/K, rtE11D, rtV23I, rtL108F, rtV112H, rtN118H, rtR120S, rtR138K, rtL140I, rtY151F und rtY221F). Alle diese Substitutionen sind mit dem S-ORF assoziiert. Daneben sind in den jeweiligen Klonierungen noch zahlreiche Einzelmutationen vorhanden. Auch hier sind einige mit dem überlappenden Leserahmen des HBsAg assoziiert und in fett gedruckt. Insgesamt liegt die Variation des untersuchten P-ORFs zwischen 3,67 % (ID386) und 4,83 % (ID389) und damit 26-35 Mal höher als bei der Kontrollprobe von Patient K301 (Tabelle 3-27).

Die Untersuchung der synonymen und nicht-synonymen Mutationen ergab, dass insgesamt zwischen 1,99 % (ID386) und 2,40 % (ID387) der Nukleotide ausgetauscht sind. Davon sind 0,30 % (ID385) bis 0,48 % (ID384) stumme Mutationen, während 1,63 % (ID386) bis 2,07 % (ID385) eine Auswirkung auf die Aminosäure-Sequenz haben (Tabelle 3-26).

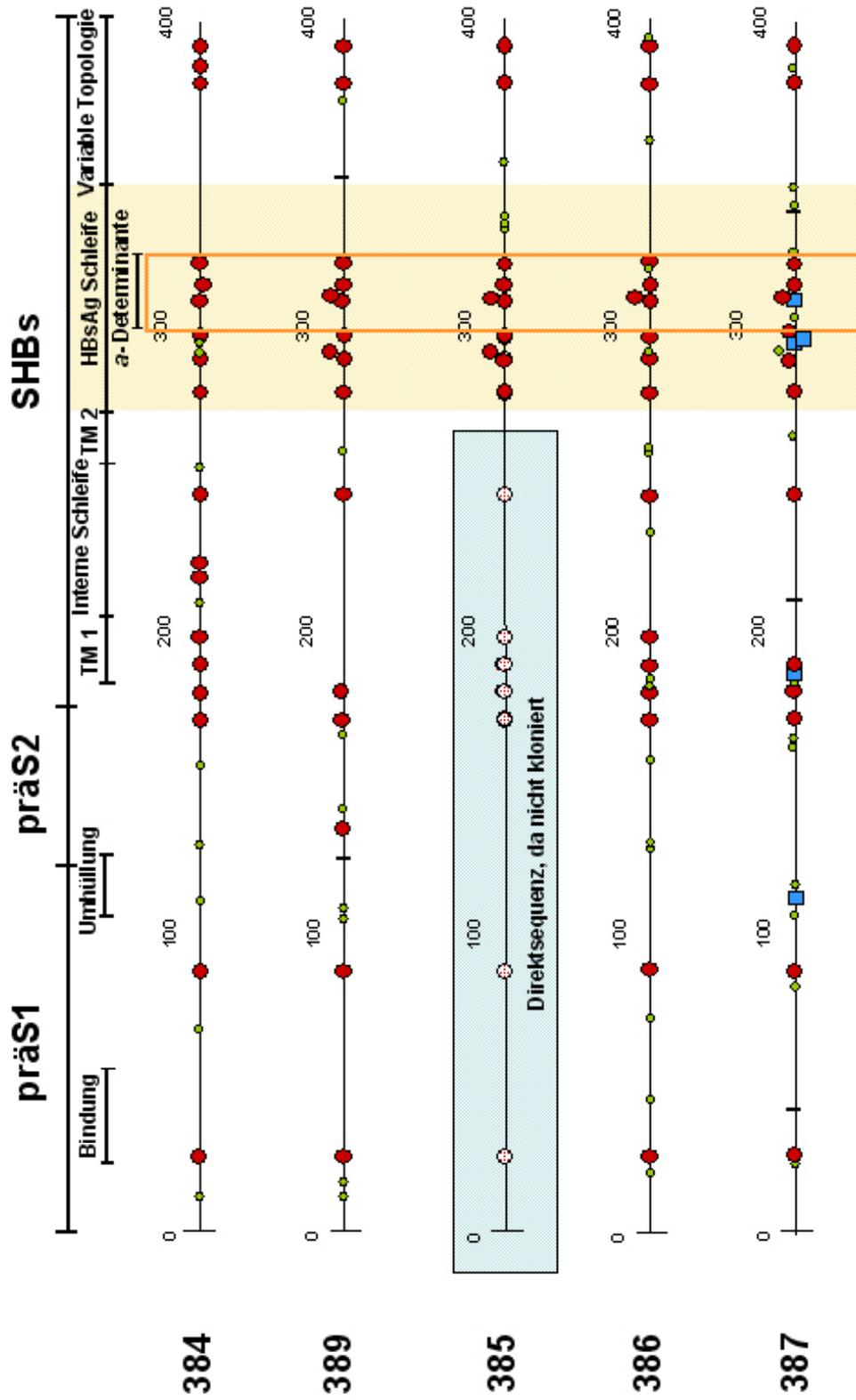


Abbildung 3-4 Übersicht über Mutationen im LHBs der Klone und einem Stück der Direktsequenz von Patient ID384-389; rote Kreise: in 100% der Klone vorkommend; blaue Quadrate: in > 80 % der Klone vorkommend; grüne Kreise: Einzelmutationen; schwarze Rechtecke: einzelne Stop-Mutation.

Tabelle 3-16 Übersicht über Mutationen im P-ORF von ID384-ID389 und Assoziation mit S-ORF; blau: in 100 % der Klone vorkommend, grün: in > 80 % der Klone vorkommend; schwarz: Einzelmutteration; rot: Stop-Mutation, türkis: neu auftretende Mutation; Querstrich: diese Mutation in dieser Klonierung nicht vorkommend, in Klammern: Klonnummer.

P-ORF												S-ORF					
ID384				ID389				ID385				ID386				ID387	
Direkt-Sequenz	Klone	Direkt-Sequenz	Klone	Direkt-Sequenz	Klone	Direkt-Sequenz	Klone	Direkt-Sequenz	Klone	Direkt-Sequenz	Klone	Direkt-Sequenz	Klone	Direkt-Sequenz	Klone	Direkt-Sequenz	Klone
rtD7E	rtD7E	rtD7E	rtD7E	rtD7E	keine	rtD7E	rtD7E	rtD7E	rtD7E	rtD7E	rtD7E	rtD7E	rtD7E	rtD7E	rtD7E/K		
rtE11D	rtE11D	rtE11D	rtE11D	rtE11D	Sequenz	rtE11D	rtE11D	rtE11D	rtE11D	rtE11D	rtE11D	rtE11D	rtE11D	rtE11D	rtE11D	sN31	
/	/	/	/	/	vorhanden	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/		
/	/	/	rtL108F	/		/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	sY100S	
rtV112I	rtV112I	rtV112I	rtV112I	rtV112I	rtV112I	rtV112I	rtV112I	rtV112I	rtV112I	rtV112I	rtV112I	rtV112I	rtV112I	rtV112I	rtV112I		
rtN118H	rtN118H	rtN118H	rtN118H	rtN118H	rtN118H	rtN118H	rtN118H	rtN118H	rtN118H	rtN118H	rtN118H	rtN118H	rtN118H	rtN118H	rtN118H		
/	/	/	rtR120S	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	rtR120S	sG112V	
rtR138K	rtR138K	rtR138K	rtR138K	rtR138K	rtR138K	rtR138K	rtR138K	rtR138K	rtR138K	rtR138K	rtR138K	rtR138K	rtR138K	rtR138K	rtR138K	sG130N	
/	rtL140I	/	rtL140I	/	rtL140I	/	rtL140I	/	rtL140I	/	rtL140I	/	rtL140I	/	rtL140I	sS132F	
rtY151F	rtY151F	rtY151F	rtY151F	rtY151F	rtY151F	rtY151F	rtY151F	rtY151F	rtY151F	rtY151F	rtY151F	rtY151F	rtY151F	rtY151F	rtY151F	sT143S	
/	rtY221F	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	sI213L	
Einzelmutterationen Klone		Einzelmutterationen Klone		Einzelmutterationen Klone		Einzelmutterationen Klone		Einzelmutterationen Klone		Einzelmutterationen Klone		Einzelmutterationen Klone		Einzelmutterationen Klone		Einzelmutterationen Klone	
P-ORF	S-ORF	P-ORF	S-ORF	P-ORF	S-ORF	P-ORF	S-ORF	P-ORF	S-ORF	P-ORF	S-ORF	P-ORF	S-ORF	P-ORF	S-ORF	P-ORF	S-ORF
rtV43A (10)	sw35R	rtW3stop (9)	/	rtL93P (6)	sF85L	rtL93P (6)	sF85L	rtS47P (8)		rtR18K	sG10R/K	rtH94R (7)	sI86V	rtQ125R	sS117G		
rtV84A (1)	sC76R	rtF178L (7)	/	rtN98L (9)	/	rtK60R (3)	sN52D	rtK60R (3)	sN52D	rtH94R (7)	sI86V	rtH94R (7)	sI86V	rtQ125R	sS117G		
rtS105P (4)	/	rtA181T (7)	sw172stop	rtQ130H(9)	/	rtD83A (2) rtD83G (5)	sM75L sM75V	rtD83A (2) rtD83G (5)	sM75L sM75V	rtQ125R	sS117G	rtQ125R	sS117G	rtQ125R	sS117G		
rtG107R (5)	/	rtS185G (8)	/	rtH160R(12)	sI152V	rtV84A (11)	sC76R	rtV84A (11)	sC76R	rtY126S	sT118P	rtY126S	sT118P	rtY126S	sT118P		
rtN124S (2)	sT116A	rtS202G (5)	/	rtP161L (9)	/	rtS116P(11)	/	rtS116P(11)	/	rtH156R(11)	sT148A	rtH156R(11)	sT148A	rtH156R(11)	sT148A		
rtM129V (5)	/	rtG210E (8)	sG202R	rtI162T (11)	sS154P	rtL144R (3)	sS136A	rtL144R (3)	sS136A	rtL164P (9)	sw156R	rtL164P (9)	sw156R	rtL164P (9)	sw156R		
rtS176C (2)	/	rtE218K (5)	/	rtS189P (4)	/	rtG165S (8)	sw156stop	rtS189P (4)	/	rtG165S (8)	sw156stop	rtG165S (8)	sw156stop	rtG165S (8)	sw156stop		
/	/	/	/	rtV190L (9)	sQ181H	rtG172E (2)	sE164K	rtV190L (9)	sQ181H	rtG172E (2)	sE164K	rtG172E (2)	sE164K	rtG172E (2)	sE164K		
/	/	/	/	rtS230P (4)	/	rtV190A(10)	sw182R	rtS230P (4)	/	rtV190A(10)	sw182R	rtV190A(10)	sw182R	rtV190A(10)	sw182R		
/	/	/	/	/	/	rtF200L(11)	/	/	/	rtF200L(11)	/	rtF200L(11)	/	rtF200L(11)	/		

siehe jeweilige Abnahme (links)

3.2.4.7 Blutspender mit mutiertem HBsAg und anti-HBs (Fall C)

Bei Fall C handelt sich um eine pseudo-okkulte HBV-Infektion, da die Blutspenderin nur im ersten *Screen* (ORTHO) als HBsAg negativ getestet wurde. Nach Zugabe des Plasmas in einen Probenpool für die Fraktionierung wurde dieser erneut mit weiteren Testsystemen für HBsAg (Murex, Prism, AxSym, ABBOTT) untersucht und als hoch positiv befunden (Tabelle 3-17). Das vorgeschriebene Rückverfolgungsverfahren gab Aufschluss darüber, dass das erste Testergebnis des Donors als falsch-negativ bewertet wurde. Bei der Spenderin handelte es sich um einen asymptomatischen HBV-Träger, mit sehr geringer Viruslast und geringen Mengen an anti-HBs. Untersuchungen innerhalb der Empfängergruppe zeigten, dass von den vier Rezipienten einer sowohl anti-HBc als auch anti-HBs positiv war, während die anderen drei Empfänger nicht infiziert wurden. Insgesamt standen von dieser Patientin zwei Seren mit unterschiedlichen Abnahmedaten zur Verfügung. Neben dem hier klonierten Patientenserum K442, wurde bei einem zweiten Serum (K342), das ca. ein Jahr früher abgenommen wurde, eine Direktsequenzierung durchgeführt.

Tabelle 3-17 Übersicht der serologischen Marker der Blutspenderin K442 (Fall C); neg: negativ; pos: positiv, das HBsAg wurde mit verschiedenen ELISA-Testsystemen gemessen: Ortho und Ortho Vitros Abbott Murex, Abbott Prism, Abbott AxSym, Dade Behring, Biomerieux Vidas, Roche Elecsys.

ID-Nr.	Abnahmedatum	HBsAg (kPEIU/ml)	HBsAg (S/N)	anti-HBs (U/l)	anti-HBc (S/CO)	HBeAg (PEIU/ml)	anti-HBe (S/CO)	HBV-DNA (GE/ml)
K442	10/2004	4,5	neg (Ortho) neg (Vitros Ortho) pos (Murex) pos (Prism) pos (AxSym) pos (Dade) neg (Vidas) pos (Elecsys)	20-40 (Ortho)	0,02 (Ortho)	neg (Ortho)	16 (Ortho)	18

Zur Bestätigung des HBsAg wurden beide Serumproben (K342, K442) mittels Laurell-Elektrophorese getestet (Abbildung 3-5). In den oberen drei Vertiefungen wurde ein bekanntes Standardserum (KG) in drei unterschiedlichen Konzentrationen aufgetragen (1, 5, 10 µg/ml). In den beiden unteren Vertiefungen wurden die zu untersuchende Patientenserum K342 und K442 pipettiert. Als Antiserum wurde ein bekanntes Serum („Göttinger Serum“) verwendet. Es ist erkennbar, dass beide Patientenserum (K442 und K342) im Gegensatz zum Standardserum KG eher diffuse Präzipitations-Spitzen ausbilden. Das könnte auf die veränderten Epitope zurückzuführen sein, aber dennoch ist das Signal als eindeutig positiv zu bewerten.

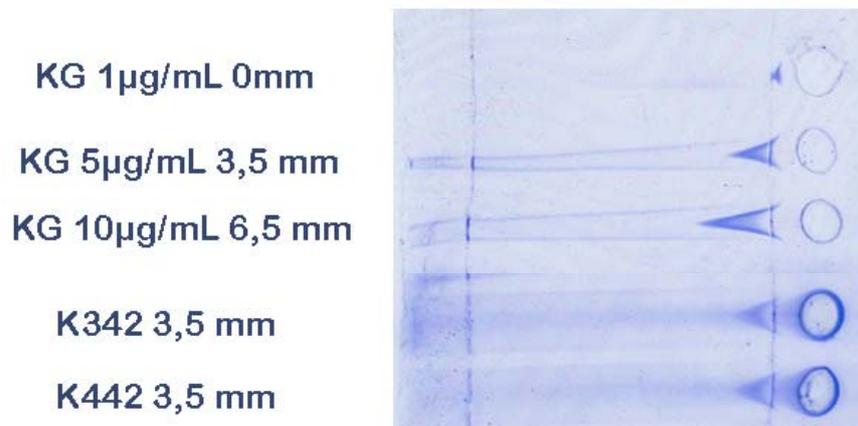


Abbildung 3-5 Laurell-Elektrophorese zum Nachweis des HBsAg in den Patientenserum K342 und K442; In den oberen drei Gel-Ausstanzungen wurde das Standardserum KG in den Konzentrationen 1 µg/ml, 5 µg/ml und 10 µg/ml aufgetragen, darunter die beiden Serumproben des Patienten (K342: Abnahme: 2003, K442: Abnahme: 10/2004). Als Antiserum wurde „Göttinger Serum“ verwendet; die Präzipitations-Linien der beiden Patientenserum sind eindeutig positiv (3,5 mm).

3.2.4.8 Sequenzanalyse (Fall C)

Von dieser Blutspenderin wurde zum einen die Direktsequenz des Serums K342, zum anderen die 19 Klone der Klonierung des Serums K442 analysiert. Die Direktsequenzierung der ersten Probe K342 zeigte folgende Mutationen: prF45L, prL67F, prI74V, sL109V, sP127T, sM133T, sD144G/D und eine Insertion in der S-Domäne an Position 116 (sT116+T). Diese Mutationen sind auch in den Klonen

der Probe K442 erkennbar, wobei dort noch eine Vielzahl zusätzlicher Mutationen auftritt (Tabelle 3-18).

Tabelle 3-18 Übersicht der Mutationen in 19 untersuchten Klonen von Patient K442; blau: in 100 % der Klone vorkommend, grün: in > 80% der Klone vorkommend; orange: in mehreren Klonen vorkommend; schwarz: Einzelmutteration; rot: Stop-Mutation; violett: Insertionsmutante; in Klammern: Bezeichnung des Klons; fett gedruckt: Mutationen die auch in der Direktsequenzierung von K342 auftreten.

präS1/ präS2-Domäne (Klonnummer)	SHBs ohne HBsAg-Schleife (Klonnummer)	HBsAg-Schleife AS 100-170 (Klonnummer)
präS1	sM1R (2,4,5,6,8,14,19,26,28,29)	sM103T (10)
	sM1L (7,9,25)	S109V
prF25L (11,27,29)	sM1G (11)	sL109Q (27)
prF45L (14,17,18,30)	sM1K (18)	sT116+T (27)
	sL12Q (10,26)	sP120L (7,9)
	sT27A (4)	sC121Y(4,5,11,17,19,29)
		sC121G (18, 30)
prW52R (28)	sS34P (11)	sP127T (alle außer 27,30)
prL67F	sW36L (17,18)	sQ129stop (5)
prI74V	sS38P (25)	sG130D (6,14,26,28)
prI91N (4,26,28)	sN40S (17,18)	sM133T
prN98I (27,29,30)	sG44E(4,5,6,7,9,10,11,19,25,27,30)	sS136P (25)
prQ104K (5,10,27,29,30)	sS45P (alle außer 17,18)	sT143A (28)
	sS45A (17)	
präS2	sV47M (2)	sD144G (27)
	sS55P (7,9)	sN146D (28)
	sI86T (6)	sC147R (26)
prM120V (19)	sW172stop (11)	sS155P (18)
prA158T (18)	sW182L (außer 17,18)	sE164G (27)
prS162T (26)	sL186P (17)	
prT173K (alle außer 17,18)	sP188H (5)	
	sT189I (außer 27)	
	sV190A	
	sS210R	
	sP214L (6,10)	

Zusätzlich gibt es Austausche wie z.B. sL12Q oder sT27A, die nur in einzelnen Klonen zu finden sind. Des Weiteren konnten Austausche detektiert werden, die dominant in der Mehrheit der Klone auftreten (sG44E in 11/19 Klone) oder sS45P bzw. sS45A in 18 von 19 Klone.

Bei Betrachtung der HBsAg-Schleife konnte ebenfalls eine hohe Variabilität festgestellt werden. Während bei der ersten Abnahme (K342) nur die Mutationen sL109V, sT116+T, sP127T, sM133T und sD144G/D auftreten (nicht dargestellt), sind in der Probe K442, die ein Jahr später abgenommen wurde, eine Reihe zusätzlicher Mutationen nachweisbar (Abbildung 3-7).

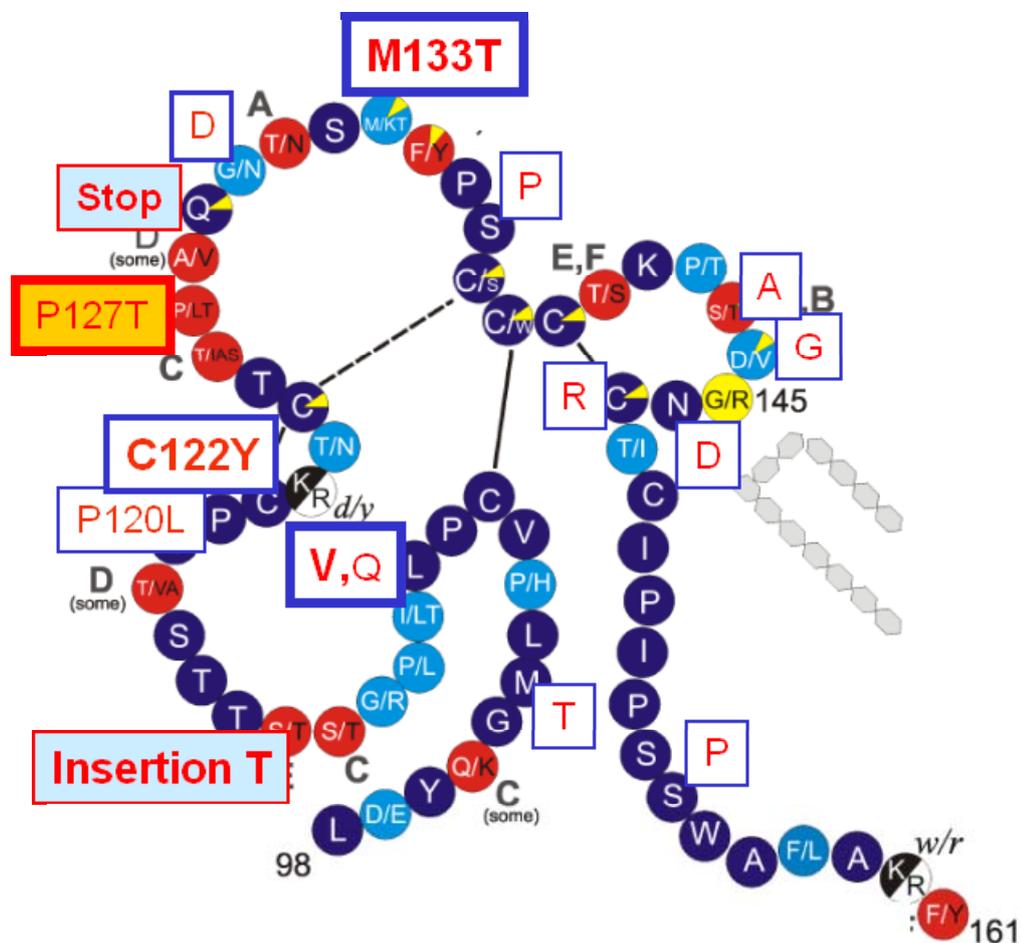


Abbildung 3-7 Detektierte Substitutionen bei Blutspenderin K442 innerhalb der HBsAg-Schleife (AS 100-170) und der a-Determinante (AS 121-147); Rahmendicke spiegelt die relative Häufigkeit der Mutation wider; farbig unterlegte Kästchen: besondere Mutation (s.Text).

[modifiziert nach Schaefer, 2001]

In den 19 Klonen von K442 treten Einzelaustausche über die ganze Schleife verteilt auf (sM103, sS155P, sE164G) und innerhalb der α -Determinante (sS136P, sT143A, sD144G, sN146D, sC147R). Daneben sind einige Mutationen dominant in fast allen Klonen vertreten (sV109L/Q), von denen sich ebenfalls einige im Bereich der α -Determinante befinden (sC121Y/G, sP127T, sM133T). Der Austausch an der Position 127 stellt eine Besonderheit dar, da diese Substitution mit einem Subtypwechsel von adw2 zu adw3 verbunden ist. Ein Klon besaß die bei der Direktsequenz K342 auftretende Insertion an Position 116 (sT116+T), bei einem anderen Klon befand sich eine Stop-Mutation an Position 129.

Auf nt-Ebene konnten insgesamt 313 Austausche (1,37 %) gezählt werden, davon sind 0,39 % (88 nt) stille Substitutionen und 0,99 % (225 nt) non-synonyme Mutationen (Tabelle 3-26).

Insgesamt konnten in den 19 Klonen 289 AS-Austausche detektiert werden, von denen sich 212 in der S-Domäne und die restlichen 77 in der präS1/präS2-Domäne befanden. In der HBsAg-Schleife wurden von den insgesamt 212 Austauschen der S-Domäne circa ein Drittel (77 Substitutionen) detektiert. Für die präS1-Domäne ergibt sich somit eine Variabilität von 2,52 % (Tabelle 3-27), während der Wert für die HBsAg-Schleife bei 5,79 % liegt. Verglichen mit der Referenzprobe K301 liegt hier also die Variation acht Mal (präS1) bzw. 25 Mal (HBsAg-Schleife) höher.

Die Untersuchung des überlappenden Bereichs des P-ORF konnte insgesamt 30 unterschiedliche Mutationen aufdecken, von denen die Mehrheit (22 Mutationen) mit dem S-ORF assoziiert sind (Tabelle 3-19). Berechnet auf die 19 Klone ergab sich hier eine Variabilität von 2,68 % (Tabelle 3-27).

Tabelle 3-19 Übersicht über Mutationen im P-ORF von K442; fett gedruckt: Assoziation mit S-ORF; blau: in 100 % der Klone vorkommend; grün: in > 80 % der Klone vorkommend; orange: in mehreren Klone vorkommend; schwarz: Einzelmutation; rot: Stopmutante; violett: Insertionsmutante; in Klammern: Bezeichnung des Klons.

P-ORF (Klonnummer)	Assoziierte Austausche mit S-ORF
rtW3R (28)	
rtD7E (alle außer 17,18)	pT173K (kurz vor Start des SHBs)
rtH9Q (2,4,5,6,8,14,18,19,26,27,28,29) rtH9P (7,9,25) rtH9R (11)	sM1R/L/G/K
rtV23I (19)	
rtH35R (4)	sT27A
rtL42P (11)	sS34P
rtF46S (25)	sS38P
rtI53T (alle außer 17,18) rtI53S (17)	sS45P sS45A
rtR55H (2)	sV47M
rtV63A (7,9)	sS55P
rtS117C (8,10)	
rtN123H (7,9,25)	
rtN124D (7,9)	
rtN124+N (27)	sT116+T
rtM129I (4,5,11,17,19,29) rtM129R (18,30)	sC121Y sC121G
rtS135Y (alle außer 27,30)	sP127T
rtS137L (5)	sQ129stop
rtV142I (5)	
rtL144P (25)	sS136P
rtY151C (28)	sT143A
rtK154R (28)	sN146D
rtL155S (26)	sC147R
rtV163A (18)	sS155P
rtA181T (11)	sW172stop (11)
rtR192C (4)	
rtS219A	sS210R

3.2.4.9 Okkult infizierter Blutspender (Fall D)

Dieser Blutspender (K724) fiel auf, da im AxSym (ABBOTT) kein HBsAg, aber geringe Mengen an HBV-DNA nachweisbar waren. IgG anti-HBc konnte detektiert werden, aber kein anti-HBs und IgM anti-HBc.

Tabelle 3-20 Serologische Marker des Patienten K724; neg: negativ.

ID-Nr.	HBsAg (S/N)	anti-HBs (S/CO)	anti-HBc (S/CO)	HBeAg (PEIU/ml)	anti-HBe (S/CO)	HBV-DNA (GE/ml)
K724	neg (AxSym)	neg (AxSym)	IgM: neg (AxSym) IgG: 0,4 (Prism)	neg	neg (AxSym)	310

3.2.4.10 Sequenzanalyse (Fall D)

Insgesamt wurden von dieser Probe zehn Klone analysiert. Auf nt-Ebene konnten 240 Substitutionen detektiert werden, davon sind 88 nicht-synonyme Mutationen, während 152 stumme Austausche sind. In der AS-Sequenz wurden von den 88 Mutationen in der präS1-Domäne neun Austausche detektiert, in der präS2-Domäne konnten insgesamt 18 Austausche nachgewiesen werden. Die S-Domäne enthält 61 Substitutionen in den zehn Klonen, von denen elf unterschiedliche Mutationen in der HBsAg-Schleife, und davon sechs innerhalb der *a*-Determinante lokalisiert sind (Tabelle 3-21).

Die Berechnung der Variabilität ergab, dass die präS1-Domäne um 0,65 % variiert, die HBsAg-Schleife um 4,43 % (Tabelle 3-27). Bezogen auf die Referenz K301 liegt hier also die Variation der präS1-Region nur doppelt so hoch, die der antigenen Schleife 20 Mal höher.

In der überlappenden RT-Domäne des P-ORFs konnten insgesamt 23 Substitutionen festgestellt werden, wovon elf mit dem S-ORF assoziiert sind (Tabelle 3-22). Es ergibt sich eine Variabilität von 2,52 % (Tabelle 3-27), die 18 Mal höher liegt als bei der Kontrolle K301.

Tabelle 3-21 Mutationen im S-ORF von zehn untersuchten Klonen des Patienten K724; grün: in > 80 % der Klone vorkommend; orange: in mehreren Klonen vorkommend; schwarz: Einzelmutteration; violett: Deletionsmutante; in Klammern: Bezeichnung des Klons.

präS1/ präS2-Domäne (Klonnummer)	SHBs ohne HBsAg- Schleife (Klonnummer)	HBsAg-Schleife AS 100-170 (Klonnummer)
präS1	sG10R (1)	sQ101H (1,4,6,8,12)
prM1T (2)	sW36del (8)	sM103I (1,4,6,8,12)
prF14S (10)	sP62Q (12)	sL109I (1,4,6,8,12)
prA28T (1,9)	sl82T (1)	sP120S (1,4,6,8,12)
prF56S (7)	sL94S (1,4,6,8,12)	sG130S (7)
prG65E (2)	sL175S (1,4,6,12)	sT131A (4)
prI73M (7)	sV184A (8, 10,11)	sY134N (2)
prL74I (2,9)	sL192P (8,10,11)	sK141E (6)
	sS193L (2,8,9,10,11)	sD144A (4,6,12)
präS2	sS204R (2,8,10,11)	sA157del (9)
prF116S (2)	sF212L (2)	sK160N (4,6,12)
prH117del (1,8,12)	sF220L (2)	
prR124stop (12)		
prF130L (2,9)		
prP149K (1,4,6,7,8,10,11,12)		
prS152P (7)		
prL162P (1,8)		

Tabelle 3-22 Übersicht über Mutationen im P-ORF von K724; fett gedruckt: Assoziation mit S-ORF; orange: in mehreren Klonen vorkommend; schwarz: Einzelmutteration; rot: Stop-Mutante; violett: Deletionsmutante; in Klammern: Bezeichnung des Klons.

P-ORF (Klonnummer)	Assoziierte Austausch mit S-ORF
rtR18K (1)	G10R
rtD45del (8)	sW36del
rtS68P (4)	
rtS75P (1)	
rtF88L (1)	
rtV112I (1,4,6,8,12)	sM103I
rtS117Y (1,4,6,8,12)	sL109L
rtS119P (2,9,10,11)	
rtH124Y (1,4,6,7,8,12)	
rtT128I (1,4,6,8,12)	sP120S
rtQ130stop (2)	
rtR138K (7)	sG130S
rtN139S (4)	sT131A
rtN139H (7)	-
rtV142E (2)	sY134N
rtQ149K (1,2,6,8,9,10,11)	
rtR153W (1,2,8,9,10,11)	
rtG165del (9)	sA157del
rtl169L (4,6,12)	
rtl169V (8)	
rtS189P (12)	
rtS213T (2,8,10,11)	sS204R
rtL220P (2)	sF212L

3.2.4.11 Blutspenderin mit ausheilender okkulten HBV Infektion (Fall E)

Bei diesem in Spanien aufgetretenen Fall (K578) handelt es sich im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Fällen um eine Blutspenderin (52 Jahre) mit hoher HBV-Viruslast, die im NAT 90.000 GE/ml aufwies. HBsAg war im Prism-Test negativ. Die HBV-Antikörper und die ALT-Werte waren zunächst normal. Bei einer Untersuchung einen Monat später, war die ALT auf 122 U/l angestiegen, anti-HBc schwach positiv und anti-HBs hoch positiv (> 1000 IU/l) und die HBV-DNA schwach positiv. Zwei Monate später war die HBV-DNA nicht mehr detektierbar, die ALT wieder normal, während anti-HBc und anti-HBs positiv blieben (Tabelle 3-23).

Tabelle 3-23 Serologische Marker der Patientenproben K578 zu unterschiedlichen Zeitpunkten; neg: negativ.

ID-Nr.	Abnahmedatum	ALT (U/l)	HBsAg (S/CO)	anti-HBs (IU/l)	anti-HBc (S/CO)	HBeAg	anti-HBe	HBV-DNA (GE/ml)
K587	09/2005	23	0,63 (Prism)	neg	0,47 (AxSym)	neg	neg	90.000
	10/2005	122	0,3 (Prism)	>1000	2,01 (AxSym)	neg	neg	< 50
	11/2005	10	0,3 (Prism)	606	3,68 (AxSym)	neg	neg	< 50

3.2.4.12 Sequenzanalyse (Fall E)

Von dieser Patientin wurde das HBV-Gesamtgenom kloniert. Es konnten drei positive Klone gewonnen werden, von denen Klon 1 komplett, von Klon 2 und Klon 3 nur der Bereich des HBsAg sequenziert wurde. Die Mutationen der einzelnen Klone sind in Tabelle 3-24 dargestellt. Bei Klon 1 fällt auf, dass dieser eine Deletion im präS2-Bereich an Kodon-Position 159 besitzt, wodurch es hier zu einer Verschiebung im Leserahmen kommt.

Tabelle 3-24 Aufstellung der Mutationen von Patientin K578 in drei vorhandenen Klonen; fett gedruckt: Assoziation mit S-ORF; blau: in 100 % der Klone vorkommend; schwarz: Einzelmutation; rot: Stop-Mutante; violett: Deletionsmutante.

Bereich	Mutationen Klon1	Mutationen Klon 2+3
präS1/präS2	prA28T	prA28T
	prL74I	prL74I
		prQ107R
	prF130L	prF130L
	prS159del	
SHBs	sV184A	sS61T
	sL192P	
	sS193L	sS193L
	sS204R	sS204R
Polymerase	rtS119P	rtS119P
	rtQ149K	rtQ149K
	rtR153W	rtR153W
	rtS213W	rtS213W
	rtP237T	rtP237T
	rtY257W	rtY257W
	rtQ267H	rtQ267H
Core	präCW28stop	
	cS49T	
	cL60I	keine
	cE77D	Sequenz
	cE113D	vorhanden
	cI116L	
	cS181P	
X	xS41T	
	xP42L	keine
	xS43P	Sequenz
	xK118N	vorhanden
	xV131T	

Ansonsten befinden sich nur drei weitere Mutationen (prA28T, prSL74I und prF130L) innerhalb der präS1/präS2-Domäne und auch innerhalb des SHBs sind nur vier Austausche detektiert worden, die alle außerhalb der HBsAg-Schleife liegen (sV184A, aL192P, sS193L, sS204R). Die Klone 2 und 3 besitzen ebenfalls die oben genannten Mutationen des präS-Bereiches und zwei der Austausche im SHBs. In der überlappenden reverse Transkriptase-Domäne des P-ORFs konnte in allen drei Klonen sieben Austausche (rtS119P, rtQ149K/E, rtR153W, rtS213W, rtP237T, rtY257W, rtQ267H) festgestellt werden. Die Sequenz des X-Gen konnte nur von Klon 1 analysiert werden, hier wurden insgesamt fünf Mutationen nachgewiesen (xS41T, xP42L, xS43P, xK118N, xV131T). Zusätzlich konnte in diesem Klon eine Stop-Mutation im präCore-Bereich (präCW28stop) entdeckt werden, die zu einem Verlust der Expression von HBeAg führt.

Der Core-Promotor enthielt zwei Nukleotid-Mutationen (G1764A, T1765C). Von den Mutationen im P-ORF ist nur die an Position 213 (rtS213W) mit dem S-ORF assoziiert (sS204R).

3.2.5 Transmission von HBV in den Fällen A bis C

In einer Studie zur Infektiosität und Pathogenität von HBsAg negativen Blutspendern konnten insgesamt fünf okkult infizierte Spender und 55 Rezipienten identifiziert werden [Gerlich *et al.*, 2007]. Drei der fünf Fälle (Fall A: K444/443; Fall B: ID384-ID389; Fall C: K442) wurden im Rahmen dieser Arbeit näher untersucht und die Ergebnisse der Transmission in Tabelle 3-25 zusammengefasst. Von den Spendern K724 und K578 standen keine Daten zur Übertragung zur Verfügung, da ihre Spenden wegen positiver HBV-DNA-Befunde nicht verwendet wurden. Bei Fall A konnten insgesamt sechs Empfänger identifiziert werden, von denen fünf Rezipienten allerdings keinen Leberschaden entwickelten, während ein Empfänger (K443) an fataler Hepatitis verstarb. Drei der fünf Rezipienten wurden anti-HBc positiv getestet und von diesen hatten zwei auch anti-HBs (46 und 308 IU/l), allerdings konnte nicht geklärt werden, ob diese Personen schon vor der Transfusion infiziert waren. Zwei der fünf Empfänger zeigten keine Anzeichen einer HBV-Infektion (anti-HBc negativ). In Fall B wurde sowohl Erythrozyten-Konzentrat als auch Frischplasma gespendet. Fünf der 13

Empfänger von Erythrozyten-Konzentraten und alle elf Empfänger des Frischplasmas waren nach der Spende anti-HBc positiv. Obwohl es keine Befunde zum Zeitpunkt vor der Transfusion gab, wurde von einer Übertragung durch den Spender ausgegangen, da die Prävalenz für anti-HBc in Deutschland nur bei 7 % liegt [Thierfelder *et al.*, 2001]. Im Fall C wurden vier Rezipienten untersucht. Von diesen war nur ein einziger sowohl anti-HBc als auch anti-HBs positiv, die anderen drei Empfänger zeigten keine serologischen Marker einer Infektion.

Tabelle 3-25 Zusammenfassung der HBV-Marker in 34 Rezipienten von drei untersuchten okkult infizierten Spendern.

Donor	Anzahl der Rezipienten	Hepatitis	anti- HBc	
			Positiv	Negativ
Fall A (K444)	6	1 (K443)	3	2
Fall B (ID384-389) Erythrozyten	13	0	5	8
Fall B (ID384-389) Frischplasma	11	0	11	0
Fall C (K442)	4	0	1	3
Gesamt	34	1	20	13

3.2.6 Nukleotidaustausche: Verhältnis von synonymen zu nicht-synonymen Austauschen

Das Abschätzen von synonymen (stummen) und nicht-synonymen (auswirkenden) Substitutionen ist eine wichtige Komponente beim Bewerten der evolutionären Dynamik. Während stumme Mutationen innerhalb von Protein-kodierenden Sequenzen eher zufällig auftreten, sprechen die nicht-synonymen Substitutionen wenn sie relativ häufig auftreten für einen hohen Selektionsdruck und spiegeln die

Anpassung mittels der Veränderung des Phänotyps wider. In Tabelle 3-26 sind die nt-Austausche der Patienten dargestellt.

Tabelle 3-26 Übersicht über die Nukleotidaustausche in den untersuchten Sequenzen des LHBs. Differenzierung in nicht-synonyme (d_N) und synonyme (d_S) Austausche sowie Berechnung des Quotienten d_N/d_S ; $N_{\text{sub}}/N_{\text{tot}}$: Anzahl substituierter Nukleotide (N_{sub}) geteilt durch die Gesamtzahl sequenzierter Nukleotide (N_{total}) der Klone; d_N : nicht-synonyme Austausche; d_S : synonyme Austausche.

Donor	Anzahl Klone	$N_{\text{sub}}/N_{\text{total}}$	nicht-synonyme Austausche (d_N)	synonyme Austausche (d_S)	Quotient (d_N/d_S)
K301 (immuntolerant)	31	97/37200 (0,26 %)	28 (0,08 %)	69 (0,19 %)	0,42
K444 (Fall A)	12	290/14400 (2,07 %)	188 (1,34 %)	102 (0,73 %)	1,84
K443 (Fall A)	9	221/10503 (2,10 %)	155 (1,48 %)	66 (0,63 %)	2,35
ID384 (Fall B_1)	10	266/12000 (2,22 %)	209 (1,74 %)	57 (0,48 %)	3,67
ID389 (Fall B_2)	7	177/8400 (2,11 %)	144 (1,71 %)	33 (0,39 %)	4,36
ID385 (Fall B_3)	8	86/3624 (2,37 %)	75 (2,07 %)	11 (0,30 %)	6,82
ID386 (Fall B_4)	12	286/14400 (1,99 %)	234 (1,63 %)	52 (0,36 %)	4,5
ID387 (Fall B_5)	10	288/12000 (2,40 %)	246 (2,05 %)	42 (0,35 %)	5,86
K442 (Fall C)	19	313/22800 (1,37 %)	225 (0,99 %)	88 (0,39 %)	2,56
K724 (Fall D)	10	240/11670 (2,00 %)	88 (0,75 %)	152 (1,30 %)	0,59

Bei der Auswertung der synonymen und nicht-synonymen Austausche wurden die Nukleotid-Sequenzen aller Klone betrachtet und die Substitutionen ausgezählt. Der Kontrollpatient K301 weist auf nt-Ebene insgesamt nur 97 Austausche (0,26 %) in 31 untersuchten Klonen auf. Die Mehrheit der Substitutionen, etwa 2/3 (0,19 %) ist synonym, nur 1/3 (0,08 %) zeigt eine Auswirkung auf AS-Ebene. Bei den untersuchten Fällen A-C zeigt sich ein anderes Bild. Grundsätzlich sind bei den okkult Infizierten wesentlich mehr Substitutionen aufgetreten (1,37 % - 2,40 %) als bei dem HBsAg⁺ Kontrollpatient (0,26 %). Der zweite Unterschied liegt darin, dass bei den OBIs im Vergleich zur Kontrollprobe wesentlich weniger synonyme Substitutionen als nicht-synonyme Mutationen auftreten. Hier liegen die Werte der synonymen Austausche bei 0,30 %-0,73 %, die der nicht-synonymen Austausche liegen deutlich höher bei 0,99 %-2,07 %. Das Verhältnis von 1/3 zu 2/3 ist hier also auf die Seite der nicht-synonymen Austausche verschoben. Eine Ausnahme bildet Patient K724. Ähnlich wie bei der Referenzprobe K301 treten hier mehr stumme (1,30 %) als nicht-synonyme Substitutionen (0,75 %) auf. Da der (d_N/d_S)-Quotient relativ niedrig liegt, kann davon ausgegangen werden, dass der Selektionsprozess gerade erst angefangen hat. Insgesamt allerdings liegt die Mutationsrate auf AS-Ebene mit 2,26 % bei diesem Patienten ähnlich hoch wie bei den anderen Fällen. Von Patient K578 wurde das Verhältnis von synonymen zu nicht-synonymen Substitutionen nicht ausgezählt, da keine Mutationen im Bereich SHBs detektiert wurden und somit eine phänotypische Anpassung ausgeschlossen wird.

3.2.7 Variabilität der okkulten HBV Infektionen (OBI)

Im nächsten Schritt sollte nun die Verteilung der Variabilität in den beschriebenen Fällen mit okkulten HBV Infektion näher charakterisiert werden. Dazu wurden zunächst die Austausche auf AS-Ebene gezählt und ins Verhältnis zur Gesamtzahl untersuchter Aminosäuren gesetzt. Anschließend wurde aufgeschlüsselt, wie die Verteilung der Austausche in der präS1-Domäne bzw. der antigenen Schleife (AS 100-170) ist. Zusätzlich wurden die Austausche im

überlappenden P-ORF ausgezählt und die entsprechende Variation berechnet. Die Ergebnisse der Berechnung sind in (Tabelle 3-27) dargestellt.

Tabelle 3-27 Zusammenfassung der prozentualen Verteilung der Variabilität bei okkulten HBV Infektionen im S-ORF (gesamt, präS1 und HBsAg-Schleife) und im P-ORF (überlappenden Bereich der RT); AS_{sub}/AS_{total} : Anzahl substituierter AS (AS_{sub}) bezogen auf Gesamtzahl sequenzierter AS (AS_{total}) in sieben bis 31 Klonen.

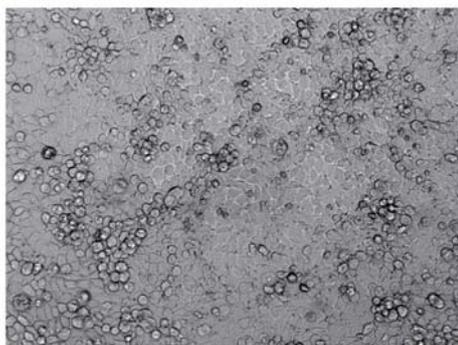
Donor	Anzahl Klone	DNA (GE/ml)	AS_{sub}/AS_{total}	Variation			Variation
				Gesamter S-ORF (LHBs)	präS1	HBsAg-Schleife AS 100-170	P-ORF (RT)
K301 (immuntolerant)	31	10^8	26/12400	0,21 %	0,30 %	0,23 %	0,14 %
K444 (Fall A)	12	240	167/4668	3,58 %	2,00 %	8,69 %	3,53 %
K443 (Fall A)	9	$1,7 \cdot 10^4$	147/3501	4,20 %	2,26 %	10,16 %	2,75 %
ID384 (Fall B_1)	10	20	199/4000	4,98 %	1,93 %	10,29 %	3,72 %
ID389 (Fall B_2)	7	9	129/2800	4,61 %	2,16 %	12,86 %	4,27%
ID385 (Fall B_3)	8	< 50	86/1208	(SHBs) 7,12 %	-	10,71 %	4,06 %
ID386 (Fall B_4)	12	59	168/4800	3,50 %	1,89 %	10,48 %	3,67 %
ID387 (Fall B_5)	10	25	222/4000	5,55 %	2,86 %	14,43 %	4,83 %
K442 (Fall C)	19	18	289/7600	3,80 %	2,52 %	5,79 %	2,68 %
K724 (Fall D)	10	310	88/3890	2,26 %	0,83 %	4,43 %	2,52 %

Die Sequenz innerhalb des LHBs variiert in den okkulten HBV Infektionen zwischen 2,08 % (K724) und 5,55 % (ID387). Verglichen mit dem Wert des immunotoleranten HBV-Trägers K301 (0,21 %) liegt die Variation im gesamten ORF der Klone also zehn bis 26 Mal höher. Innerhalb der HBsAg-Schleife schwanken die Werte zwischen 4,43 % (K724) und 14,43 % (ID387). Damit ist in diesem Bereich die Variation sogar 19-62 Mal höher, als in der Kontrolle des immunotoleranten Patienten (0,23 %). Betrachtet man hingegen die Prozentzahlen der Austausche innerhalb der präS1-Domäne, erkennt man dort nur gering variierende Werte von 0,65 % (K724) bis 2,86 % (ID387). Bezogen auf Donor K301 (0,30 %) zeigt sich damit innerhalb des präS1-Abschnitts eine maximal 10-fach höhere Variation in den okkult infizierten Patienten. Der Wert des Patienten ID385 für die Variation des gesamten Leserahmens fällt im Vergleich zu den anderen Blutspendern etwas höher aus, da hier nur Teile des SHBs untersucht werden konnten und nicht die präS1-Domäne. Daher ist der untersuchte Sequenzbereich kürzer und die Austausche innerhalb der HBsAg-Schleife haben eine stärkere Gewichtung.

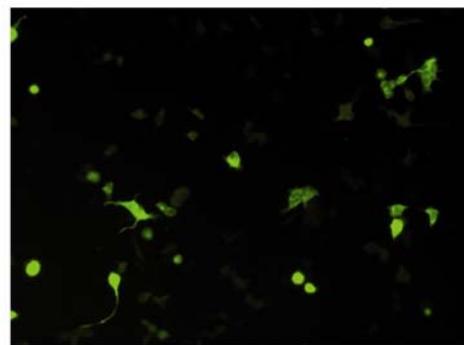
Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei den untersuchten okkult HBV infizierten Blutspendern eindeutig höhere Mutationsraten innerhalb der HBsAg-Schleife als in der präS-Region detektiert werden konnten. Die Variabilität der antigenen Schleife liegt bei den HBsAg negativen Patienten 19-62 Mal höher als bei HBsAg positiven Patienten, während die präS1-Domäne eine maximal 10-fach höhere Variabilität zeigt und somit verhältnismäßig konserviert ist. Es konnten Mutationen sowohl oberhalb als auch unterhalb der *a*-Determinante nachgewiesen werden, sowie an den Subtyp-spezifischen Aminosäure-Positionen 127 (K442) und 160 (K724). Trotz der hohen Variabilität scheinen die Mutanten lebensfähig und infektiös zu sein. Bei den hier untersuchten Fällen wurden von 34 Empfängern von Blut- oder Plasma-Spenden, insgesamt 21 Rezipienten mit HBV infiziert (Tabelle 3-25).

3.3 Expression von Hepatitis B Virusproteinen in humanen Hepatom-Zelllinien

Nach der Charakterisierung interessanter Seren sollte nun ein Transfektionssystem etabliert werden, um einige Konstrukte in humanen Hepatomzelllinien zu exprimieren. Dafür wurde zunächst untersucht, welche Zelllinie sich am besten für die Expression eignet. Zu diesem Zweck wurden die HBV-kodierenden Konstrukte pRVHBV1.5, pSVB45H oder ein GFP-kodierendes Plasmid (pmaxGFP) in verschiedenen Ansätzen jeweils in zwei unterschiedlichen humane Hepatom-Zelllinien (HepG2 und Huh7) mittels Lipofektion transient transfiziert. Nach zwei Tagen wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet um eine erfolgreiche Transfektion anhand des exprimierten GFPs zu bestätigen.



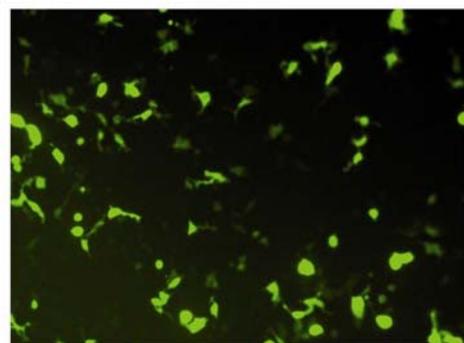
Huh7 Zellen



Huh7 Zellen



HepG2 Zellen



HepG2 Zellen

Abbildung 3-8 Huh7-Zellen mit pmaxGFP/GeneJuice und HepG2-Zellen mit pmaxGPF/FuGene transient transfiziert in der Durchlichtaufnahme und Fluoreszenzaufnahme.

In Abbildung 3-8 ist erkennbar, dass nach transientser Plasmidtransfektion mit pmaxGFP in beiden Zelllinien das Grün Fluoreszierende Protein (GFP) gebildet wurde. Die Transfektion schien allerdings mit HepG2-Zellen besser zu funktionieren, was durch eine größere Zahl GFP-exprimierender Zellen deutlich wurde.

Des Weiteren wurden für die Transfektion die Plasmide pRVHBV1.5 und pSVB45H verwendet, die freundlicherweise von Volker Bruss, Göttingen, zur Verfügung gestellt wurden. pRVHBV1.5 codiert für ein HBV-Überlängengenom (1.5mer), dessen Transfektion in humane Hepatomzellen zur Expression von HBV führt [Bruss und Ganem, 1991]. pSVB45H codiert für das LHBs des HBV-Wildtyps unter der Kontrolle eines SV40 Promotor. Nach Transfektion in HepG2-Zellen können LHBs, MHBs und SHBs exprimiert werden [Bruss und Ganem, 1991]. Da beide Plasmide in der Lage sind, im Zellkultursystem HBsAg zu exprimieren, kann dieses anschließend im ELISA nachgewiesen werden. Nach Ansetzen der Transfektion wurde daher jeden zweiten bis dritten Tag ein Mediumwechsel durchgeführt, die Überstände gesammelt und die Sekretion von HBsAg im ELISA getestet (Abbildung 3-9).

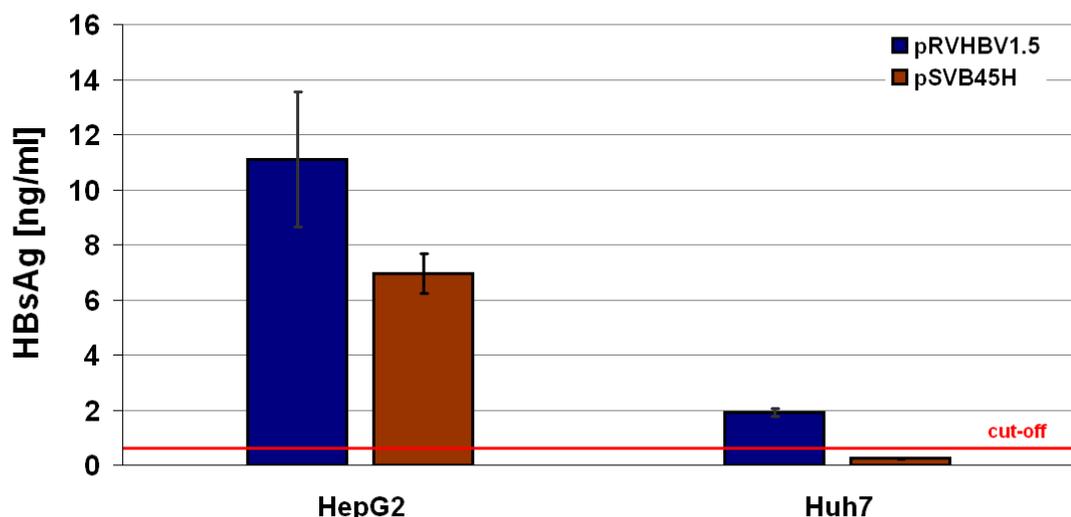


Abbildung 3-9 HBsAg-Sekretion von HepG2- und Huh7-Zellen nach der Transfektion mit unterschiedlichen HBV-Plasmidkonstrukten; pRVHBV1.5: codiert für ein 1.5mer von HBV; pSVB45H: codiert für HBV-wt LHBs.

In dem hier verwendeten Sandwich-ELISA wurde ein konformationsabhängiger Antikörper verwendet (C20/02), der die α -Determinante der S-Domäne im HBsAg erkennt (2.1.8). Es konnte nachgewiesen werden, dass HepG2-Zellen nach Transfektion mit pRVHBV1.5 fast sechs Mal mehr HBsAg sekretierten als Huh7-Zellen (Abbildung 3-9). Die Transfektion mit pSVB45H führte in HepG2-Zellen zu einer knapp 40 % geringeren Expression von HBsAg als mit dem Überlängengenom. Dennoch lagen beide Werte deutlich über dem *cut-off*. Bei den Huh7-Zellen konnte nur nach Transfektion mit dem HBV 1.5mer ein Signal für HBsAg detektiert werden. Aufgrund dieser Ergebnisse und der leichteren Handhabung der HepG2-Zellen, wurden die künftigen Transfektionsversuche mit dieser Zelllinie durchgeführt.

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob virale Proteine nach Transfektion von klonierten HBV-Gesamtgenomen exprimiert werden. Dazu wurde zunächst das Gesamtgenom eines chronisch HBV-infizierten Patienten (K438) mit HBV-Wildtyp, Genotyp A2 (gtA2) in den *XL-cloning vector* kloniert, anschließend in HepG2-Zellen transfiziert und das Medium wiederum auf sekretiertes HBsAg mittels ELISA getestet (Abbildung 3-10). Als Referenzkontrolle wurde ein Ansatz mit dem HBV-Überlängengenom transfiziert.

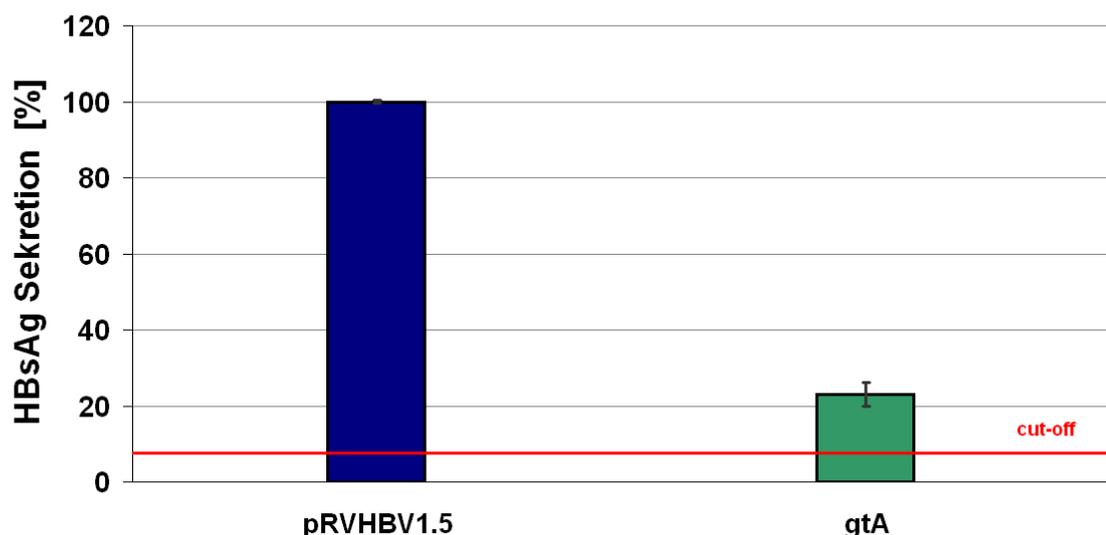


Abbildung 3-10 HBsAg-Sekretion [%] nach Transfektion von HepG2-Zellen mit pRVHBV1.5 (HBV 1,5mer) und dem klonierten HBV-Gesamtgenom-Vectorsystem des Genotyps A (gtA2).

Für die Auswertung wurde die HBsAg-Sekretion des pRVHBV1.5 Plasmids als Referenzwert genommen. Die Untersuchung der Überstände mittels ELISA ergab, dass für das klonierte HBV-Wildtyp-Genom (gtA) eine HBV-Sekretion von knapp 25 % nachgewiesen werden konnte. Somit war die Expression im artifiziellen System (pRVHBV1.5) fast vier Mal höher als im klonierten Konstrukt (1.0 mer).

Da die Sekretion der Oberflächenproteine mittels ELISA nachgewiesen werden konnte, sollte nun im nächsten Schritt getestet werden, ob die klonierten Konstrukte auch Virionen bilden können. Dazu wurden zwei weitere Proben von HBV mit dem Genotyp D (gtD) und dem Genotyp G (gtG) verwendet und ebenfalls das Gesamtgenom in den Expressionsvektor kloniert. Nach Herausschneiden des Gesamtgenoms aus dem Vektorsystem mit dem Restriktionsenzym SapI (NEB, Frankfurt a.M.) wurden erneut HepG2-Zellen transfiziert, jeweils mit dem ungeschnittenen und dem SapI-geschnittenen Konstrukt der drei unterschiedlichen Genotypen (gtA, gtD und gtG). Das gesammelte Medium wurde wiederum mittels ELISA auf HBsAg getestet. Zusätzlich wurden die Überstände auf HBeAg untersucht um die Produktion von Virionen zu bestätigen. Nur wenn das aus dem Vektor geschnittene HBV-Genom religiert und dann cccDNA bildet, kann HBeAg sekretiert werden.

In Abbildung 3-11 sind die Daten des Transfektionsversuchs mit den unterschiedlichen Konstrukten dargestellt. Bei der Auswertung wurde wiederum der höchste HBsAg-Wert als Referenzgröße genommen und die anderen Werte darauf bezogen. Es fällt auf, dass die Werte der HBsAg-Sekretion bei den geschnittenen, rezirkularisierten Genomen generell höher liegen als die der ungeschnittenen Plasmidkonstrukte, obwohl stöchiometrische DNA-Mengen transfiziert wurden. Die stärkste Sekretion von Oberflächenprotein ist bei Genotyp A nachweisbar und wurde als Referenzwert verwendet. Im Vergleich sekretiert Genotyp D etwa 25 % weniger, Genotyp G sogar circa 60 % weniger HBsAg. Betrachtet man die Werte der ungeschnittenen Vektorkonstrukte so ist erkennbar, dass diese um ca. 20-30 % niedriger liegen als die der korrespondierenden SapI-geschnittenen Konstrukte.

Die tabellarische Übersicht der HBeAg-Messungen zeigt, dass in diesem Versuch nur bei dem Transfektionsansatz mit dem geschnittenen Genotyp A ein positives

Ergebnis für HBeAg detektierbar war. Der gemessene Wert für das HBeAg lag mit 10,56 S/CO deutlich über dem *cut-off*.

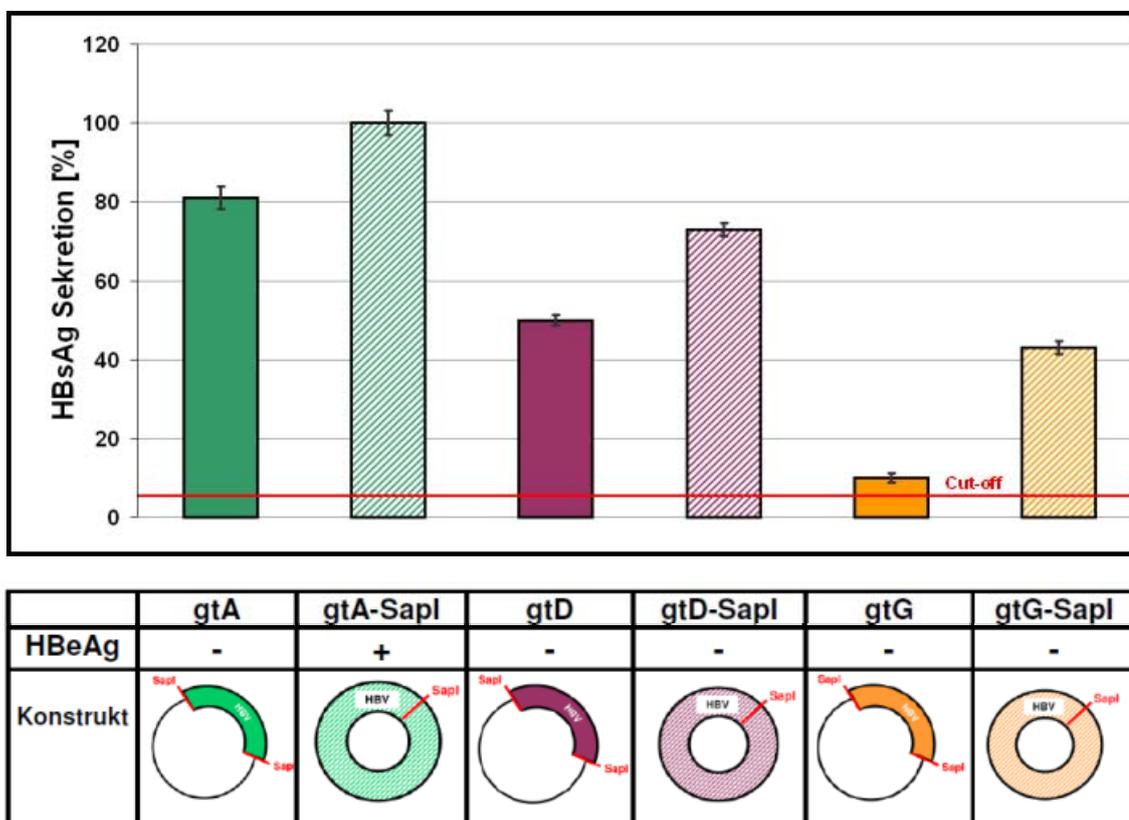


Abbildung 3-11 HBsAg- und HBeAg-Sekretion nach Transfektion von HepG2-Zellen mit unterschiedlichen klonierten HBV-Gesamtgenomkonstrukten; gtA: HBV Genotyp A; gtA-SapI: HBV Genotyp A mit SapI aus dem Vektor geschnitten; gtD: HBV Genotyp D; gtD-SapI: HBV Genotyp D mit SapI aus dem Vektor geschnitten; gtG: HBV Genotyp G; gtG-SapI: HBV Genotyp G mit SapI aus dem Vektor geschnitten; (-):HBeAg negativ detektiert; (+):HBeAg positiv.

3.4 Neutralisierungspotential aus Serum gereinigter Antikörper gegen die HBV Oberflächenproteine

Ein weiterer Aspekt, der in dieser Arbeit untersucht werden sollte, war die Frage ob anti-HBs, welches gegen normales HBsAg generiert wurde, in der Lage ist, die durch *escape*-Mutanten verursachte HBV-Infektion *in vitro* zu inhibieren. Dazu wurde das Infektionsmodell mit primären Tupaia Hepatozyten (PTH) gewählt, da die Infektion analog zum humanen System ist [Glebe *et al.*, 2003; Glebe *et al.*, 2005], und die Zellen im Gegensatz zu primären humanen Hepatozyten (PHH) eine homogene Qualität und Suszeptibilität aufweisen. Da allerdings gezeigt werden konnte, dass Bestandteile des humanen Serums die Bindung von HBV an primäre Tupaia Hepatozyten hemmen [Köck *et al.*, 2001], musste zunächst eine geeignete Methode gefunden werden, um die Immunglobuline möglichst schonend aus dem Serum zu isolieren, um anschließend ihre Funktionsfähigkeit im Infektionsversuch testen zu können.

3.4.1 Reinigung und Isolation von anti-HBs aus Serum

Für die Etablierung des Systems wurde zunächst Serum eines vakzinierten, anti-HBs positiven Spenders (ID376: 117.000 IU/ml anti-HBs) und das eines anti-HBs negativen, nicht geimpften Spenders (ID343) verwendet. Als Methode wurde die Aufreinigung mit Protein L-Agarose gewählt, da Protein L in der Lage ist eine starke Bindung mit dem variablen Teil der leichten Kette aller Immunglobulin-Klassen einzugehen und somit eine komplette Isolation aller Ig's erlaubt. Nach Aufreinigung der beiden Patientenserum wurden von den ersten beiden Elutionsfraktionen jeweils 100 ng Protein auf ein SDS-Gel aufgetragen, die dritte Fraktion wurde unverdünnt eingesetzt. Anschließend wurde eine Silberfärbung durchgeführt (Abbildung 3-12).

Durch die denaturierenden Bedingungen bei der SDS-PAGE sind die Untereinheiten der Immunglobuline entsprechend ihrer Größe aufgetrennt worden. Neben den Untereinheiten der schweren Ketten, die bei ca. 50 kDa bandieren, sind die der leichten Ketten bei ca. 28 kDa zu erkennen. Zusätzlich ist Albumin mit einer Bande bei 66 kDa nachweisbar. Das verstärkte Signal der beiden Fraktionen E3 lässt sich darauf zurückführen, dass diese Proben unverdünnt aufgetragen

wurden. Nach Isolation der Immunglobuline aus dem Serum wurde nun die spezifische Menge an anti-HBs in jeder Probe im AxSym mit dem AxSYM® AUSAB® Reagent Kit bestimmt. Nach der automatischen Berechnung der Milli-Internationalen Units (mIU) wurde dann ein Versuchsansatz erstellt, um unterschiedliche Mengen anti-HBs auf ihr Neutralisierungspotential im Infektionsversuch zu testen.

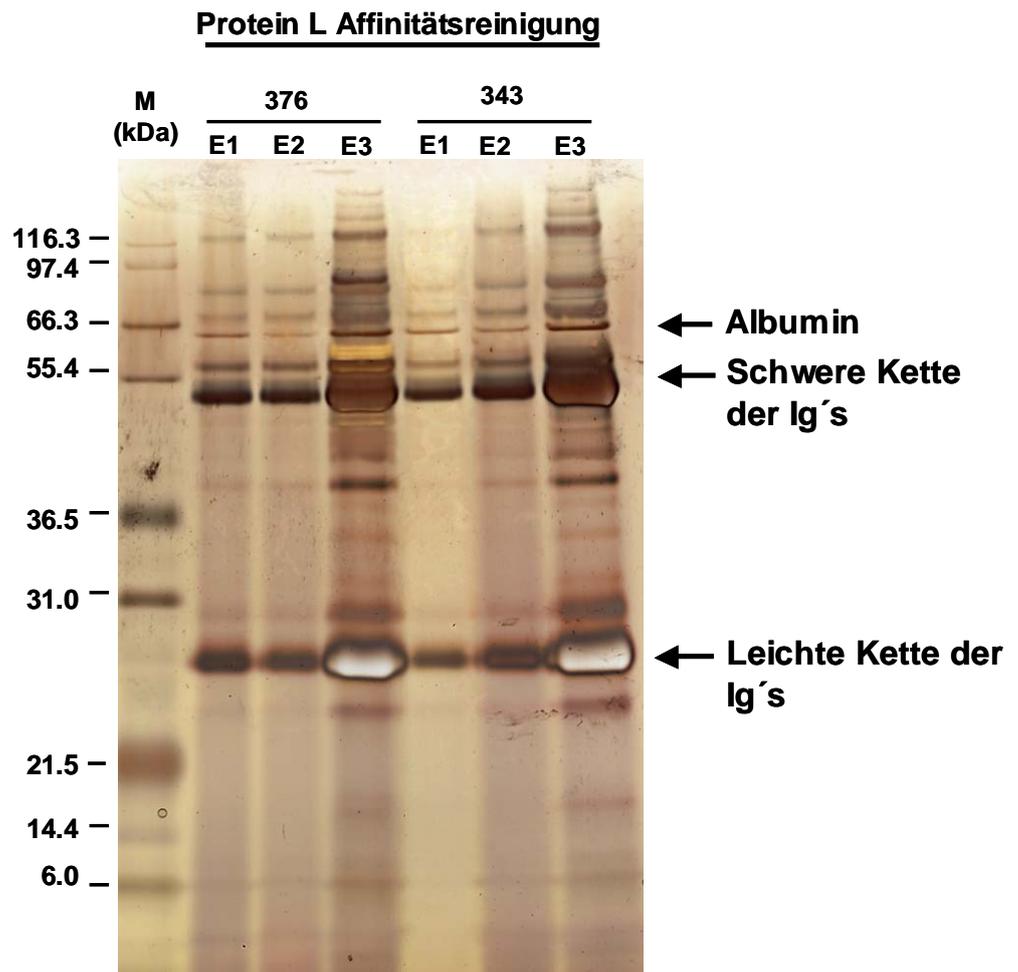


Abbildung 3-12 Silberfärbung der Protein L-aufgereinigten Serumproben nach SDS-PAGE; M: Marker in kDa; Probe 376: Positivkontrolle eines vakzinierten, anti-HBs positiven Spenders; Probe 343: Negativkontrolle eines anti-HBs negativen Spenders; E1, E2, E3: Eluat1 und Eluat2 (jeweils 100 ng Protein aufgetragen), Eluat3 (unverdünnt aufgetragen).

3.4.2 Neutralisierung der HBV-Infektion primärer Tupaia Hepatozyten mittels Protein L-gereinigter Antikörper

3.4.2.1 Antikörper aus einem vakzierten, anti-HBs positiven Spender

Um das Neutralisierungspotential von anti-HBs Antikörpern zu testen, wurde die den Milli-Internationalen Units (300-0 mIU absolut) entsprechende Proteinmenge zusammen mit der korrespondierenden Menge Protein aus Negativserum gemischt, damit in allen Ansätzen die gleiche Endkonzentration an Protein vorlag. Anschließend wurden die Ansätze zusammen mit HBV (Genotyp D) für eine Stunde inkubiert und dann auf die primären Tupaia Hepatozyten (PTH) gegeben. Nach 16 h wurde der Überstand abgenommen, die Zellen gewaschen um ungebundenes Virus zu entfernen und anschließend für weitere elf Tage kultiviert. Da die HBsAg-Sekretion im Laufe der Infektion aufgrund der intrazellulären cccDNA-Amplifikation und der damit vermehrten Expression zunimmt, wurde der Überstand von Tag 11 im ELISA auf HBsAg, als Marker einer etablierten Infektion, getestet (Abbildung 3-13).

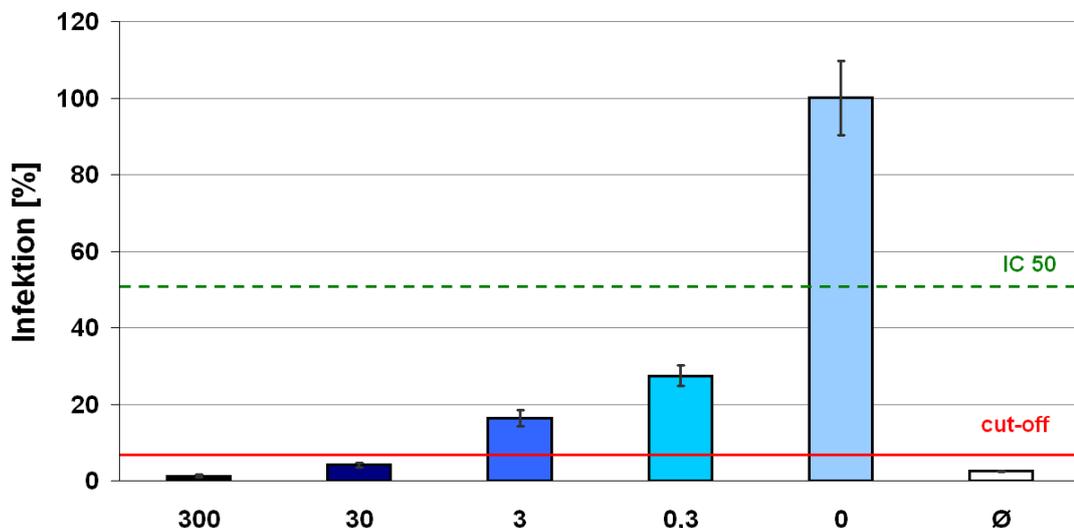


Abbildung 3-13 Inhibition der HBV-Infektion primärer Tupaia Hepatozyten mittels Protein L-gereinigter, neutralisierender Antikörper (anti-HBs) eines vakzierten, anti-HBs positiven Spenders; für die Infektion wurden $2,5 \times 10^6$ GE gereinigtes HBV eines chronischen Trägers eingesetzt: 0,25 µl HBV ID323 (gtD) enthält 2,19 pg HBsAg ($c=8,75$ ng/ml); y-Achse: HBsAg als Maß der Infektion [%]; x-Achse: Titration der Menge an verwendetem anti-HBs (300-0 mIU absolut), Ø: Negativkontrolle (ohne HBV); *cut-off*: unterhalb dieses Wertes hat keine Infektion stattgefunden; IC50: Wert bei dem die Infektion um 50 % inhibiert ist.

In diesem Versuch ist erkennbar, dass anti-HBs, welches mittels Protein L aus Serum aufgereinigt wurde, in der Lage ist die HBV-Infektion *in vitro* vollständig zu neutralisieren, wenn 30-300 mIU absolut (in 300 µl Gesamtvolumen, c=1000 mIU/ml) eingesetzt werden. Gibt man das Virus mit 0,3-3 mIU anti-HBs auf die PTH, so kann zwar eine Infektion stattfinden, allerdings ist diese um bis zu 70 % inhibiert. Die IC50 liegt bei unter 0,3 mIU anti-HBs. Um diese Ergebnisse zu verifizieren, wurde der Versuch fünf Mal wiederholt. Die Abbildung 3-14 zeigt einen weiteren, unabhängigen Versuchsansatz, bei dem die Ergebnisse reproduziert wurden. Somit konnte davon ausgegangen werden, dass die gereinigten Immunglobuline in der Lage sind die Infektion zu inhibieren bzw. zu neutralisieren.

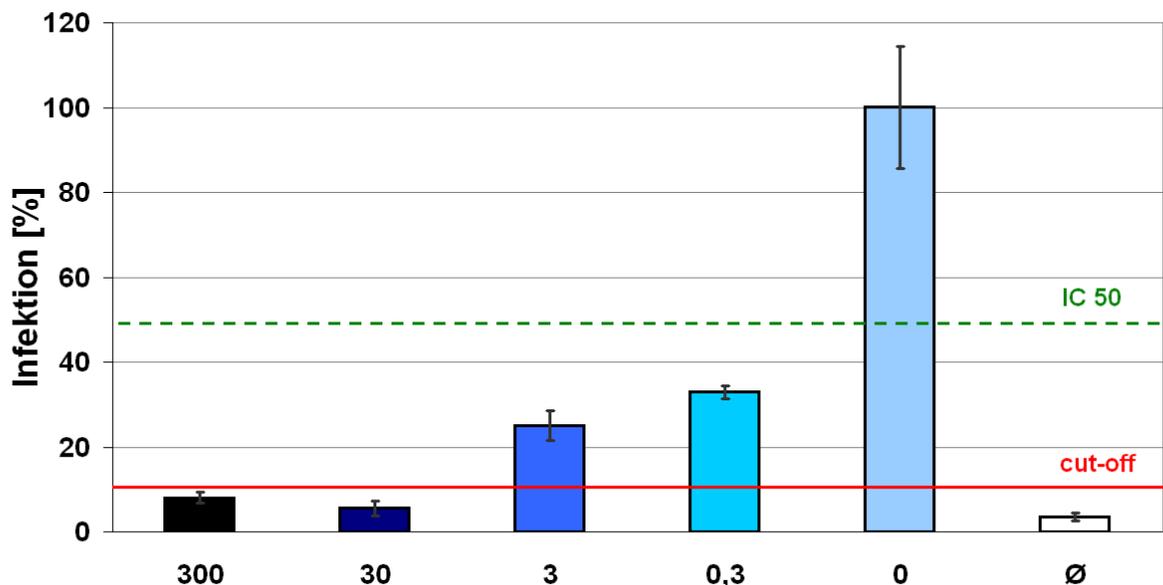


Abbildung 3-14 Wiederholung des Versuches der Inhibition der HBV-Infektion primärer Tupaia Hepatozyten mittels Protein L-gereinigter, neutralisierender Antikörper (anti-HBs) eines vakzinierter, anti-HBs positiver Spenders; für die Infektion wurden $2,5 \times 10^6$ GE gereinigtes HBV eines chronischen Trägers eingesetzt: 0,25 µl HBV ID323 (gtD) enthält 2,19 pg HBsAg (c=8,75 ng/ml); y-Achse: HBsAg als Maß der Infektion [%]; x-Achse: Titration der Menge an verwendetem anti-HBs (300-0 mIU absolut), Ø: Negativkontrolle (ohne HBV); *cut-off*: unterhalb dieses Wertes hat keine Infektion stattgefunden; IC50: Wert bei dem die Infektion 50 % inhibiert ist.

3.4.2.2 Antikörper aus einem okkult HBV infizierten Blutspender

Nachdem nun ein geeignetes System für die Untersuchung des Neutralisierungspotentials gereinigter Immunglobuline zur Verfügung stand, sollten im nächsten Schritt Serumproben eines okkult infizierten Blutspenders (ID384-ID389) untersucht werden, der im *Screening* anti-HBs negativ getestet wurde (Tabelle 3-12), aber bei der Sequenzanalyse eine Reihe von Mutationen im SHBs und innerhalb der α -Determinante aufwies (3.2.4.6). Dazu wurden die Immunglobuline aus fünf aufeinanderfolgenden Serumproben mittels Protein L-Agarose isoliert und für den Infektionsversuch Proteinmengen entsprechend der Menge von 300 mIU anti-HBs eingesetzt, da bei diesen Mengen in den Vorversuchen (Abbildung 3-13 und Abbildung 3-14) eine komplette Inhibition erreicht wurde.

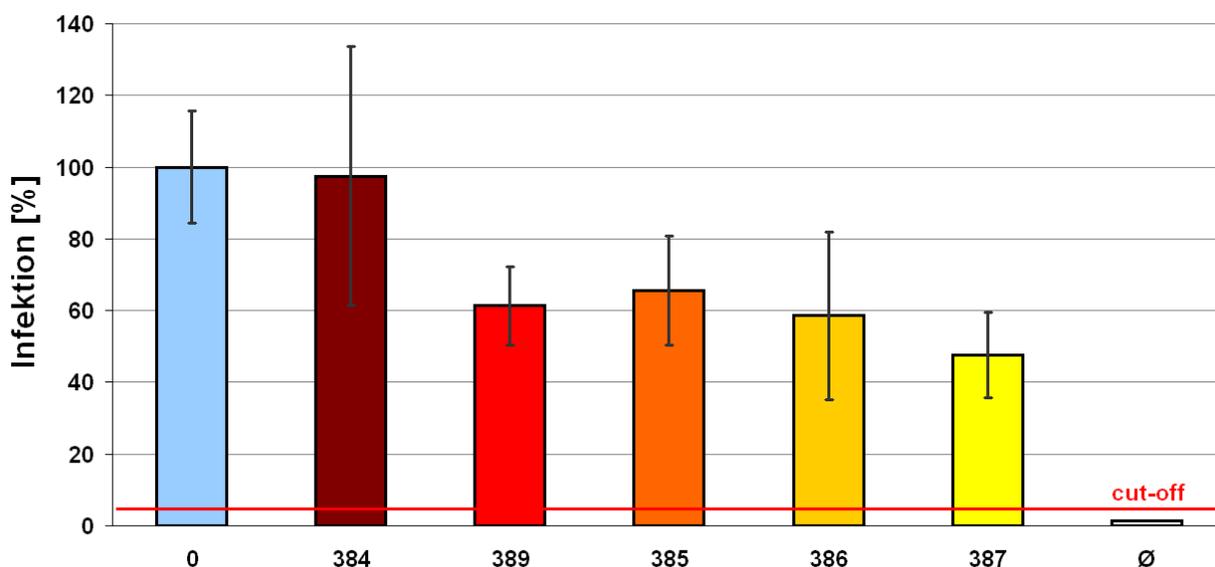


Abbildung 3-15 Inhibitionsversuch der HBV-Infektion von PTH mit Protein L-gereinigten Antikörpern (anti-HBs) von fünf aufeinander folgenden Proben eines okkult infizierten HBV-Trägers (ID384-ID387); für die Infektion wurden $2,5 \times 10^6$ GE gereinigtes HBV eines chronischen Trägers eingesetzt: 0,25 μ l HBV ID323 (gtD) enthält 2,19 pg HBsAg ($c=8,75$ ng/ml); y-Achse: HBsAg als Maß der Infektion [%]; x-Achse: 0: Positivkontrolle (0 mIU anti-HBs), 384-387: ID-Nummern der Proben des Patienten im zeitlichen Verlauf; Ø: Negativkontrolle (ohne HBV); *cut-off*: unterhalb dieses Wertes hat keine Infektion stattgefunden.

Die Ansätze wurden für 1 h mit HBV inkubiert, anschließend auf die PTH gegeben und nach 16 h wieder abgenommen. Nach dem Waschen erfolgte die Kultivierung der Hepatozyten für weitere 15 Tage, dann wurden die abgenommenen Überstände im ELISA auf sekretiertes HBsAg untersucht (Abbildung 3-15). Der Ansatz mit 0 mIU anti-HBs wurde als Positivkontrolle für die Infektion verwendet und der HBsAg Wert gleich 100 % gesetzt. Die gemessenen HBsAg-Werte liegen alle eindeutig über dem *cut-off*. Während bei der Probe ID385 die Infektion bei nahezu 100 % liegt, kann in der Probe ID387 eine Inhibition der Infektion um 50 % detektiert werden. Die anderen drei Proben weisen eine Inhibition zwischen 30-40 % auf. Auch dieser Versuchsansatz wurde fünf Mal wiederholt, allerdings waren die erhaltenen Ergebnisse sehr heterogen. Wie Abbildung 3-16 zeigt, kann keine signifikante Inhibition der Infektion nachgewiesen werden, da alle Werte, trotz schwankender Standardabweichungen, deutlich über dem *cut-off* liegen. In diesem Fall kann also davon ausgegangen werden, dass die gereinigten Immunglobuline nicht in der Lage waren die Infektion *in vitro* zu neutralisieren.

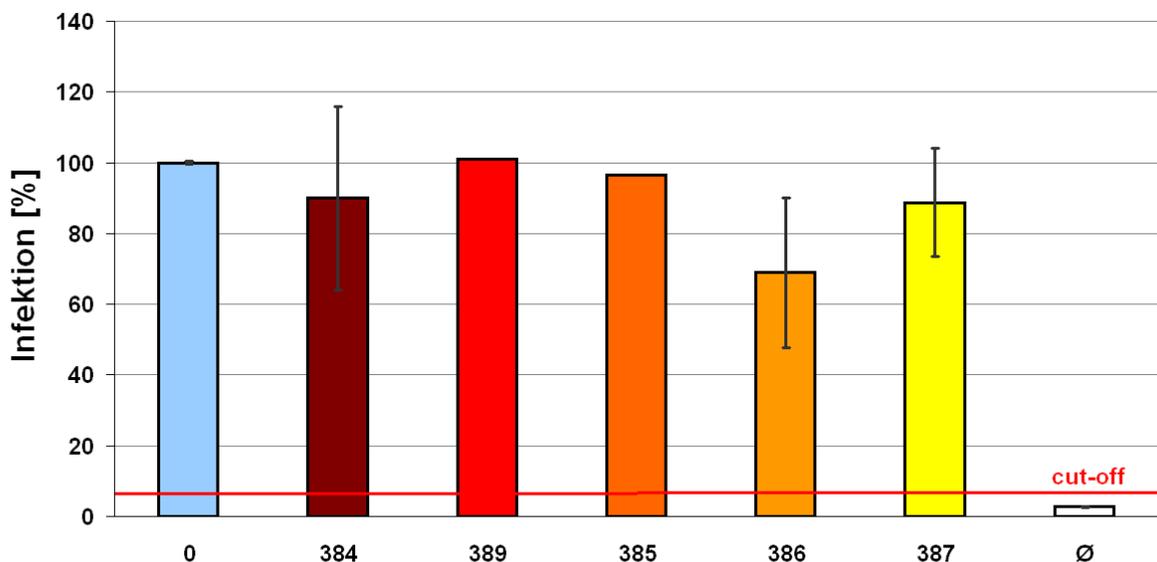


Abbildung 3-16 HBV-Infektion primärer Tupaia Hepatozyten und die Neutralisierbarkeit durch Protein L-gereinigte Antikörper (anti-HBs) von fünf aufeinander folgenden Proben eines okkult infizierten HBV Trägers (ID384-ID387); für die Infektion wurden $2,5 \times 10^6$ GE gereinigtes HBV eines chronischen Trägers eingesetzt: 0,25 μ l HBV ID323 (gtD) enthält 2,19 pg HBsAg ($c=8,75$ ng/ml); y-Achse: HBsAg als Maß der Infektion [%]; x-Achse: 0: Positivkontrolle (0 mIU anti-HBs), 384-387: ID-Nummern der Proben des Patienten im zeitlichen Verlauf; Ø: Negativkontrolle (ohne HBV); *cut-off*: unterhalb dieses Wertes hat keine Infektion stattgefunden.

4 Diskussion

4.1 Sequenzanalyse des Arctic Squirrel Hepatitis Virus (ASHV) aus dem Serum eines Arktischen Hörnchens und eines experimentell infizierten Amerikanischen Waldmurmeltiers

Neben dem humanen HBV gehört das ASHV (*Arctic Squirrel Hepatitis Virus*) ebenso wie das WHV (*Woodchuck Hepatitis Virus*) und das GSHV (*Ground Squirrel Hepatitis Virus*) zum Genus *Orthohepadnavirus* [Mason *et al.*, 2005]. Aufgrund der hohen Wirtsspezifität der Orthohepadnaviren wurden bislang in der Natur keine artübergreifenden Infektionsereignisse berichtet. Unter Laborbedingungen konnte allerdings gezeigt werden, dass sich sowohl neonatale *Woodchucks* [Seeger *et al.*, 1991] als auch adulte Tiere [Lorenz, 2006] mit GSHV infizieren lassen. Umgekehrt sind *Ground Squirrels* nicht für WHV suszeptibel [Seeger *et al.*, 1987]. Im Rahmen einer Studie des Instituts für Medizinische Virologie in Zusammenarbeit mit Dr. Stephan Menne von der *Cornell University, Ithaca, USA*, konnte nachgewiesen werden, dass sich auch adulte *Woodchucks* mit ASHV infizieren lassen [Lorenz, 2006].

Für die vorliegende Arbeit wurde aus der Serumprobe eines experimentell mit ASHV infizierten *Woodchucks* (Tier #3537) die virale DNA isoliert, kloniert und sequenziert. Ebenso wurde das ASHV-Genom aus dem eigentlichen Wirt, einem chronisch mit ASHV-infizierten *Arctic Squirrel* (Wildfang, Kolonie 3P_1E5852) kloniert und sequenziert. Zusätzlich wurde sowohl von diesen beiden Proben, als auch von GSHV- und WHV-haltigen Serumproben, das e-Antigen mit einem diagnostischen HBeAg-Testsystem für HBV detektiert. Sowohl die natürliche, chronische ASHV-Infektion im *Arctic Squirrel* als auch die experimentelle akute ASHV-Infektion des *Woodchucks* führte zur Produktion replikationskompetenter Viren.

Die Sequenzanalyse ergab, dass die ASHV-Genome der klonierten Proben aus dem *Arctic Squirrel* (ASHV_3P) und dem akut infizierten *Woodchuck* (ASHV_3537) in der Nukleotidsequenz nur an zehn Positionen, also um 0,3 % voneinander abweichen. Da die Sequenzen dieser beiden klonierten Proben untereinander eine so hohe Übereinstimmung zeigen, kann die Notwendigkeit einer

Anpassung an den Wirt (*Woodchuck*) weitgehend ausgeschlossen werden. Insgesamt sind die Sequenzen der Klone 3323 bp lang und somit 21 nt länger als das bisher publizierte ASHV_{AGU2914} [Testut *et al.*, 1996], welches vier Deletionen in der Sequenz aufweist. Das Genom ist in vier offenen Leserahmen (präS/S, C, Pol und X) organisiert, vergleichbar dem Aufbau von HBV [Schlicht und Schaller, 1989; Tiollais *et al.*, 1981], GSHV [Marion *et al.*, 1980] oder WHV [Galibert *et al.*, 1982].

Die präCore-Region (nt 1-90) ist die Sequenz, die in allen Hepadnaviren am besten konserviert ist [Miller und Robinson, 1986]. Auch in den Klonen konnte in diesem Bereich nur eine vereinzelte Substitution (nt 40) detektiert werden. Im carboxyterminalen Bereich der Core-Region liegt das Arginin-reiche SPRRRR-Motiv, welches bei HBV die Basis des nukleären Lokalisationssignals (NLS; *nuclear localisation signal*) bildet [Eckhardt *et al.*, 1991]. Es vermittelt die Interaktionen zwischen dem Kapsid und der viralen DNA [Nassal, 1992] und lenkt das Kapsid zum Nukleus [Rabe *et al.*, 2003]. Dieses Motiv ist, mit Ausnahme des bereits publizierten ASHV_{AGU2914}, welches eine Deletion des letzten Arginins (R210del) aufweist, bei allen Säuger-Hepadnaviren vertreten und konnte auch in den Klonen identifiziert werden. Die Variabilitäten (nt-Level) der Klone ASHV_{3537_#1} und ASHV_{3P_#1} zu GSHV_{K02715} und WHV_{J04514} entsprechen im präC/C-Bereich den Werten der publizierten ASHV_{AGU2914}-Sequenz zu GSHV_{K02715} bzw. WHV_{J04514} [Testut *et al.*, 1996].

Das S-Gen der drei Nagetier-Gattungen ist neben dem C-ORF eine sehr konservierte Region [Kodama *et al.*, 1985]. Generell fällt auf, ist die präS-Region in den ASHV-Klonen weniger konserviert war, als die S-Domäne. Die bei der bekannten ASHV_{AGU2914}-Sequenz detektierte Deletion von 12 bp innerhalb der präS1-Domäne konnte in den ASHV-Klonen nicht nachgewiesen werden, dieser Sequenzbereich weist also eher eine Ähnlichkeit mit GSHV_{K02715} und WHV_{J04514} auf. Die präS1-Domäne spielt bei HBV eine wichtige Rolle bei der Bindung an die Hepatozyten-Membran [Glebe *et al.*, 2005; Neurath *et al.*, 1986] und ist somit vermutlich für die enge Wirtsspezifität verantwortlich sein. Die essentielle Bindedomäne ist innerhalb aller HBV-Genotypen und beim WMHBV (*Woolley Monkey Hepatitis B Virus*) konserviert, sie konnte jedoch in den Nager-Sequenzen nicht nachgewiesen werden. Dennoch konnte gezeigt werden, dass

WHV-Oberflächenproteine in der Lage sind, primäre humane Hepatozyten mit WHDV zu infizieren, während umgekehrt HBV-Proteine nicht in der Lage sind primäre Woodchuck Hepatozyten mit hHDV zu infizieren [Gudima *et al.*, 2008]. Die möglichen N-Glykosylierungsstellen (Asn-X-Ser/Thr) an den Positionen N153 (präS2) bzw. N352 (S-Domäne) kommen in allen Hepadnaviren vor [Heermann *et al.*, 1984] und sind in den ASHV-Klonen ebenfalls konserviert.

Im P-ORF konnten insgesamt vier Deletionen im publizierten ASHV_{AGU2914} nachgewiesen werden, die in den ASHV-Klonen nicht vorhanden sind. Die Klone entsprechen an diesen Positionen der Sequenz von GSHV_{K02715} und WHV_{J04514}. Das E-Element des *Enhancer I* (nt 2188-2231), welches bei den Hepadnaviren ebenfalls hoch konserviert ist [Faktor *et al.*, 1990], zeigte auch bei den ASHV-Klonen Wildtypcharakter.

Die am höchsten variable Sequenz in den ASHV-Klonen wurde im X-ORF festgestellt. Die hier gemessenen Variabilitäten entsprechen denen, die bei Vergleichen von unterschiedlichen Säuger-Hepadnaviren mit WHV-Isolaten nachgewiesen wurden [Cohen *et al.*, 1988; Kodama *et al.*, 1985]. Daraus lässt sich schließen, dass die Struktur des X-Proteins relativ flexibel ist.

Auf der Basis der Gesamtsequenz variieren die ASHV-Klone zum publizierten ASHV_{AGU2914} um 12,9 % (ASHV aus dem *Arctic Squirrel*) bzw. 13,0 % (ASHV aus dem *Woodchuck*). Die Divergenz zu GSHV_{K02715} liegt bei 15,9 % und bei WHV_{J04514} bei 14,3 %. Hingegen weicht das publizierte ASHV_{AGU2914} sowohl von GSHV_{K02715} als auch von WHV_{J04514} um ca. 16,0 % ab [Testut *et al.*, 1996]. Somit wird deutlich, dass die in dieser Arbeit analysierten Klone ASHV_{3537_#1} und ASHV_{3P_#1} eine höhere Ähnlichkeit zu WHV_{J04514} aufweisen als das publizierte ASHV_{AGU2914}. Auch Spezies-intern weist das ASHV_{AGU2914} zu den neuen ASHV-Klonen mit knapp 13 % eine recht hohe Variabilität auf, die wesentlich höher liegt als die von verschiedenen WHV-Isolaten untereinander (< 3,5 % Variation) [Cohen *et al.*, 1988]. Die Variabilität ist sogar größer als zwischen den acht unterschiedlichen HBV Genotypen (A-H), die sich in mindestens 8 % der Gesamtgenomsequenz unterscheiden [Norder *et al.*, 2004; Okamoto *et al.*, 1988], aber dennoch geringer als zwischen zwei aviären Hepadnaviren [Sprengel *et al.*, 1988].

Daraus resultiert die Frage, wie die phylogenetischen Beziehung zwischen den drei Hörnchen-Gattungen ist und wie sie sich evolutionär entwickelt haben könnten. Evolutionsstudien über Viren mit einer Transkriptase-Aktivität führten zu dem Schluss, dass die Familie der Hepadnaviren und die Retroviren, ebenso wie das Blumenkohlmosaikvirus (*CMV cauliflower mosaic virus*), von einem gemeinsamen Vorfahren abstammen [Miller und Robinson, 1986; Toh *et al.*, 1983; Xiong und Eickbush, 1990]. Die aviären Hepadnaviren, galten zunächst als die primitiveren Mitglieder der *Hepadnaviridae*, da man dachte, dass ihnen der X-ORF fehlt [Mandart *et al.*, 1984] und die evolutionäre Weiterentwicklung mit der Gewinnung des X-Gens in Beziehung steht. Diese These kann verworfen werden, nachdem ein den Säuger-Hepadnaviren ähnliches X-Protein entdeckt wurde [Chang *et al.*, 2001]. Dennoch weisen die Avihepadnaviren nur 40 % Nukleotidhomologie zu HBV auf [Schaefer, 2007]. Da ASHV und GSHV in die gleiche phylogenetische Gruppe eingeordnet werden [Testut *et al.*, 1996], liegt die Vermutung nahe, dass sich das ASHV zur selben Zeit wie das GSHV, vor rund 10.000 Jahren, von dem gemeinsamen Urahn abgespalten hat. Die Vermutung besteht, dass dabei Virus und Wirt koevolvieren. Bisher konnte von ASHV, GSHV und WHV jeweils nur ein einziger „Genotyp“ beschrieben werden, während sich das humane Hepatitis B Virus in acht Genotypen klassifizieren lässt [Norder *et al.*, 2004]. Die unterschiedlichen Genotypen des HBV sind weitflächig über den gesamten Globus verbreitet, auch wenn die einzelnen Genotypen teilweise mit ethnischen Gruppen korrelieren [Chu *et al.*, 2003]. Die geographische Verbreitung von WHV und GSHV ist dagegen sehr begrenzt und beschränkt sich auf Teile der Vereinigten Staaten (Nord Kalifornien, Oregon, Südosten der USA) und Kanada [Marion *et al.*, 1980; Paronetto und Tennant, 1990; Summers *et al.*, 1978]. Das ASHV konnte bisher nur aus Tieren isoliert werden, deren Habitat sich in der Nähe des *Toolik Lake (Brooks Range)* im Norden Alaskas befindet [Testut *et al.*, 1996]. Die in dieser Arbeit untersuchten Seren stammen aus Tieren, deren Kolonien in der Nähe von *Cantwell* (Mittel,- bzw. Südalaska) beheimatet sind. Die beiden Kolonien sind also durch eine große räumlichen Distanz sowie die zwischen den Fundorten liegenden Gebirgsketten (*Alaska Range* und *Brooks Range*) voneinander getrennt. Es kann also davon ausgegangen werden, dass es sich um zwei unabhängige, mit ASHV-infizierte Tiergruppen handelt, die sich

unterschiedlich von einem gemeinsamen Vorfahren entwickelt haben. Ein weiteres Argument für diese These ist, dass das Arktische Hörnchen (*Spermophilus parryii*) nicht nur in Alaska und Nordkanada, sondern auch rund um die Beringstrasse und in weiten Teilen Russlands (Nordost Jakutien, Sibirien etc.) verbreitet ist. Durch die Absenkung des Meeresspiegel zum Ende der Wisconsin-Eiszeit (Ende Jungpleistozän; ca. 126.000-12.000 Jahre) wurde eine Landverbindung zwischen Nordamerika und Ostsibirien geschaffen, sodass Jagdwild und andere Landtiere, einschließlich des Menschen, über die Landbrücke „Beringias“ nach Nordamerika einwandern konnten. Es wurde gezeigt, dass zwei Arten von Hörnchen in Nord- und Zentralasien mit dem Arktischen Hörnchen in Nordamerika näher verwandt sind, als mit anderen Hörnchenarten, die in Eurasien gefunden wurden [Nikolski und Wallschläger, 1982; Robinson und Hoffman, 1975]. Es ist also durchaus vorstellbar, dass einige der *Arctic Squirrels* vom Asiatischen Kontinent nach Alaska eingewandert sind, sich dort in verschiedenen Habitaten niedergelassen haben und eine unabhängige Entwicklung des ASHV stattgefunden hat, die in unterschiedlichen Sequenzen mit einer Variabilität von bis zu 13 % resultiert. Auch die in Amerika heimischen HBV-Genotypen F, G und H divergieren um bis zu 16,2 % [Schaefer, 2005].

4.2 Untersuchung und Charakterisierung von Seren okkulten HBV-Träger mittels unterschiedlicher Klonierungsverfahren

Die serologische Diagnose einer HBV-Infektion basiert hauptsächlich auf dem Nachweis des Oberflächen-Antigens (HBsAg), welches den Hauptbestandteil der Virushülle bildet. Während der akuten oder chronisch-immuntoleranten Infektion werden neben den HBV-Virionen typischerweise 1.000-10.000-fach größere Mengen an nicht-infektiösen subviralen Partikeln ins Blut sekretiert [Kann und Gerlich, 2005]. Das HBsAg-Screening ist von daher die übliche Methode auch bei der Überprüfung von Blut- und Organspenden. Sind im Serum kein HBsAg [Allain, 2004] aber moderate Mengen an HBV-DNA nachweisbar [Raimondo *et al.*, 2008; Torbenson und Thomas, 2002], wird von einer okkulten HBV Infektion (OBI) gesprochen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden unterschiedliche Seren von

insgesamt fünf okkult HBV-infizierten Blutspendern (Fall A-E) untersucht, deren Spenden teilweise zu einer Transmission von HBV geführt haben [Gerlich *et al.*, 2007]. Mittels Sequenzanalyse sollten daher die auftretenden Hepatitis B Virus-Varianten genauer charakterisiert werden. Dafür wurde die HBV-DNA aus den Seren isoliert und der Bereich des HBsAg mittels spezifischer Primer amplifiziert. Anschließend wurde die DNA in ein Vektorsystem kloniert, sequenziert und die auftretenden Quasispezies in den Klonen analysiert. Als Referenzprobe wurde das Serum eines HBsAg-positiven, immuntoleranten, hoch-virämischen Patienten (K301) verwendet. Dieser Patient wies in 31 untersuchten Klonen insgesamt nur 26 Aminosäure-Austausche (0,21 %) auf, die relativ gleichmäßig über das komplette LHBs verteilt waren. Auffällig ist die Substitution C139R [Mathet *et al.*, 2003], bei der es sich um eine schwerwiegende Mutation handelt, da das Cystein an dieser Position für die Infektion essentiell ist [Salisse und Sureau, 2009]. Allerdings kam diese Mutation nur in zwei der 31 Klone vor, sodass davon ausgegangen werden kann, dass zwar ein geringer Selektionsdruck herrschte, sich die Mutation aber nicht durchsetzen konnte und die Replikation nicht beeinträchtigt wurde. Die HBsAg-Schleife (MHL: *major hydrophilic loop*), die ca. von AS 100-170 reicht, wies insgesamt eine etwas niedrigere Variabilität auf als die beiden präS-Domänen. Diese hohe Konserviertheit der hydrophilen Schleife in HBsAg-positiven Trägern, im Gegensatz zu HBsAg-negativen Patienten, wurde auch in anderen Studien beobachtet [Candotti *et al.*, 2008; Weinberger *et al.*, 2000]. Bei dem untersuchten Patienten K301 waren etwa zwei Drittel der Austausche (69/97) auf Nukleotidebene stumme Mutationen und zeigten somit keine Veränderung in der Aminosäuresequenz. Der daraus errechnete Quotient von nicht-synonymen (d_N : 0,08 %) zu synonymen (d_S : 0,19 %) Austauschen (d_N/N_S) lag unter eins (0,42). Bei Werten über eins wird eine positive Selektion angenommen [Hanada *et al.*, 2007]. Somit deutet dieser niedrige Wert darauf hin, dass hier kein auswirkender Selektionsdruck stattgefunden hat und sich das Virus phänotypisch nicht verändern musste. Dies entspricht der „Neutralen Theorie der molekularen Evolution“ [Kimura, 1983] die besagt, dass die meisten Mutationen keiner natürlichen Selektion unterliegen, da sie nicht zu einer Veränderung des Phänotyps führen. Die neutrale Theorie konnte für die Gene von HBV belegt werden [Gojobori *et al.*, 1990]. Eine Studie zeigt, dass sich die HBV-Sequenz in

einem durch materno-fetale Transmission persistent infizierten Patienten über einen langen Zeitraum nur geringfügig ändert [Okamoto *et al.*, 1987]. Daraus resultiert, dass bei HBV die synonymen Substitutionen im Vergleich zu den non-synonymen vorherrschen [Orito *et al.*, 1989]. Die Probe K301 wurde daher als Referenzprobe verwendet und für den Vergleich mit den okkult HBV-infizierten Serumproben herangezogen.

Die Fälle A (K444, K443) und C (K442) wurden anhand eines Rückverfolgungsverfahrens identifiziert, welches für Blut- und Plasmaspenden im Transplantationsgesetz verankert [Bundesgesundheitsministerium, 1999] und bei vermuteter Übertragung gesetzlich vorgeschrieben ist. Aufgrund der hohen Ähnlichkeit der HBV-Sequenz von Spender (K444) und Empfängerin (K443) konnte die Übertragung bestätigt werden. Bei Fall B (ID384-ID389) handelte es sich um einen Langzeit-Blutspender, der erst identifiziert wurde, nachdem das *Screening* von Blutspenden auf anti-HBc im September 2006 in Deutschland eingeführt wurde [Burger und Offergeld, 2005]. In den Fällen A und B kam es zu einer Transmission von HBV [Gerlich *et al.*, 2007]. In Fall A (K444) wurden sechs Rezipienten identifiziert, wovon eine Empfängerin (K443) an einer Autoimmun-Hepatitis verstarb. Von den anderen fünf Rezipienten wurden drei als anti-HBc positiv identifiziert, entwickelten aber keine Hepatitis. Vom Spender ID384-389 (Fall B) bekamen 13 Personen Erythrozyten-Konzentrate und elf Empfänger Frischplasmen, wovon fünf bzw. alle elf Rezipienten im Nachhinein anti-HBc positiv getestet wurden. Hier wurde aufgrund der Prävalenz von anti-HBc, die in Deutschland bei ca. 7 % liegt [Thierfelder *et al.*, 2001], davon ausgegangen, dass wahrscheinlich alle Spenden infektiös waren. Bei Fall C (K442) zeigte nur einer der vier Rezipienten Anzeichen einer HBV-Infektion. Eine mögliche Übertragung in den Fällen D (K724) und E (K578) wurde durch HBV-DNA Testung der Spenden vermieden.

Bei Betrachtung der serologischen Marker wird klar, dass es sich in den ersten vier Fällen um sogenannte „echte“ OBIs handelt, da bei ihnen kein HBsAg und wesentlich geringere DNA-Mengen (9-310 GE/ml) als die per Definition festgelegten 200 IU/ml HBV-DNA (entsprechen ca. 1000 GE/ml [Saldanha *et al.*, 2001]) im Serum detektiert wurden [Raimondo *et al.*, 2008]. Des Weiteren können diese Fälle als seropositive-OBIs eingestuft werden, denn bei allen wurde

zumindest anti-HBc nachgewiesen [Raimondo *et al.*, 2008]. Der fünfte Fall (K578) stellt eine transiente OBI dar, da zwar kein HBsAg zu detektieren war, aber eine hohe Viruslast vorherrschte (90.000 GE/ml). Hier waren nur zum Zeitpunkt der ersten Abnahme das HBsAg negativ, die HBV-Antikörper und die ALT waren normal. Einen Monat später allerdings war anti-HBc schwach positiv und anti-HBs hoch positiv (> 1000 IU/l), die HBV-DNA ebenfalls schwach positiv und die ALT auf 122 U/l angestiegen [Bremer *et al.*, 2009]. Dieser Fall (Fall E) wird daher gesondert diskutiert, da es sich nicht um einen typischen OBI handelte. Die Klonierung und Analyse der Sequenzen deckte bei den ersten vier Fällen (A-D) eine Vielzahl von Quasispezies auf.

In der präS1-Domäne der vier Fälle A-D wurden generell nur wenige Mutationen festgestellt. Die Variation schwankte bei den nicht-synonymen Austauschungen zwischen 0,75 % (Fall D) und 2,86 % (Fall B_4, ID386). Interessant waren die Mutationen prD16E beim Genotyp D (Fall A, K444+K443) bzw. die korrespondierende Mutation prD27A beim Genotyp A (Fall B, ID384-389) sowie die Mutation sF25L, ebenfalls Genotyp A (Fall C, K442), die alle in der essentiellen Bindedomäne (AS 9-18 bei Genotyp D bzw. AS 20-29 bei Genotyp A) von HBV liegen [Glebe *et al.*, 2005]. Es konnte gezeigt werden, dass HBV-Partikel mit Punktmutationen in dieser Bindedomäne ihre Infektiosität verlieren [Engelke *et al.*, 2006]. Da sich die ausgetauschte Asparaginsäure (prD16E, Fall A) jedoch von Glutaminsäure nur in einer Methylengruppe unterscheidet, ist die Bindung des Virus vermutlich nicht wesentlich beeinträchtigt. Ein weiterer Hinweis dafür ist, dass WMHBV und HBV in dieser Region hoch konserviert sind, aber dass WMHBV an dieser Stelle ebenfalls eine andere Aminosäure (Serin) aufweist [Glebe *et al.*, 2005]. Eine weitere Mutation in der präS1-Domäne wurde bei Fall B und Fall C an Position 104 (prQ104K) detektiert. Die präS1-Region AS 103 - 124 spielt bei HBV eine wichtige Rolle bei der Virionenbildung und ist an der Oberfläche von HBV exponiert [Bruss, 1997]. Eine ähnlich funktionelle Sequenz (AS 116-137) konnte auch in der präS-Domäne von DHBV identifiziert werden [Lenhoff und Summers, 1994]. Für die Umhüllung des Nukleokapsids ist das LHBS essenziell. Fehlt das L-Protein, transportieren die Kapside das virale Genom zurück zum Kern, wo es dann wie bei der initialen Infektion zu einer Amplifikation der cccDNA kommt. Daher können Mutationen innerhalb dieser Domäne dazu

führen, dass aufgrund des fehlenden LHBs die Kapside nicht umhüllt werden [Summers *et al.*, 1990].

Bei Betrachtung der präS2-Domäne fiel besonders bei Fall B (ID384-ID389) und Fall C (K442) die Mutation T173K auf, die sich kurz vor dem Startcodon des SHBs befindet und dominant in allen Klonen vertreten war. Der Austausch von Tyrosin zu Lysin könnte zu Änderungen in der Proteinkonformation führen und vielleicht die Expression des SHBs beeinflussen. Da allerdings auch einige Quasispezies mit Wildtypcharakter vorlagen, kann dieser Defekt vermutlich kompensiert werden. In Fall C (K442) wies ein Klon (Klon 19) einen Austausch im Startcodon von Methionin zu Valin auf (prM120V), wodurch dieser Klon nicht in der Lage ist MHBs zu produzieren.

Die signifikant häufigsten Mutationen waren innerhalb der S-Domäne zu finden, die prinzipiell in drei Teile untergliedert werden kann. Die N-terminale Region (AS 1-99), die HBsAg-Schleife (AS 100-170) und der C-terminale Bereich (AS 171-226) [Stirk *et al.*, 1992], [Schaefer, 2005].

Im N-Terminus des SHBs konnten eine Reihe von Substitutionen festgestellt werden, von denen die interessanteste bei Fall C (K442) auftrat. Dort war das Methionin des SHBs-Startcodons in 16 der 19 Klone mutiert (M1R/L/G/K). Somit kann bei der Translation der 2,1 kb-mRNA, die für präS2- und die S-Region kodiert, nur das erste Codon abgelesen werden [Gallina *et al.*, 1992]. Viren mit dieser Mutation sind also nur in der Lage LHBs und MHBs zu sekretieren, aber kein SHBs. Das Fehlen von SHBs hat weitreichende Folgen, da es den Hauptbestandteil der Virushülle bildet [Ganem und Varmus, 1987; Heermann *et al.*, 1984]. Diese kann dann vermutlich nicht mehr gebildet werden und die HBV-Kapside werden nicht aus der Zelle sekretiert [Bruss und Ganem, 1991]. Wird mehr LHBs im Verhältnis zu SHBs gebildet, kommt es außerdem zur Retention von HBs-Filamenten im ER [Kuroki *et al.*, 1989]. Das Retentionssignal liegt innerhalb der präS1-Region [Gallina *et al.*, 1995] und die Überexpression von LHBs führt zur Bildung von Milchglas-Hepatozyten.

In der C-terminalen S-Domäne konnten ebenfalls eine Reihe von Mutationen nachgewiesen werden, die teilweise mit dem überlappenden P-ORF assoziiert waren. Bei Fall A (Spender K444) konnte bei einem Klon (E19) eine Mutation im YMDD-Motiv (rtM204K) der Polymerase festgestellt werden. Dieses Motiv,

welches auch in anderen RTs hoch konserviert ist [Kamer und Argos, 1984], steht im Zusammenhang mit der Resistenz gegen das Nukleosid-Analogon Lamivudin (LMV) [Locarnini, 2003]. Mutationen innerhalb dieser Sequenz und die damit assoziierte Resistenz wurden allerdings auch schon in chronisch infizierten, unbehandelten Patienten gefunden [Kobayashi *et al.*, 2001]. Generell führt diese Mutation (rtM204) zu einer Replikations-Defizienz [Coffin, 1995] und das Virus versucht diesen Nachteil durch weitere Mutationen zu kompensieren um den ursprünglichen Replikations-Level wieder herzustellen [Ho *et al.*, 1994]. Bei Fall B und C wurden Quasispezies (ID389: Klon 7; K442: Klon11) mit der Mutation rtA181T detektiert, die normalerweise im Laufe der HBV-Therapie mit dem Nukleotid-Analogon Adefovir auftritt und ebenfalls eine Resistenz verursacht [Lacombe *et al.*, 2006]. Diese Mutation ist mit dem S-ORF gekoppelt und löst dort eine Stop-Mutation (sW172stop) aus, sodass kein vollständiges SHBs gebildet werden kann. Viren mit diesem Austausch im S-Protein sind eventuell nicht alleine lebensfähig, aber möglicherweise konnte hier dieser Defekt durch Transkomplementation des Wildtyps ausgeglichen werden [Yeh *et al.*, 2000].

Am stärksten war die HBsAg-Schleife (AS 100-170) in allen vier OBIs mutiert. Hier reichte die Variation von 4,43 % (K724) bis zu 14,43 % (ID387). Insgesamt liegen acht Cysteine in der HBsAg-Schleife, die inter- und intramolekulare Disulfidbrücken bilden [Mangold und Streeck, 1993; Mangold *et al.*, 1995; Salisse und Sureau, 2009], was in einer komplexen dreidimensionalen Struktur resultiert [Gilbert *et al.*, 2005]. Antikörper, die durch eine aktive HBV-Impfung hervorgerufen werden, oder das in den diagnostischen Tests oder im HBIG vorkommende anti-HBs, sind hauptsächlich gegen diese Region des HBsAg gerichtet [Carman *et al.*, 1990; Jilg *et al.*, 1984; Wallace und Carman, 1997]. Eine Änderung der Antigenität des HBsAg aufgrund von Mutationen im SHBs kann also weitreichende diagnostische und immunologische Folgen haben. Die Fälle B, C und D wiesen alle die Mutationen sM103I und sL109H auf, von denen letztere schon in ähnlicher Weise (L109P) beschrieben wurde [Lada *et al.*, 2006]. Bei Fall B, von dem fünf Plasmaspenden aus zehn Monaten analysiert wurden, sind außerdem einige dynamische Quasispezies erkennbar (sG112V, sS117G, sT118P). Diese treten erst im zeitlichen Verlauf der aufeinander folgenden Abnahmen auf und könnten

eine Anpassung des Virus darstellen um sich einen Selektionsvorteil zu verschaffen.

Etliche Mutationen konnten innerhalb der antigenen α -Determinante (AS 121-147) [Brown *et al.*, 1984] detektiert werden. Interessant ist die in Fall B-D auftretende Mutation sP120Q. Es konnte gezeigt werden, dass Deletionen innerhalb der Region AS 118-129 zu einem Verlust der Infektiosität von HDV-Partikeln führt und dass die Domäne AS 119-124 dabei essentiell für die Infektiosität ist [Avellón und Echevarria, 2006; Jaoude und Sureau, 2005; Salisse und Sureau, 2009]. Diese Domäne enthält ein CXXC-Motiv (AS 121-124), welches das katalytische Zentrum einiger konservierter Proteine, unter anderem der Protein-Disulfid-Isomerase (PDI), bildet [Vuori *et al.*, 1992] und auch bei über 100 HBV-Subtypen und HBsAg-Mutanten konserviert ist [Qiu *et al.*, 1996]. In 50 % der Klone bei Fall C (K442) befand sich eine Mutation in diesem CXXC-Motiv (sC121Y/G) und in einem anderen Klon (Klon 28) eine Mutation des Cysteins an Position 147 (sC147R). Diese Austausche können zu Veränderungen der Infektiosität und der Umlagerungen innerhalb der Disulfidbrücken führen [Kohno *et al.*, 1996; Salisse und Sureau, 2009; Weinberger *et al.*, 2000]. Auch bei ID 386 (Fall B) trat bei zwei Klonen (Klon-Nr. 10, 12) eine Mutation innerhalb des CXXC-Motivs auf (sK122R). Unter Berücksichtigung der anderen Subtyp-spezifischen Positionen 160, 127 und 159 [Purdy *et al.*, 2007] ergibt sich hier nun der Subtyp ayw1, während in den anderen vier Abnahmen bei allen Klonen der Subtyp adw2 vorlag. Bei K442 (Fall C) wurde an Position 127 eine Substitution (sP127T) detektiert, die einen Subtypwechsel von adw2 zu adw3 bewirkt [Norder *et al.*, 2004].

In allen vier Fällen (A-D) enthielt das S-Gen eine Reihe hintereinander geschalteter *escape*-Mutationen innerhalb der α -Determinante: sK141E (nur K724) [Karthigesu *et al.*, 1994], sP142L (Fall A) [Wallace und Carman, 1997], sT/S143L/S/A (Fall A, B, C) [Sayiner *et al.*, 2007; Wallace *et al.*, 1994], sD144E/G/A (Fall A, C, D) [Harrison *et al.*, 1994; Wallace *et al.*, 1994] und sG145K (Fall A) [Carman *et al.*, 1990]. Die Positionen 141 und 145 sind entscheidend für das Binden von anti-HBs Antikörpern des rekombinanten Impfstoffs [Steward *et al.*, 1993]. Die Mutation D144E verhindert die konformationelle Anordnung der zwei Schleifen der α -Determinante [Wallace *et al.*, 1994]. Die klassische *Vaccine*-induzierte *escape*-Mutante G145R war hier

allerdings zu Lysin ausgetauscht. Diese Mutation ist zusätzlich mit dem P-ORF (rtW153W) assoziiert und scheint zu einer gesteigerten Replikation von LMV-resistenten Hepatitis B Viren zu führen [Torresi, 2002; Yeh *et al.*, 2000]. Bei Fall B bis D trat zusätzlich eine *escape*-Mutante an Position 130 auf, die allerdings nur bei ID387 zu einem Asparagin (G130N) ausgetauscht war und somit eine zusätzliche potentielle N-Glykosylierungsstelle bildet [Kohno *et al.*, 1996]. Dafür gab es bei Fall A und C je einen Klon (Fall A: Klon E19, Fall C: Klon 28), der die reguläre N-Glykosylierungsstelle an Position 146 [Heermann *et al.*, 1984] mutiert hatte (sN146D bzw. sN146K).

Insgesamt wurden in den vier beschriebenen okkult HBV-infizierten Patienten eine Vielzahl von Mutationen detektiert, was aufgrund der hohen Mutationsrate der reversen Transkriptase nicht verwunderlich ist. Die reverse Transkriptase von HBV ist ein sehr Fehler-anfälliges Enzym und wie bei den Retroviren [Domingo und Holland, 1997] resultiert das in einer großen Anzahl von nt-Substitutionen während der Replikation. Als Folge hat HBV eine Verteilung von „Quasispezies“ in infizierten Individuen, so dass ein Mix aus genetisch unterschiedlichen, aber nahe verwandten Varianten vorliegt [Torresi, 2002]. Neu generierte Mutationen verschaffen diesen Virus-Varianten einen Selektionsvorteil, so dass sie sich gegen andere Varianten durchsetzen können. Solch ein Selektionsprozess kann theoretisch bei jedem Schritt der Infektion, in jedem der vier Gene auftreten. So können beispielsweise HBsAg-Mutanten unter dem Druck der aktiven oder passiven anti-HBs Immunisierung entstehen [Carman *et al.*, 1990; Lada *et al.*, 2006; Torresi, 2002] oder Resistenz-Mutanten im Polymerase-Gen durch die Therapie mit antiviralen Substanzen [Locarnini, 2003].

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Mutationsrate des gesamten S-ORFs höher lag (2,26 % - 5,55 %) als in der reversen Transkriptase des überlappenden P-ORFs (2,52 % - 4,83 %). Die Mutationen waren in den vier beschriebenen Fällen A-D, im Gegensatz zum Kontrollpatienten (K301), nicht gleichmäßig über das gesamte HBsAg verteilt, sondern konzentrierten sich im Bereich der HBsAg-Schleife (AS 100-170). Hier lag die Variation bei 4,43 % bis 14,43 % während im Gegensatz dazu, die präS1-Domäne nahezu konserviert war (0,83 %-2,86 %). Die Variation der MHL liegt also 19-62 Mal höher als bei der HBsAg-positiven Kontrolle, so dass von einer gerichteten Selektion ausgegangen werden kann. Im

Gegensatz zu Candotti *et al.* (2008), die zwar ebenfalls eine Konzentration der Austausch in der MHL feststellten, konnten in den hier untersuchten OBIs allerdings keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Genotypen A und D festgestellt werden. Das Verhältnis der nicht-synonymen zu den synonymen Austauschen wird mit Hilfe des Quotienten d_N/N_S angegeben und gibt ebenfalls einen Hinweis, ob es sich um eine gerichtete Selektion handelt. Da bei den Fällen A-C die Werte des Quotienten alle über eins liegen (1,84-5,86), kann eine positive Selektion angenommen werden [Hanada *et al.*, 2007]. Bei Fall D liegt der Quotient bei 0,59. Da dieser Wert relativ niedrig liegt, kann hier davon ausgegangen werden, dass der Selektionsprozess gerade erst angefangen hat.

Mutationen innerhalb und oberhalb der *a*-Determinante die zum Immun-*escape* und diagnostischen *escape* führen sind seit langem bekannt [Carman *et al.*, 1990; Waters *et al.*, 1992] und auch hier zahlreich nachgewiesen worden. Die Positionen, die in den hier beschriebenen Fällen am häufigsten betroffen waren, lagen bei AS 130-133 und AS 142-145. Aufgrund der vielen Mutationen innerhalb des *a*-Epitops kann zumindest bei Fall A angenommen werden, dass der Blutspender wahrscheinlich im Vorfeld anti-HBs positiv war, da vorhandenes anti-HBs die Selektion von HBsAg-*escape*-Mutanten begünstigt [Shiels *et al.*, 1987]. Dies ist allerdings nur der Fall, wenn neben dem anti-HBs kein Überschuss an HBsAg vorliegt, da anti-HBs sonst abgefangen wird und nicht zur Selektion beitragen kann [Lada *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2007]. Anti-HBs neutralisiert zwar weitestgehend die HBV Infektion *in vitro* und *in vivo*, kann aber die intrazelluläre Replikation von bereits vorhandenen Viren nicht inhibieren. Es wurden auch Fälle beschrieben, in denen es trotz vorhandenem anti-HBs zum Immun-*escape* [Yamamoto *et al.*, 1994] bzw. zur Transmission von HBV kam [Candotti *et al.*, 2008; Levicnik-Stežinar *et al.*, 2008]. Die im HBsAg entstehenden *escape*-Mutanten können sich also der Erkennung und der Neutralisierung durch anti-HBs entziehen, so dass das mutierte Virus in der Lage ist, sich in der Leber auszubreiten und die Infektion aufrecht zu erhalten. In immunsupprimierten Patienten können solche *escape*-Mutanten in Anwesenheit von anti-HBs auch reaktiviert werden und fatale Folgen haben [Awerkiew *et al.*, 2007; Westhoff *et al.*, 2003]. Das Virus versucht also der Immunkontrolle des Wirtes zu entgehen, indem

es die Epitope der Oberflächenproteine sowohl auf B-Zell-Level, als auch auf T-Zell-Ebene verändert [Chisari und Ferrari, 1995].

Der fünfte OBI (Fall E) stellt eine Besonderheit dar, da in diesem Fall der Patient zu Beginn der Abnahmen eine relativ hohe Viruslast aufwies und ist ein Beispiel dafür, dass eine okkulte HBV-Infektion nicht zwangsläufig mit einer niedrigen Virämie assoziiert ist [Raimondo *et al.*, 2008]. Es wurden insgesamt fünf Mutationen im gesamten S-ORF gefunden, von denen drei in der präS-Region und zwei im SHBs vorlagen. Die α -Determinante war in allen essenziellen Bereichen stark konserviert. Die Analyse des Gesamtgenoms deckte einige Mutationen in der präC/C-Region auf. Es konnte eine Stop-Mutation (präCW28stop) detektiert werden, die aus der nt-Substitution G1896A resultiert und zu einem Verlust des HBeAg führt [Carman *et al.*, 1989; Locarnini, 2003]. Das Nukleotid G1896 formt in den Genotypen B, D, E und G normalerweise eine Basenpaarung mit nt 1858 [Bartholomeusz und Schaefer, 2004], so dass Mutationen an Position 1896 die Stabilität der Sekundärstruktur des *encapsidation signals* Epsilon verstärken [Lok *et al.*, 1994]. Diese Mutation kommt unterschiedlich häufig in den verschiedenen Genotypen vor. In Genotyp A oder F ist diese präCore-Stop Mutation selten [Li *et al.*, 1993], während sie bei Genotyp G dominant ist [Kato *et al.*, 2002; Stuyver *et al.*, 2000]. Der Patient im vorliegenden Fall E ist mit HBV Genotyp D infiziert, dort ist diese Mutation in 43 % der Fälle vertreten und somit geläufig [Kao *et al.*, 2000]. Es konnten ebenfalls zwei nt-Mutationen (G1764A, T1765C) im basalen Core-Promotor (BCP) nachgewiesen werden, durch welche die Expression von HBcAg gegenüber HBeAg bevorzugt wird [Buckwold *et al.*, 1996]. In einer Studie wurden diese Mutationen bei Genotyp D in 12 % der klinischen Fälle detektiert [Kao *et al.*, 2000]. Die Mutation G1764A ist oft mit HCC assoziiert [Kao *et al.*, 2003; Kuang *et al.*, 2004], was allerdings wahrscheinlich eine indirekte Assoziation darstellt, da diese Mutation erst spät im Infektionsverlauf erscheint und zu einer gesteigerter HBV-Replikation führt [Blackberg und Kidd-Ljunggren, 2003]. Da kein HBsAg nachweisbar war, lag zunächst die Vermutung nahe, dass für den OBI-Status ebenfalls, wie in den anderen vier Fällen, Mutationen in der MHL verantwortlich sein könnten. Das war hier allerdings nicht der Fall, da insgesamt nur fünf Mutationen im gesamten S-ORF gefunden wurden und keine Austausche innerhalb der α -Determinante. Somit kann ein diagnostischer *escape*

ausgeschlossen werden. Das schnelle Auftreten von anti-HBs bei diesem Patienten lässt eine schnelle T-Zellantwort vermuten, da HBsAg ein T_h-Zell-abhängiges B-Zell Antigen ist [Milich, 1988]. Somit kann auf eine schnelle T-Zellantwort rückgeschlossen werden, die die Expression von HBV-mRNAs und Antigenen herunterreguliert [Guidotti *et al.*, 1994]. Die T-Zell vermittelte Immunselektion wird auch durch die nachgewiesene Heterogenität des P-ORFs favorisiert, wohingegen die HBsAg-Schleife mit den dominanten B-Zell-Epitopen sehr konserviert vorliegt. Auch das Fehlen des Immunmodulators HBeAg aufgrund der Mutationen, trägt zu einer schnellen nicht-zytotoxischen HBsAg-spezifischen T-Zell-Antwort bei, die zu einer niedrigen Expression von HBsAg geführt hat [Bremer *et al.*, 2009].

Das Auftreten des okkulten Infektionsmusters kann unterschiedliche Ursachen haben. Zum einen ist HBsAg beim akuten Infektionsverlauf während der frühen Fensterphase nicht detektierbar, was sich allerdings meist in einem Zeitraum von 30-38 Tagen ändert [Kleinman und Busch, 2006]. Zum anderen kann das Oberflächenantigen nicht während der späten Fensterphase, also kurz vor dem Auftreten von anti-HBs detektiert werden [Raimondo *et al.*, 2007]. OBIs konnten auch bei Individuen beobachtet werden, in denen das HBV auf einem niedrigen Level persistiert [Allain, 2004] oder wenn die erhältlichen Testsysteme nicht in der Lage sind, bestimmte HBV-Varianten zu detektieren [Levicnik-Stežinar, 2004]. Die HBV-Übertragung durch Blutspenden ohne detektierbares HBsAg ist schon seit langem bekannt [Hoofnagle *et al.*, 1975]. Kürzlich wurden erst in einer Studie in Griechenland 21 okkult infizierte Blutspender identifiziert. Die Sequenzanalyse zeigte zahlreiche Mutationen innerhalb der *a*-Determinante [Katsoulidou *et al.*, 2009], wie sie auch in dieser Arbeit hier nachgewiesen wurden. Obwohl diese Vorfälle eigentlich eher selten sind, sollten sie dennoch als ernst zu nehmende Ereignisse eingestuft werden [Offergeld *et al.*, 2005]. Daher werden mittlerweile in einigen Ländern wie Deutschland und Japan, die Blutspenden fakultativ mittels Nukleinsäure-Amplifikations-Tests (NAT) auf das Vorhandensein von HBV-DNA geprüft um das Übertragungsrisiko zu senken [Nübling *et al.*, 2008]. Das Risiko dass eine infektiöse Spende unerkannt bleibt, liegt in Deutschland bei 1:360.000 [Hourfar *et al.*, 2008]. Durch die Anwendung des *Minipool*-NAT konnten bereits einige HBV-Infektionen in der frühen Fensterphase detektiert werden [Meisel *et*

al., 2003; Minegishi *et al.*, 2003], dennoch ist auch dieses System nicht unfehlbar, da ihm oftmals die Sensitivität fehlt. Bei einer nosokomialen Kettenübertragung wurde der Empfänger, trotz Testung des Erythrozyten-Konzentrat im NAT, mit HBV infiziert [Furtwängler *et al.*, 2006]. Die Anwendung von Einzelspenden-NAT wäre wahrscheinlich sensitiver, würde aber vermutlich bei der routinemäßigen Anwendung den Kostenrahmen sprengen. Ein weiterer Aspekt der in Betracht gezogen werden sollte ist, dass die geläufigen Impfstoffe alle gegen die S-Domäne gerichtet sind. Da diese allerdings wie gezeigt werden konnte, im Gegensatz zur präS1-Domäne einer hohen Variabilität unterliegt, stellt sich die Frage, ob die präS1-Domäne nicht ein besseres Ziel für diagnostische Tests oder bei der Entwicklung neuer HBV-Impfstoffe wäre.

4.3 Expression von Hepatitis B Virusproteinen in humanen Hepatom-Zelllinien

Etablierte Zelllinien wie die humanen Hepatom-Zelllinien HepG2 [Aden und Fogel, 1979] oder Huh7 [Nakabayashi *et al.*, 1982] sind in der Regel nicht für das Hepatitis B Virus suszeptibel [Lu *et al.*, 1996; Qiao *et al.*, 1994]. Lediglich zwei Arbeitsgruppen konnte bisher die Suszeptibilität von HepG2-Zellen für HBV berichten [Bchini *et al.*, 1990; Paran *et al.*, 2001], was aber nicht bestätigt werden konnte. Obwohl diese Zellen offensichtlich nicht auf natürlichem Weg mit HBV infiziert werden können, sind sie durchaus in der Lage nach transienter oder stabiler Transfektion mit HBV-DNA, effizient zu replizieren und infektiöse HBV-Partikel zu sekretieren [Ladner *et al.*, 1997; Sells *et al.*, 1987; Sureau *et al.*, 1986]. Im ersten Schritt wurden im Rahmen dieser Arbeit die beiden Hepatomzelllinien HepG2 und Huh7 mit unterschiedlichen Konstrukten transient transfiziert und die Transfektionseffizienz verglichen. Als Plasmide wurden zwei unterschiedliche Konstrukte verwendet, die beide nach Transfektion in humane Hepatomzellen HBsAg sekretieren können [Bruss und Ganem, 1991]. Das Plasmid pRVHBV1.5 codiert für ein Überlängengenom (1.5mer), das andere Plasmid pSVB45H codiert für das LHBs des HBV-Wildtyps. Es konnte im ELISA eindeutig nachgewiesen werden, dass bei Transfektion mit gleichen Mengen Plasmid-DNA die HepG2-Zellen mehr HBsAg exprimieren als die Huh7-Zellen. Das könnte daran liegen,

dass die HepG2-Zellen am Tag der Transfektion eine höhere Konfluenz auf der Platte aufwiesen, oder dass das Transfektionsagens welches für die HepG2-Zellen verwendet wurde, das Plasmid effizienter in die Zelle geschleust hat und somit mehr HepG2-Zellen transfiziert wurden. Ein weiterer Aspekt ist, dass die Huh7-Zellen im Vergleich zu den HepG2-Zellen so schnell gewachsen sind, so dass sie spätestens nach drei Tagen passagiert werden mussten. Durch häufiges Passagieren der Zellen kommt es häufig zu einem Verlust der Plasmide, wodurch ebenfalls die geringere HBsAg-Sekretion zu erklären wäre. Um ein schnelles Wachstum zu verhindern, wurde für die Kultivierung der Zellen ein spezielles Medium verwendet, welches DMSO, Dexamethason und nur geringe Mengen FKS enthält. Da die Transkription der HBV-Gene abhängig vom Differenzierungsgrad der Zelle ist, liegt die Vermutung nahe, dass Differenzierungs-induzierende Zellkulturbedingungen die HBV-Produktion verstärken können [Glebe *et al.*, 2001]. Es konnte gezeigt werden, dass die Behandlung von Hepatozyten mit DMSO sowohl die Expression von Hepatozyten-spezifischen Differenzierungsmarkern [De La Vega und Mendoza-Figueroa, 1991] als auch die Expression von HBV verstärkt [Gripon *et al.*, 1989]. Die Kultivierung von hepatomen Zellen in Anwesenheit von DMSO und niedrigen Mengen an FKS führt zu einem Zellzyklus-Arrest [Kost und Michalopoulos, 1991], wodurch die Proliferation der HepG2-Zellen inhibiert ist. Dieses verlangsamte Zellwachstum begünstigt aus ungeklärten Gründen die Produktion von Viruspartikeln. Das Dexamethason aktiviert den Glucocorticoid-Rezeptor, welcher an das GRE (*glucocorticoid response element*) bindet. Diese Bindung verstärkt ebenfalls die Transkription um das Zwei- bis Fünffache [Tur-Kaspa *et al.*, 1986]. Da die Handhabung der HepG2-Zellen einfacher und ihre Sekretionsrate höher war, wurden die weiteren Versuche an HepG2-Zellen durchgeführt, auch wenn sich laut Literatur Huh7-Zellen effizienter als HepG2-Zellen transfizieren lassen [Chang *et al.*, 1987]. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass transfizierte HepG2-Zellen wohl eher die Situation eines chronischen HBV-Trägers widerspiegeln, da sie im Gegensatz zu Huh7-Zellen vergleichbare Mengen Filamente produzieren können [Roingear und Sureau, 1998]. Des weiteren waren die Mengen an detektiertem HBsAg nach Transfektion mit dem 1.5mer (pRVHBV1.5) deutlich höher als mit dem LHBs-codierenden Plasmid (pSVB45H). Das ist nicht verwunderlich, da das Überlängengenom nicht

nur in der Lage ist, in der infizierten Zelle replikationskompetente Nachkommen zu produzieren, sondern auch zu einer intranukleären Akkumulation von cccDNA. Durch den intrazellulären Rücktransport des Genoms in den Kern kommt es zu einer Amplifikation der cccDNA [Kann *et al.*, 2007] und einer vermehrten Produktion von Virionen und subviralen Partikeln, deren SHBs im ELISA detektiert werden kann. Ein weiterer Grund könnte sein, dass das Plasmid pSVB45H unter der Kontrolle eines SV40-Promotors steht. Dieser Promotor ist für die Transkription des LHBs zuständig, während MHBs und SHBs von dem internen PräS₂/S-Promotor transkribiert werden [Bruss und Ganem, 1991]. Sowohl der SV40-Promotor, als auch der M/SHBs-Promotor werden durch den ubiquitär vorkommenden Transkriptionsfaktor Sp1 aktiviert [Dyanan und Tjian, 1983; Raney *et al.*, 1992]. Dennoch könnte es sein, dass die Verwendung eines HBV-fremden Promotors irgendeine Auswirkung auf die Transkriptionsrate hat.

In folgenden Experiment wurde ein kloniertes HBV-Gesamtgenom (Genotyp A) samt Vektorsystem in HepG2-Zellen transfiziert. Als Referenz wurde eine Transfektion mit dem bereits beschriebenen 1.5mer angesetzt. Für die Gesamtgenom-Klonierung wurden Primer gewählt [Günther *et al.*, 1995], die an der *nick*-Region von HBV an Position nt 1821 (P1) bzw. nt 1825 (P2) ansetzen. Dadurch kann vermieden werden, dass die Elongation über diese diskontinuierliche Stelle, an der das Genom dreifach vorliegt [Will *et al.*, 1987], hinweg laufen muss, was zu einer bis zu 1000-fach schwächeren Amplifikation führen würde [Köck und Schlicht, 1993]. Zusätzlich beinhalten die Primer Schnittstellen für mehrere Restriktionsenzyme, unter anderem die Schnittstellen für SapI, die das HBV-Genom rechts und links flankieren [Günther *et al.*, 1995]. Nach Klonierung kann je nach Fragestellung das Gesamtgenom also wieder aus dem Vektor geschnitten werden. Hier wurde zunächst die Expression des ungeschnittenen Vektors untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von HBsAg im artifiziellen System (pRVHBV1.5) war fast vier Mal höher ist als im klonierten HBV-Konstrukt (1.0mer). Dieses Ergebnis ist nachvollziehbar, da das HBV-Genom im Klonierungsvektor nicht in seiner nativen Form vorliegt, sondern linear. Da es sich nur um ein 1.0mer handelt, kann keine Replikation stattfinden. Die Minimallänge einer replikationskompetenten HBV-DNA im Vektorsystem ist ein 1.28-faches Genom [Tacke *et al.*, 2004]. Obwohl das

Genom linear vorliegt, kann HBsAg exprimiert werden, da die Transkription der Oberflächenproteine von den internen HBV-Promotoren präS1 und präS2/S gesteuert wird. Ein weiterer Grund, warum die Expression des HBsAg bei diesem 1.0mer HBV-Konstrukt niedriger ist, könnte sein, dass der poly(A)-Schwanz bei den beiden mRNAs des HBsAg (2,1 kb und 2,4 kb) fehlt. HBV besitzt nur ein einziges Polyadenylierungs-Signal (TATAAA) das in allen Säuger-Hepadnaviren konserviert ist und kurz hinter dem Start des präC/C-Gens liegt [Simonsen und Levinson, 1983]. Dadurch, dass das HBV-Genom linear so im Vektor liegt, dass das Signal am Anfang der Sequenz positioniert ist, kann nach der Transkription keine Polyadenylierung stattfinden. Dadurch wird die Stabilität und die Translation der mRNAs negativ beeinflusst, wodurch eine geringere Sekretionsrate zu erklären wäre.

Im nächsten Schritt wurde die Sekretion von HBsAg und HBeAg von transient transfizierten HepG2-Zellen untersucht. Dazu wurden Klonierungs-Konstrukte von unterschiedlichen HBV-Genotypen sowohl ungeschnitten als auch mit SapI geschnitten in die Zellen transfiziert. Durch das Herausschneiden mit SapI aus dem Vektor kann das HBV-Genom durch zelluläre Ligasen zur cccDNA rezirkularisiert werden [Günther *et al.*, 1995]. Hier kann also, im Gegensatz zum linear inserierten HBV-Genom, die Replikation und alle folgenden Schritte stattfinden, und somit müsste HBeAg detektierbar sein und HBsAg in höheren Mengen vorliegen. Das konnte im Versuch bestätigt werden. Die HBsAg-Sekretion fiel bei den geschnittenen Ansätzen generell höher als bei den Plasmiden mit dem eingebauten HBV-Genom. Außerdem fiel auf, dass es Unterschiede zwischen den drei Genotypen in der HBsAg-Expression gab, obwohl alle Ansätze mit stöchiometrisch gleichen Mengen DNA transfiziert wurden. Genotyp A zeigte die stärkste HBsAg-Sekretion, gefolgt von Genotyp D und Genotyp G. Das konnte auch bei [Sugiyama *et al.*, 2006] beobachtet werden, allerdings wurde hier Genotyp G nicht untersucht. Bei Betrachtung der HBeAg-Sekretion zeigte nur Genotyp A ein positives Ergebnis. Da Genotyp G allerdings zwei translationale Stop-Codons im Bereich der präCore Region aufweist [Stuyver *et al.*, 2000] und somit kein HBeAg sezernieren kann wurde in diesem Fall auch kein positives Resultat erwartet. Der negative HBeAg-Befund für den Ansatz gtD-SapI entsprach hingegen nicht den Erwartungen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass

Genotyp D sogar größere Mengen an HBeAg exprimiert als Genotyp A [Sugiyama *et al.*, 2006]. Durch Sequenzanalyse konnte eine Mutation in der akzessorischen Domäne II im präS1 detektiert werden (prN35D) und zwei weitere Mutationen in der S-Domäne (sF8L, sQ129H). Die Mutation sF8L liegt in der putativen Fusionsdomäne [Berting *et al.*, 2000], aber da die HBV-DNA mittels Transfektion in die Zelle gebracht wurde, sollte keine negative Auswirkung erkennbar sein. Die Substitution sQ129H befindet sich innerhalb der *a*-Determinante, aber diese AS ist für den Infektionsprozess nicht essentiell [Salisse und Sureau, 2009]. Es wurden keine Mutationen im *Core*-Promotor oder *enhancer II* wie A1762T oder G1764A nachgewiesen. Von daher kann ausgeschlossen werden, dass Mutationen für die geringen HBeAg-Werte verantwortlich sind. Ein weiterer Aspekt ist, dass die Mengen an HBsAg nicht mit den Mengen an sekretiertem HBeAg korrelieren [Sugiyama *et al.*, 2006]. Obwohl Genotyp A einen hohen HBsAg-Wert und ein positives HBeAg-Ergebnis zeigt, muss bei Genotyp D trotz moderater HBsAg-Sekretion nicht zwangsläufig auch ein positives HBeAg-Resultat auftreten. Der im Vergleich hohe HBeAg-Wert bei Genotyp A kann eventuell auf eine Kreuzreaktion des HBeAg-Testsystems mit HBcAg zurückgeführt werden. Es wurde beobachtet, dass das von HepG2.2.15-Zellen sekretierte *Core* ebenfalls im Test detektiert wird, was zu hohen HBeAg- Messwerten führt [D. Glebe, persönliche Mitteilung].

4.4 Neutralisierungspotential aus Serum gereinigter Antikörper gegen die HBV-Oberflächenproteine

Durch das Fehlen geeigneter Zelllinien oder Tiermodelle ist es schwierig, die frühen Schritte der HBV Infektion *in vitro* zu untersuchen. Da HBV sehr wirtsspezifisch ist, galten lange Zeit nur primäre Hepatozyten von Mensch und Schimpanse als suszeptibel [Gripon *et al.*, 1988]. Ende der achtziger Jahre wurden jedoch Versuche zur Infizierbarkeit an Hepatozyten des ostasiatischen Spitzhörnchens *Tupaia belangeri* durchgeführt [Köck *et al.*, 2001; Li *et al.*, 1995; Su, 1987; Walter *et al.*, 1996; Yan *et al.*, 1996]. Heute gelten primäre *Tupaia* Hepatozyten (PTH) als zuverlässiges Infektionssystem, die sich sowohl *in vivo* als auch *in vitro* mit dem Hepatitis B Virus infizieren lassen [Glebe *et al.*, 2003; Glebe *et al.*, 2005]. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Infektions-

und Neutralisationsversuche *in vitro* an isolierten primären Tupaia Hepatozyten durchgeführt.

Ein Aspekt der untersucht werden sollte war die Frage, ob anti-HBs, welches gegen normales HBsAg generiert wurde, in der Lage ist, die durch *escape*-Mutanten verursachte HBV-Infektion *in vitro* zu neutralisieren. Da allerdings gezeigt wurde, dass Bestandteile des humanen Serums die Bindung von HBV an primäre Tupaia Hepatozyten hemmen [Köck *et al.*, 2001], mussten zunächst die Immunglobuline möglichst schonend aus dem Serum isoliert werden um anschließend ihre Funktionsfähigkeit im Infektionsversuch zu testen. Protein A und Protein G werden häufig für die Bindung und Detektion von IgG-Antikörpern verwendet, die über den Fc-Teil der schweren Kette gebunden werden. Der Nachteil ist, dass andere Klassen von Immunglobulinen nicht mit Protein A und G reagieren. Um die Immunglobuline möglichst vollständig aus dem Serum zu isolieren, wurde mit Protein L gearbeitet, welches eine Affinität zu den leichten Ketten der Immunglobuline aufweist und somit ein breites Bindungsspektrum bietet [Bjorck, 1988; Myhre und Erntell, 1985].

Zunächst wurde versucht, die HBV-Infektion experimentell mit Protein L-gereinigtem anti-HBs einer vakzinierten Person zu inhibieren. Eine vollständige Inhibition der Infektion wurde hier im *in vitro*-Modell bei 30 mIU/ml anti-HBs erreicht. Dieser Wert liegt ungefähr in der Größenordnung wie er in der Literatur beschrieben wird. Es wird davon ausgegangen, dass nach aktiver Impfung oder durchgemachter HBV-Infektion, ein Serumschutz gegen eine (erneute) Infektion vorliegt wenn ein anti-HBs Level von über 10 mIU/ml vorliegt [Cornberg *et al.*, 2007]. In Großbritannien wurde die Menge an anti-HBs für die Seroprotektion neu definiert und auf ≥ 100 mIU/ml angehoben [Shouval, 2003].

Nachdem gezeigt wurde, dass die Infektion mit aufgereinigtem anti-HBs inhibierbar ist, wurden nun die fünf Seren des Blutspenders aus Fall B (ID384-ID389) mittels Protein L aufgereinigt und in den Neutralisationsversuch eingesetzt. Die Seren dieses Blutspenders waren zwar anti-HBs negativ, aber die vielen immer wieder neu auftretenden *escape*-Mutationen ließen vermuten, dass doch anti-HBs vorlag, welches aber im normalen Test nicht erkannt wurde. Hier konnte keine signifikante Inhibition der HBV-Infektion erreicht werden, was im Einklang

mit den beobachteten HBV-Übertragungen auf die Blutempfänger steht. Die Sequenzanalyse des HBsAg dieses Patienten ergab eine Reihe von *escape*-Mutanten in der HBsAg-Schleife (3.2.4.6), die alleine oder in Kombination die Detektion von HBsAg beeinträchtigen können [Coleman *et al.*, 1999; Hsu *et al.*, 1999]. Mutmaßlich hat sich das anti-HBs parallel zum HBsAg entwickelt. Dadurch könnte das mutierte anti-HBs eventuell nicht mehr in der Lage sein, die HBV-Infektion mit dem Wildtyp zu inhibieren.

5 Zusammenfassung

Hepatitis B Virus (HBV) ist eines der wichtigsten humanpathogenen Viren. Da HBV schwierig zu untersuchen ist werden oft Modellviren aus derselben Familie (*Hepadnaviridae*) verwendet. Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurden natürlich auftretende Virus-Varianten im Genus *Orthohepadnavirus* näher charakterisiert. Dazu wurden zunächst Genom-Abschnitte des Arktischen Hörnchen Hepatitis Virus (ASHV) kloniert, sequenziert und dann einer Sequenzanalyse unterzogen. Es wurden zwei ASHV-Seren untersucht, von denen die eine Probe aus einem chronisch mit ASHV infizierten Arktischen Hörnchen stammte (ASHV_{3P}), die andere aus einem experimentell, akut mit ASHV infizierten Waldmurmeltier (ASHV₃₅₃₇). Die beiden Klon-Sequenzen unterschieden sich auf Nukleotidebene nur um 0,3 %, so dass die Notwendigkeit einer Anpassung an den neuen, phylogenetisch verwandten Wirt (Waldmurmeltier) weitgehend ausgeschlossen werden konnte. Die Nukleotid-Differenz der beiden Klone ASHV_{3P} und ASHV₃₅₃₇ zur publizierten Sequenz ASHV_{AGU29144} [Testut *et al.*, 1996] lag dagegen überraschenderweise bei 13,0 % bzw. 12,9 %. Daher handelte es sich um einen neuen Genotyp des ASHV, der vom zuerst beschriebenen Genotyp fast so weit entfernt war wie von den entsprechenden Viren in Waldmurmeltieren (WHV) oder Erdhörnchen (GSHV).

Im zweiten Teil der Arbeit wurden Quasispezies von HBV-Varianten bei okkulten Hepatitis B Infektionen (OBI) in 14 Serumproben analysiert. Die OBI ist ein zunehmendes Problem bei der Sicherheit von Blutspenden und bei der immunsuppressiven Behandlung von Patienten. Sie zeichnet sich durch Nichtnachweisbarkeit der, an sich vorhandenen, HBV-Surface-Proteine aus. Die Gründe dafür sind nicht genau bekannt, eine Immunselektion von Mutanten wird vermutet. Es wurde hier nachgewiesen, dass die Mutationsrate im offenen Leserahmen der HBV-Surface-Proteine (S-ORF) höher lag als im überlappenden Polymerase-ORF. Es wurde eine besonders hohe Variabilität in der Antigen-Schleife der HBV-Surface-Proteine detektiert (4,43 %-14,43 %), während die für die Virusanheftung essenzielle PräS-Domäne im Vergleich stärker konserviert war (0,83 %-2,86 %). Daraus resultierte eine 19 bis 62 Mal höhere Variabilität für die HBsAg-Schleife bei den OBIs als bei „normalen“ HBsAg-positiven HBV-

Infektionen. Es wurde eine Reihe von *escape*-Mutanten identifiziert, obwohl die Proben keinen messbaren protektiven Antikörper (anti-HBs) enthielten. Dennoch kann von einer gerichteten Selektion im S-ORF ausgegangen werden, da die Differenzierung in synonyme und nicht-synonyme Substitutionen eindeutig gezeigt hat, dass sich die Mehrheit der Mutationen direkt auf die AS-Sequenz des S-ORF auswirkt. Das Virus versucht also der Immunkontrolle des Wirtes durch Veränderungen der variierbaren B- Zell-Epitope in den Surface-Proteinen zu entgehen.

Im letzten Teil der Arbeit wurden zum einen HBV-Konstrukte in einem etablierten Zellkultursystem exprimiert, zum anderen wurde versucht die HBV-Infektion mit affinitätsgereinigten, neutralisierenden Antikörpern im Primären Tupaia Hepatozyten -Infektionssystem zu inhibieren. Eine vollständige Inhibition der HBV-Infektion wurde allerdings nur bei Konzentrationen von 30 mIU/ml anti-HBs einer vakzinierten Person erreicht.

6 Summary

Hepatitis B Virus (HBV) is one of the most important human pathogenic viruses. Due to difficulties in the investigation of HBV it is common to use model systems of the same family (*Hepadnaviridae*). In the first part of this thesis naturally occurring viral variants of the genus *Orthohepadnavirus* were characterised. For this purpose genome fragments of the Arctic Squirrel Hepatitis Virus (ASHV) were cloned, sequenced and subsequently analysed. Two sera of ASHV were investigated, one from a chronically ASHV-infected Arctic squirrel (ASHV_{3P}) and another from an acute experimentally ASHV-infected woodchuck (ASHV₃₅₃₇). Both sequences diverged only by 0.3% on the nucleotide-level so that the necessity of an adaptation to the phylogenetically related host (woodchuck) can for the most part be ruled out. Surprisingly, the differences in nucleotides between the two ASHV-clones and the published ASHV_{AGU29144} sequence were about 12.9% and 13.0%, respectively. Hence a new ASHV genotype was identified, which is almost as far removed from the published ASHV genotype as the corresponding viruses of the woodchuck (WHV) or the Ground Squirrel (GSHV).

In the second part of the thesis viral quasispecies of HBV variants during an occult HBV infection (OBI) were analysed in 14 serum samples. OBI is a severe problem for safety in blood donations and immune suppressive therapy of patients. It is characterized by the non-detectability of existent HBV surface proteins. The reasons are not fully known but an immune selection of mutants is assumed. In this study the mutation rate of the surface protein open reading frame (S-ORF) was shown to be higher than in the overlapping polymerase-ORF. Within the antigenic loop of the HBV surface proteins a particularly high variability was detected (4.43% - 14.43%), whereas the preS-domain, which is essential for virus adsorption, showed a comparatively higher degree of conservation (0.83% - 2.86%). Hence, in the case of OBI the antigenic loop shows a variability 19 to 62 times higher than “normal” HBsAg positive HBV infections. A number of escape mutations were identified, although the samples did not contain detectable protective antibodies (anti-HBs). However, a directed selection process on the S-ORF can be expected, because the differentiation into synonymous and non-synonymous substitutions demonstrated that the majority of substitutions had an

effect on the amino acids of the S-ORF. The virus attempts to escape the host immune control by altering the variable B-cell epitopes of the surface proteins.

The aim of the last part of this study was to express HBV-constructs in established cell culture systems and to inhibit the HBV infection in primary Tupaia hepatocytes by affinity-purified, neutralising antibodies. A complete inhibition of the HBV infection was only achieved by using anti-HBs from a vaccinated person at concentrations of 30 mIU/ml.

7 Literaturverzeichnis

- Acs G, Sells MA, Purcell RH, Price P, Engle R, Shapiro M und Popper H.** 1987. Hepatitis B virus produced by transfected Hep G2 cells causes hepatitis in chimpanzees. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**:4641-44.
- Aden DP und Fogel A.** 1979 Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature* **282**:615-6.
- Alexopoulou A, Karayiannis P, Hadziyannis SJ, Hou J, Pickering J, Luo K und Thomas HC.** 1996. Whole genome analysis of hepatitis B virus from four cases of fulminant hepatitis: genetic variability and its potential role in disease pathogenicity. *J Viral Hepat* **3**:173-81.
- Allain JP.** 2004a. Occult hepatitis B virus infection: implications in transfusion. *Vox Sang* **86**:83-91.
- Allain JP.** 2004b. Occult hepatitis B virus infection. *Transfus Clin Biol* **11**:18-25.
- Allain JP.** 2005. Occult hepatitis B virus infection. *Hepatitis B Annual* **1**:14-30.
- Allen MI, Deslauriers M, Andrews CW, Tipples GA, Walters KA, Tyrrell DL, Brown N und Condreay LD.** 1998. Identification and characterization of mutations in hepatitis B virus resistant to lamivudine. *Lamivudine Clinical Investigation Group. Hepatology* **27**:1670-7.
- Almeida JD, Rubenstein D und Stott EJ.** 1971. New antigen-antibody system in Australia-antigen-positive hepatitis. *Lancet* **2**:1225-7.
- Araujo NM, Mello FCA, Yoshida CFT, Niel C und Gomes SA.** 2004. High proportion of subgroup A' (genotype A) among Brazilian isolates of Hepatitis B virus. *Archives of Virology* **149**:1383-95.
- Arauz-Ruiz P, Norder H, Robertson BH und Magnius LO.** 2002. Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *J Gen Virol* **83**:2059-73.
- Avellón A und Echevarria JM.** 2006. Frequency of hepatitis B virus *Isquoarsquo* determinant variants in unselected Spanish chronic carriers. *Journal of medical virology* **78**:24-36.
- Awerkiew A, Däumer M, Reiser M, Wend UC, Pfister H, Kaiser R, Willems WR und Gerlich WH.** 2007. Reactivation of an occult hepatitis B virus escape mutant in an anti-HBs positive, anti-HBc negative lymphoma patient. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* **38**:83-86.

- Bancroft WH, Mundon FK und Russell PK.** 1972. Detection of additional antigenic determinants of hepatitis B antigen. *J Immunol* **109**:842-8.
- Barker LF, Maynard JE, Purcell RH, Hoofnagle JH, Berquist KR und London WT.** 1975. Viral hepatitis, type B, in experimental animals. *Am J Med Sci* **270**:189-95.
- Bartenschlager R, Junker-Niepmann M und Schaller H.** 1990. The P gene product of hepatitis B virus is required as a structural component for genomic RNA encapsidation. *Journal of virology* **64**:5324-32.
- Bartenschlager R und Schaller H.** 1988. The amino-terminal domain of the hepadnaviral P-gene encodes the terminal protein (genome-linked protein) believed to prime reverse transcription. *The EMBO journal* **7**:4185-92.
- Bartholomeusz A und Schaefer S.** 2004. Hepatitis B virus genotypes: comparison of genotyping methods. *Reviews in Medical Virology* **14**:3-16.
- Bauer T, Weinberger K und Jilg W.** 2002. Variants of two major T cell epitopes within the hepatitis B surface antigen are not recognized by specific T helper cells of vaccinated individuals. *Hepatology* **35**:455-65.
- Baumert TF, Rogers SA, Hasegawa K und Liang TJ.** 1996. Two core promoter mutations identified in a hepatitis B virus strain associated with fulminant hepatitis result in enhanced viral replication. *J Clin Invest* **98**:2268-76.
- Baumert TF, Thimme R und von Weizsacker F.** 2007. Pathogenesis of hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol* **13**:82-90.
- Bchini R, Capel F, Dauguet C, Dubanchet S und Petit MA.** 1990. In vitro infection of human hepatoma (HepG2) cells with hepatitis B virus. *J. Virol.* **64**:3025-32.
- Beasley RP, Hwang LY, Lin CC und Chien CS.** 1981. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22 707 men in Taiwan. *Lancet* **2**:1129-33.
- Berting A, Fischer C, Schaefer S, Garten W, Klenk HD und Gerlich WH.** 2000. Hemifusion activity of a chimeric influenza virus hemagglutinin with a putative fusion peptide from hepatitis B virus. *Virus research* **68**:35-49.
- Bichko V, Pushko P, Dreilina D, Pumpen P und Gren E.** 1985. Subtype ayw variant of hepatitis B virus. DNA primary structure analysis. *FEBS Lett* **185**:208-12.
- Bjorck L.** 1988. Protein L. A novel bacterial cell wall protein with affinity for Ig L chains. *J Immunol* **140**:1194-97.

- Blackberg J und Kidd-Ljunggren K.** 2003. Mutations within the hepatitis B virus genome among chronic hepatitis B patients with hepatocellular carcinoma. *Journal of medical virology* **71**:18-23.
- Block GD, Locker J, Bowen WC, Petersen BE, Katyal S, Strom SC, Riley T, Howard TA und Michalopoulos GK.** 1996. Population expansion, clonal growth, and specific differentiation patterns in primary cultures of hepatocytes induced by HGF/SF, EGF and TGF alpha in a chemically defined (HGM) medium. *J Cell Biol* **132**:1133-49.
- Block TM, Guo H und Guo JT.** 2007. Molecular virology of hepatitis B virus for clinicians. *Clin Liver Dis* **11**:685-706, vii.
- Blumberg BS, Alter HJ und Visnich S.** 1965. A "New" Antigen in Leukemia Sera. *Jama* **191**:541-6.
- Blumberg BS, Gerstley BJ, Hungerford DA, London WT und Sutnick AI.** 1967. A serum antigen (Australia antigen) in Down's syndrome, leukemia, and hepatitis. *Ann Intern Med* **66**:924-31.
- BGM.** 1999. Ergänzende Empfehlungen zur Testung von Blut- und Plasmaspenden und zum Rückverfolgungsverfahren. *Bundesgesundheitsblatt* **42**:888-92.
- Bock CT, Schranz P, Schroder CH und Zentgraf H.** 1994. Hepatitis B virus genome is organized into nucleosomes in the nucleus of the infected cell. *Virus genes* **8**:215-29.
- Borisova GP, Pumpen PP, Bychko VV, M PP und V. KY.** 1984. Structure and expression in *Escherichia coli* cells of the core antigens of the human hepatitis B virus (HBV). *Dokl Akad Nauk SSSR* **279**:1245-9.
- Bréchet C, Thiers V, Kremsdorf D, Nalpas B, Pol S und Paterlini-Bréchet P.** 2001. Persistent hepatitis B virus infection in subjects without hepatitis B surface antigen: Clinically significant or purely "occult"? *Hepatology* **34**:194-203.
- Bremer CM, Saniewski M, Wend UC, Torres P, Lelie N, Gerlich WH und Glebe D.** 2009. Transient occult hepatitis B virus infection in a blood donor with high viremia. *Transfusion*.
- Brown SE, Howard CR, Zuckerman AJ und Steward MW.** 1984. Affinity of antibody responses in man to hepatitis B vaccine determined with synthetic peptides. *Lancet* **2**:184-7.
- Bruss V.** 1997. A short linear sequence in the pre-S domain of the large hepatitis B virus envelope protein required for virion formation. *Journal of virology* **71**:9350-7.

- Bruss V und Ganem D.** 1991. The role of envelope proteins in hepatitis B virus assembly. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **88**:1059-63.
- Buckwold VE, Xu Z, Chen M, Yen TS und Ou JH.** 1996. Effects of a naturally occurring mutation in the hepatitis B virus basal core promoter on precore gene expression and viral replication. J. Virol. **70**:5845-51.
- Burger R und Offergeld R.** 2005. Erhöhung der Sicherheit von zellulären Blutkomponenten und quarantäne-gelagertem Frischplasma durch Untersuchung der Blut- und Plasmaspenden auf Antikörper gegen das Hepatitis-B-Core-Antigen (Anti-HBc). Bundesgesundheitsblatt **48**:698-99.
- Burger R und Offergeld R.** 2008. Meldung von Spendern mit Antikörpern gegen das Hepatitis-B-Core-Antigen (Anti-HBc). Bundesgesundheitsblatt **51**:1219-19.
- Candotti D, Grabarczyk P, Ghiazza P, Roig R, Casamitjana N, Iudicone P, Schmidt M, Bird A, Crookes R, Brojer E, Miceli M, Amiri A, Li C und Allain JP.** 2008. Characterization of occult hepatitis B virus from blood donors carrying genotype A2 or genotype D strains. Journal of hepatology **49**:537-47.
- Carman WF, Jacyna MR, Hadziyannis S, Karayiannis P, McGarvey MJ, Makris A und Thomas HC.** 1989. Mutation preventing formation of hepatitis B e antigen in patients with chronic hepatitis B infection. Lancet **2**:588-91.
- Carman WF, Trautwein C, Deursen Jv, Colman K, Dornan E, McIntyre G, Waters J, Kliem V, Müller R, Thomas HC und Manns MP.** 1996. Hepatitis B virus envelope variation after transplantation with and without hepatitis B immune globulin prophylaxis. Hepatology **24**:489-93.
- Carman WF, Zanetti AR, Karayiannis P, Waters J, Manzillo G, Tanzi E, Zuckerman AJ und Thomas HC.** 1990. Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus. Lancet **336**:325-9.
- Chang CM, Jeng KS, Hu CP, Lo SJ, Su TS, Ting LP, Chou CK, Han SH, Pfaff E, Salfeld J und et al.** 1987. Production of hepatitis B virus in vitro by transient expression of cloned HBV DNA in a hepatoma cell line. The EMBO journal **6**:675-80.
- Chang SF, Netter HJ, Bruns M, Schneider R, Frölich K und Will H.** 1999. A new avian hepadnavirus infecting snow geese (*Anser caerulescens*) produces a significant fraction of virions containing single-stranded DNA. Virology **262**:39-54.
- Chang SF, Netter HJ, Hildt E, Schuster R, Schaefer S, Hsu YC, Rang A und Will H.** 2001. Duck Hepatitis B Virus Expresses a Regulatory HBx-Like Protein from a Hidden Open Reading Frame. J. Virol. **75**:161-70.

- Chemin I und Trepo C.** 2005. Clinical impact of occult HBV infections. *J Clin Virol* **34 Suppl 1**:S15-21.
- Chisari FV und Ferrari C.** 1995. Hepatitis B virus immunopathogenesis. *Annu Rev Immunol* **13**:29-60.
- Chu CJ, Keeffe EB, Han SH, Perrillo RP, Min AD, Soldevila-Pico C, Carey W, Brown RS, Jr., Luketic VA, Terrault N und Lok AS.** 2003. Hepatitis B virus genotypes in the United States: results of a nationwide study. *Gastroenterology* **125**:444-51.
- Coffin CS, Pham TN, Mulrooney PM, Churchill ND und Michalak TI.** 2004. Persistence of isolated antibodies to woodchuck hepatitis virus core antigen is indicative of occult infection. *Hepatology* **40**:1053-61.
- Coffin JM.** 1995. HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. *Science* **267**:483-9.
- Cohen JI, Miller RH, Rosenblum B, Denniston K, Gerin JL und Purcell RH.** 1988. Sequence comparison of woodchuck hepatitis virus replicative forms shows conservation of the genome. *Virology* **162**:12-20.
- Coleman PF, Chen YC und Mushahwar IK.** 1999. Immunoassay detection of hepatitis B surface antigen mutants. *Journal of medical virology* **59**:19-24.
- Cornberg M, Protzer U, Dollinger MM, Petersen J, Wedemeyer H, Berg T, Jilg W, Erhardt A, Wirth S, Schirmacher P, Fleig WE und Manns MP.** 2007. Prophylaxis, diagnosis and therapy of hepatitis B virus (HBV) infection: the German guidelines for the management of HBV infection. *Zeitschrift für Gastroenterologie* **45**:1281-328.
- Courouce-Pauty AM, Lemaire JM und Roux JF.** 1978. New hepatitis B surface antigen subtypes inside the ad category. *Vox Sang* **35**:304-8.
- Crowther RA, Kiselev NA, Bottcher B, Berriman JA, Borisova GP, Ose V und Pumpens P.** 1994. Three-dimensional structure of hepatitis B virus core particles determined by electron cryomicroscopy. *Cell* **77**:943-50.
- Dane DS, Cameron CH und Brigg M.** 1970. Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet* **1**:695-8.
- De La Vega FM und Mendoza-Figueroa T.** 1991. Dimethyl sulfoxide enhances lipid synthesis and secretion by long-term cultures of adult rat hepatocytes. *Biochemie* **73**:621-4.
- Domingo E und Holland JJ.** 1997. RNA virus mutations and fitness for survival. *Annual Review of Microbiology* **51**:151-78.

- Durantel D, Brunelle MN, Gros E, Carrouee-Durantel S, Pichoud C, Villet S, Trepo C und Zoulim F.** 2005. Resistance of human hepatitis B virus to reverse transcriptase inhibitors: from genotypic to phenotypic testing. *J Clin Virol* **34 Suppl 1**:S34-43.
- Dynan WS und Tjian R.** 1983. The promoter-specific transcription factor Sp1 binds to upstream sequences in the SV40 early promoter. *Cell* **35**:79-87.
- Eckhardt SG, Milich DR und McLachlan A.** 1991. Hepatitis B virus core antigen has two nuclear localization sequences in the arginine-rich carboxyl terminus. *Journal of virology* **65**:575-82.
- Engelke M, Mills K, Seitz S, Simon P, Gripon P, Schnolzer M und Urban S.** 2006. Characterization of a hepatitis B and hepatitis delta virus receptor binding site. *Hepatology* **43**:750-60.
- Faktor O, Budlovsky S, Ben-Levy R und Shaul Y.** 1990. A single element within the hepatitis B virus enhancer binds multiple proteins and responds to multiple stimuli. *J. Virol.* **64**:1861-63.
- Feitelson MA, Millman I und Blumberg BS.** 1986a. Tree squirrel hepatitis B virus: antigenic and structural characterization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **83**:2994-7.
- Feitelson MA, Millman I, Halbherr T, Simmons H und Blumberg BS.** 1986b. A newly identified hepatitis B type virus in tree squirrels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **83**:2233-7.
- Fortuin M, Karthigesu V, Allison L, Howard C, Hoare S, Mendy M und Whittle HC.** 1994. Breakthrough infections and identification of a viral variant in Gambian children immunized with hepatitis B vaccine. *The Journal of infectious diseases* **169**:1374-6.
- Furtwängler M, Edwards A, Cyran E, Wend UC und Gerlich WH.** 2006. Nosokomiale Hepatitis-B-Übertragungen: Fallbeispiel aus gegebenem Anlass. *Dtsch Arztebl* **103**:1084-87.
- Galibert F, Chen TN und Mandart E.** 1982. Nucleotide sequence of a cloned woodchuck hepatitis virus genome: comparison with the hepatitis B virus sequence. *J. Virol.* **41**:51-65.
- Galle PR, Hagelstein J, Kommerell B, Volkmann M, Schranz P und Zentgraf H.** 1994. In vitro experimental infection of primary human hepatocytes with hepatitis B virus. *Gastroenterology* **106**:664-73.
- Gallina A, De Koning A, Rossi F, Calogero R, Manservigi R und Milanesi G.** 1992. Translational modulation in hepatitis B virus preS-S open reading frame expression. *J Gen Virol* **73**:139-48.

- Gallina A, Gazina E und Milanese G.** 1995. A C-terminal PreS1 sequence is sufficient to retain hepatitis B virus L protein in 293 cells. *Virology* **213**:57-69.
- Ganem D und Prince AM.** 2004. Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences. *N Engl J Med* **350**:1118-29.
- Ganem D und Varmus HE.** 1987. The molecular biology of the hepatitis B viruses. *Annu Rev Biochem* **56**:651-93.
- Gerlich W,** 1991. Hepatitis B surface proteins. *Journal of hepatology* **13 Suppl 4**:S90-2.
- Gerlich W,** 2004. Hepatitis-Impfung von Blutspendern: notwendig, machbar, bezahlbar? *Transfusion Medicine and Hemotherapy* **31**:412-13.
- Gerlich WH,** 2007. The enigma of concurrent hepatitis B surface antigen (HBsAg) and antibodies to HBsAg. *Clin Infect Dis* **44**:1170-2.
- Gerlich WH, Glebe D und Schuttler CG.** 2007a. Deficiencies in the standardization and sensitivity of diagnostic tests for hepatitis B virus. *J Viral Hepat* **14 Suppl 1**:16-21.
- Gerlich WH und Robinson WS.** 1980. Hepatitis B virus contains protein attached to the 5' terminus of its complete DNA strand. *Cell* **21**:801-9.
- Gerlich WH, Wagner FF, Chudy M, Holm Harritshoj L, Lattermann A, Wienzek S, Glebe D, Saniewski M, Schüttler CG, Wend UC, Willems WR, Bauerfeind U, Jork C, Bein G, Platz P, Ullum H und Dickmeiss E.** 2007b. HBsAg non-reactive HBV infection in blood donors: Transmission and pathogenicity. *Journal of medical virology* **79**:S32-S36.
- Gilbert RJC, Beales L, Blond D, Simon MN, Lin BY, Chisari FV, Stuart DI und Rowlands DJ.** 2005. Hepatitis B small surface antigen particles are octahedral. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**:14783-88.
- Girones R, Cote PJ, Hornbuckle WE, Tennant BC, Gerin JL, Purcell RH und Miller RH.** 1989. Complete nucleotide sequence of a molecular clone of woodchuck hepatitis virus that is infectious in the natural host. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**:1846-9.
- Glebe D, Aliakbari M, Krass P, Knoop EV, Valerius KP und Gerlich WH.** 2003. Pre-S1 Antigen-Dependent Infection of Tupaia Hepatocyte Cultures with Human Hepatitis B Virus. *J. Virol.* **77**:9511-21.

- Glebe D, Berting A, Broehl S, Naumann H, Schuster R, Fiedler N, Tolle TK, Nitsche S, Seifer M, Gerlich WH und Schaefer S.** 2001. Optimised conditions for the production of hepatitis B virus from cell culture. *Intervirol* **44**:370-8.
- Glebe D, Lorenz H, Gerlich WH, Butler SD, Tochkov IA, Tennant BC, Cote P und Menne S.** 2009. Correlation of Virus and Host Response Markers with Circulating Immune Complexes during Acute and Chronic Woodchuck Hepatitis Virus Infection. *J. Virol.* **83**:1579-91.
- Glebe D, Urban S, Knoop EV, Cag N, Krass P, Grun S, Bulavaite A, Sasnauskas K und Gerlich WH.** 2005. Mapping of the hepatitis B virus attachment site by use of infection-inhibiting preS1 lipopeptides and tupaia hepatocytes. *Gastroenterology* **129**:234-45.
- Gojobori T, Moriyama EN und Kimura M.** 1990. Molecular clock of viral evolution, and the neutral theory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**:10015-8.
- Grethe S, Heckel J-O, Rietschel W und Hufert FT.** 2000. Molecular Epidemiology of Hepatitis B Virus Variants in Nonhuman Primates. *J. Virol.* **74**:5377-81.
- Gripon P, Diot C, Corlu A und Guguen-Guillouzo C.** 1989. Regulation by dimethylsulfoxide, insulin, and corticosteroids of hepatitis B virus replication in a transfected human hepatoma cell line. *Journal of medical virology* **28**:193-9.
- Gripon P, Diot C und Guguen-Guillouzo C.** 1993. Reproducible high level infection of cultured adult human hepatocytes by hepatitis B virus: effect of polyethylene glycol on adsorption and penetration. *Virology* **192**:534-40.
- Gripon P, Diot C, Theze N, Fourel I, Loreal O, Brechot C und Guguen-Guillouzo C.** 1988. Hepatitis B virus infection of adult human hepatocytes cultured in the presence of dimethyl sulfoxide. *Journal of virology* **62**:4136-43.
- Gripon P, Rumin S, Urban S, Le Seyec J, Glaise D, Cannie I, Guyomard C, Lucas J, Trepo C und Guguen-Guillouzo C.** 2002. Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**:15655-60.
- Gudima S, He Y, Chai N, Bruss V, Urban S, Mason W und Taylor J.** 2008. Primary human hepatocytes are susceptible to infection by hepatitis delta virus assembled with envelope proteins of woodchuck hepatitis virus. *Journal of virology* **82**:7276-83.

- Guidotti LG, Ando K, Hobbs MV, Ishikawa T, Runkel L, Schreiber RD und Chisari FV.** 1994. Cytotoxic T lymphocytes inhibit hepatitis B virus gene expression by a noncytolytic mechanism in transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**:3764-8.
- Guidotti LG, Ishikawa T, Hobbs MV, Matzke B, Schreiber RD und Chisari FV.** 1996. Intracellular Inactivation of the Hepatitis B Virus by Cytotoxic T Lymphocytes. *Immunity* **4**:25-36.
- Guidotti LG, Rochford R, Chung J, Shapiro M, Purcell R und Chisari FV.** 1999. Viral Clearance Without Destruction of Infected Cells During Acute HBV Infection. *Science* **284**:825-29.
- Günther S, Li BC, Miska S, Kruger DH, Meisel H und Will H.** 1995. A novel method for efficient amplification of whole hepatitis B virus genomes permits rapid functional analysis and reveals deletion mutants in immunosuppressed patients. *Journal of virology* **69**:5437-44.
- Guo J-T, Zhou H, Liu C, Aldrich C, Saputelli J, Whitaker T, Barrasa MI, Mason WS und Seeger C.** 2000. Apoptosis and Regeneration of Hepatocytes during Recovery from Transient Hepadnavirus Infections. *J. Virol.* **74**:1495-505.
- Hadziyannis SJ und Vassilopoulos D.** 2001. Hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B. *Hepatology* **34**:617-24.
- Halama K.** 2008. Infektiosität von Hepatitis B Viren aus transfizierten Hepatom-Zelllinien. Diplomarbeit. Justus-Liebig-Universität, Giessen.
- Hanada K, Shiu S-H und Li W-H.** 2007. The Nonsynonymous/Synonymous Substitution Rate Ratio versus the Radical/Conservative Replacement Rate Ratio in the Evolution of Mammalian Genes. *Mol Biol Evol* **24**:2235-41.
- Harrison TJ, Oon CJ und Zuckerman AJ (ed.).** 1994. A novel antibody escape variant (Ala 144) of hepatitis B virus in an identical twin before selection in the mother, Tokyo.
- Heermann KH, Goldmann U, Schwartz W, Seyffarth T, Baumgarten H und Gerlich WH.** 1984. Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-s sequence. *Journal of virology* **52**:396-402.
- Higgins DG und Sharp PM.** 1989. Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer. *Comput. Appl. Biosci.* **5**:151-53.
- Hillis DM und Bull JJ.** 1993. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Systematic Biology* **42**:182-92.

- Hirsch RC, Lavine JE, Chang LJ, Varmus HE und Ganem D.** 1990. Polymerase gene products of hepatitis B viruses are required for genomic RNA packaging as well as for reverse transcription. *Nature* **344**:552-5.
- Ho DD, Toyoshima T, Mo H, Kempf DJ, Norbeck D, Chen CM, Wideburg NE, Burt SK, Erickson JW und Singh MK.** 1994. Characterization of human immunodeficiency virus type 1 variants with increased resistance to a C2-symmetric protease inhibitor. *J. Virol.* **68**:2016-20.
- Hoofnagle JH, Gerety RJ und Barker LF.** 1975. Hepatitis B core antigen and antibody. *Dev Biol Stand* **30**:175-85.
- Hourfar MK, Jork C, Schottstedt V, Weber-Schehl M, Brixner V, Busch MP, Geusendam G, Gubbe K, Mahnhardt C, Mayr-Wohlfart U, Pichl L, Roth WK, Schmidt M, Seifried E und Wright DJ.** 2008. Experience of German Red Cross blood donor services with nucleic acid testing: results of screening more than 30 million blood donations for human immunodeficiency virus-1, hepatitis C virus, and hepatitis B virus. *Transfusion* **48**:1558-66.
- Hruska JF, Clayton DA, Rubenstein JL und Robinson WS.** 1977. Structure of hepatitis B Dane particle DNA before and after the Dane particle DNA polymerase reaction. *J. Virol.* **21**:666-72.
- Hsu HY, Chang MH, Liaw SH, Ni YH und Chen HL.** 1999. Changes of hepatitis B surface antigen variants in carrier children before and after universal vaccination in Taiwan. *Hepatology* **30**:1312-7.
- Hu J und Seeger C.** 1996. Hsp90 is required for the activity of a hepatitis B virus reverse transcriptase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**:1060-4.
- Huang J und Liang TJ.** 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**:7476-86.
- Huy TTT, Ngoc TT und Abe K.** 2008. New Complex Recombinant Genotype of Hepatitis B Virus Identified in Vietnam. *J. Virol.* **82**:5657-63.
- Ip HM, Lelie PN, Wong VC, Kuhns MC und Reesink HW.** 1989. Prevention of hepatitis B virus carrier state in infants according to maternal serum levels of HBV DNA. *Lancet* **1**:406-10.
- Jaoude GA und Sureau C.** 2005. Role of the Antigenic Loop of the Hepatitis B Virus Envelope Proteins in Infectivity of Hepatitis Delta Virus. *J. Virol.* **79**:10460-66.

- Jilg W, Delhoune C, Deinhardt F, Roumeliotou-Karayannis AJ, Papaevangelou GJ, Mushahwar IK und Overby LR.** 1984. Hepatitis B surface antigen (HBsAg) subtype-specific antibodies in persons vaccinated against hepatitis B. *Journal of medical virology* **13**:171-8.
- Jilg W, Hottenträger B, Weinberger K, Schlottmann E, Frick A, Holstege J, Schölmerich K und Palitzsch D.** 2001. Prevalence of markers of hepatitis B in the adult German population. *Journal of medical virology* **63**:96-102.
- Junker-Niepmann M, Bartenschlager R und Schaller H.** 1990. A short cis-acting sequence is required for hepatitis B virus pregenome encapsidation and sufficient for packaging of foreign RNA. *The EMBO journal* **9**:3389-96.
- Kalinina T, Iwanski A, Will H und Sterneck M.** 2003. Deficiency in virion secretion and decreased stability of the hepatitis B virus immune escape mutant G145R. *Hepatology* **38**:1274-81.
- Kamer G und Argos P.** 1984. Primary structural comparison of RNA-dependent polymerases from plant, animal and bacterial viruses. *Nucl. Acids Res.* **12**:7269-82.
- Kann M und Gerlich WH.** 2005. Hepatitis B, p. p. 1226-68. *In* B. W. J. Mahy and V. ter Meulen (ed.), *Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections*, 10th ed, vol. 2. , Washington, DC.
- Kann M, Schmitz A und Rabe B.** 2007. Intracellular transport of hepatitis B virus. *World J Gastroenterol* **13**:39-47.
- Kann M, Sodeik B, Vlachou A, Gerlich WH und Helenius A.** 1999. Phosphorylation-dependent binding of hepatitis B virus core particles to the nuclear pore complex. *J Cell Biol* **145**:45-55.
- Kao JH, Chen PJ, Lai MY und Chen DS.** 2000. Hepatitis B genotypes correlate with clinical outcomes in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology* **118**:554-9.
- Kao JH, Chen PJ, Lai MY und Chen DS.** 2003. Basal core promoter mutations of hepatitis B virus increase the risk of hepatocellular carcinoma in hepatitis B carriers. *Gastroenterology* **124**:327-34.
- Kaplan PM, Greenman RL, Gerin JL, Purcell RH und Robinson WS.** 1973. DNA Polymerase Associated with Human Hepatitis B Antigen. *J. Virol.* **12**:995-1005.
- Karayiannis P, A A, Hadziyannis S, Thursz M, Watts R, Seito S und Thomas HC.** 1995. Fulminant hepatitis associated with hepatitis B virus e antigen-negative infection: importance of host factors. *Hepatology* **22**:1628-34.

- Karthigesu VD, Allison LM, Fortuin M, Mendy M, Whittle HC und Howard CR.** 1994. A novel hepatitis B virus variant in the sera of immunized children. *J Gen Virol* **75 (Pt 2):**443-8.
- Kato H, Orito E, Gish RG, Sugauchi F, Suzuki S, Ueda R, Miyakawa Y und Mizokami M.** 2002. Characteristics of Hepatitis B Virus Isolates of Genotype G and Their Phylogenetic Differences from the Other Six Genotypes (A through F). *J. Virol.* **76:**6131-37.
- Katsoulidou A, Paraskevis D, Magiorkinis E, Moschidis Z, Haida C, Hatzitheodorou E, Varaklioti A, Karafoulidou A, Hatzitaki M, Kavallierou L, Mouzaki A, Andrioti E, Veneti C, Kaperoni A, Zervou E, Politis C und Hatzakis A.** 2009. Molecular characterization of occult hepatitis B cases in Greek blood donors. *Journal of medical virology* **81:**815-25.
- Kenney JM, von Bonsdorff CH, Nassal M und Fuller SD.** 1995. Evolutionary conservation in the hepatitis B virus core structure: comparison of human and duck cores. *Structure* **3:**1009-19.
- Kew MC, Chestnut T, Baldwin BH, Hornbuckle WE, Tennant BC, Purcell RH und Miller RH.** 1993. Heterogeneity of the woodchuck hepatitis virus genome in a chronically infected woodchuck. *Virus research* **27:**229-37.
- Kimura M.** 1983. *The Neutral Theory of Molecular Evolution.* Cambridge University Press, Cambridge.
- Kleinman SH und Busch MP.** 2006. Assessing the impact of HBV NAT on window period reduction and residual risk. *J Clin Virol* **36 Suppl 1:**S23-9.
- Kobayashi S, Ide T und Sata M.** 2001. Detection of YMDD motif mutations in some lamivudine-untreated asymptomatic hepatitis B virus carriers. *Journal of hepatology* **34:**584-6.
- Köck J, Nassal M, MacNelly S, Baumert TF, Blum HE und von Weizsacker F.** 2001. Efficient Infection of Primary Tupaia Hepatocytes with Purified Human and Woolly Monkey Hepatitis B Virus. *J. Virol.* **75:**5084-89.
- Köck J und Schlicht HJ.** 1993. Analysis of the earliest steps of hepadnavirus replication: genome repair after infectious entry into hepatocytes does not depend on viral polymerase activity. *J. Virol.* **67:**4867-74.
- Kodama K, Ogasawara N, Yoshikawa H und Murakami S.** 1985. Nucleotide sequence of a cloned woodchuck hepatitis virus genome: evolutionary relationship between hepadnaviruses. *J. Virol.* **56:**978-86.

- Kohno H, Inoue T, Tsuda F, Okamoto H und Akahane Y.** 1996. Mutations in the envelope gene of hepatitis B virus variants co-occurring with antibody to surface antigen in sera from patients with chronic hepatitis B. *J Gen Virol* **77**:1825-31.
- Kost DP und Michalopoulos GK.** 1991. Effect of 2% dimethyl sulfoxide on the mitogenic properties of epidermal growth factor and hepatocyte growth factor in primary hepatocyte culture. *Journal of cellular physiology* **147**:274-80.
- Kramvis A und Kew MC.** 2005. Relationship of genotypes of hepatitis B virus to mutations, disease progression and response to antiviral therapy. *Journal of Viral Hepatitis* **12**:456-64.
- Kuang SY, Jackson PE, Wang JB, Lu PX, Munoz A, Qian GS, Kensler TW und Groopman JD.** 2004. Specific mutations of hepatitis B virus in plasma predict liver cancer development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**:3575-80.
- Kurbanov F, Tanaka Y, Kramvis A, Simmonds P und Mizokami M.** 2008. When Should "I" Consider a New Hepatitis B Virus Genotype? *J. Virol.* **82**:8241-42.
- Kuroki K, Russnak R und Ganem D.** 1989. Novel N-terminal amino acid sequence required for retention of a hepatitis B virus glycoprotein in the endoplasmic reticulum. *Mol. Cell. Biol.* **9**:4459-66.
- Lacombe K, Ollivet A, Gozlan J, Durantel S, Tran N, Girard PM und Zoulim F.** 2006. A novel hepatitis B virus mutation with resistance to adefovir but not to tenofovir in an HIV-hepatitis B virus-co-infected patient. *AIDS (London, England)* **20**:2229-31.
- Lada O, Benhamou Y, Poynard T und Thibault V.** 2006. Coexistence of Hepatitis B Surface Antigen (HBs Ag) and Anti-HBs Antibodies in Chronic Hepatitis B Virus Carriers: Influence of "a" Determinant Variants. *J. Virol.* **80**:2968-75.
- Ladner SK, Otto MJ, Barker CS, Zaifert K, Wang GH, Guo JT, Seeger C und King RW.** 1997. Inducible expression of human hepatitis B virus (HBV) in stably transfected hepatoblastoma cells: a novel system for screening potential inhibitors of HBV replication. *Antimicrob Agents Chemother* **41**:1715-20.
- Laemmli UK, Molbert E, Showe M und Kellenberger E.** 1970. Form-determining function of the genes required for the assembly of the head of bacteriophage T4. *J Mol Biol* **49**:99-113.

- Lambert C, Doring T und Prange R.** 2007. Hepatitis B Virus Maturation Is Sensitive to Functional Inhibition of ESCRT-III, Vps4, and γ 2-Adaptin. *J. Virol.* **81**:9050-60.
- Landers TA, Greenberg HB und Robinson WS.** 1977. Structure of Hepatitis B Dane Particle DNA and Nature of the Endogenous DNA Polymerase Reaction. *J. Virol.* **23**:368-76.
- Lanford RE, Chavez D, Brasky KM, Burns RB und Rico-Hesse R.** 1998. Isolation of a hepadnavirus from the woolly monkey, a New World primate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**:5757-61.
- Laskus T, Rakela J und Persing DH.** 1994. The stem-loop structure of the cis-encapsidation signal is highly conserved in naturally occurring hepatitis B virus variants. *Virology* **200**:809-12.
- Lavanchy D.** 2004. Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures. *Journal of Viral Hepatitis* **11**:97-107.
- Le Bouvier GL.** 1971. The heterogeneity of Australia antigen. *The Journal of infectious diseases* **123**:671-5.
- Leistner CM, Gruen-Bernhard S und Glebe D.** 2008. Role of glycosaminoglycans for binding and infection of hepatitis B virus. *Cellular Microbiology* **10**:122-33.
- Lenhoff RJ und Summers J.** 1994. Coordinate regulation of replication and virus assembly by the large envelope protein of an avian hepadnavirus. *Journal of virology* **68**:4565-71.
- Levicnik-Stežinar S.** 2004. Hepatitis B surface antigen escape mutant in a first time blood donor potentially missed by a routine screening assay. *Clin Lab* **50**:49-51.
- Levicnik-Stežinar S, Rahne-Potokar U, Candotti D, Lelie N und Allain JP.** 2008. Anti-HBs positive occult hepatitis B virus carrier blood infectious in two transfusion recipients. *Journal of hepatology* **48**:1022-5.
- Li JS, Tong SP, Wen YM, Vitvitski L, Zhang Q und Trepo C.** 1993. Hepatitis B virus genotype A rarely circulates as an HBe-minus mutant: possible contribution of a single nucleotide in the precore region. *Journal of virology* **67**:5402-10.
- Li L, Dixon RJ, Gu X und Newbold JE.** 1998. Comparison of the sequences of the Grey Teal, Maned Duck and Duck Hepatitis B Viruses, *The molecular biology of the Hepatitis B Virus*, vol. 13, San Diego.

- Li Q, Ding M und Wang H.** 1995. [The infection of hepatitis D virus in adult tupaia]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* **75**:611-3, 39-40.
- Liang TJ, Hasegawa K, Rimon N, Wands JR und Ben-Porath E.** 1991. A hepatitis B virus mutant associated with an epidemic of fulminant hepatitis. *N Engl J Med* **324**:1705-9.
- Locarnini S.** 2003. Hepatitis B viral resistance: mechanisms and diagnosis. *Journal of hepatology* **39 Suppl 1**:S124-32.
- Locarnini S.** 2008. Primary resistance, multidrug resistance, and cross-resistance pathways in HBV as a consequence of treatment failure. *Hepatology International* **2**:147-51.
- Lok AS, Akarca U und Greene S.** 1994. Mutations in the pre-core region of hepatitis B virus serve to enhance the stability of the secondary structure of the pre-genome encapsidation signal. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**:4077-81.
- Lorenz H.** 2006. Replikation von drei Säuger-Hepadnaviren im Amerikanischen Waldmurmeltier (*Marmota monax*) und Expression der viralen Oberflächenproteine in transgenen Pflanzen. Dissertation. Justus-Liebig-Universität, Gießen.
- Lu X, Block TM und Gerlich WH.** 1996. Protease-induced infectivity of hepatitis B virus for a human hepatoblastoma cell line. *Journal of virology* **70**:2277-85.
- Magnius L, Kaplan L, Vyas GN und Perkins HA.** 1975. A new virus specified determinant of hepatitis B surface antigen. *Acta Pathol Microbiol Scand [B]* **83**:295-7.
- Mandart E, Kay A und Galibert F.** 1984. Nucleotide sequence of a cloned duck hepatitis B virus genome: comparison with woodchuck and human hepatitis B virus sequences. *J. Virol.* **49**:782-92.
- Mangold CM und Streeck RE.** 1993. Mutational analysis of the cysteine residues in the hepatitis B virus small envelope protein. *J. Virol.* **67**:4588-97.
- Mangold CM, Unckell F, Werr M und Streeck RE.** 1995. Secretion and antigenicity of hepatitis B virus small envelope proteins lacking cysteines in the major antigenic region. *Virology* **211**:535-43.
- Margaritis AM, Brown SM, Seed CR, Kiely P, D'Agostino B und Keller AJ.** 2007. Comparison of two automated nucleic acid testing systems for simultaneous detection of human immunodeficiency virus and hepatitis C virus RNA and hepatitis B virus DNA. *Transfusion* **47**:1783-93.

- Marion PL, Oshiro LS, Regnery DC, Scullard GH und Robinson WS.** 1980. A virus in Beechey ground squirrels that is related to hepatitis B virus of humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **77**:2941-5.
- Marion PL, Susan S, Knight FH, Salazar H, Popper W und Robinson S.** 1983. Ground Squirrel Hepatitis Virus Infection. *Hepatology (Baltimore, Md)* **3**:519-27.
- Mason WS, Burell CJ, Casey J und Gerlich WH.** 2005. Family Hepadnaviridae. Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.
- Mason WS, Seal G und Summers J.** 1980. Virus of Pekin ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus. *J. Virol.* **36**:829-36.
- Mathet VL, Feld M, Espinola L, Sanchez DO, Ruiz V, Mando O, Carballal G, Quarleri JF, D'Mello F, Howard CR und Oubina JR.** 2003. Hepatitis B virus S gene mutants in a patient with chronic active hepatitis with circulating Anti-HBs antibodies. *Journal of medical virology* **69**:18-26.
- McMahon G, Ehrlich PH, Moustafa ZA, McCarthy LA, Dottavio D, Tolpin MD, Nadler PI und Ostberg L.** 1992. Genetic alterations in the gene encoding the major HBsAg: DNA and immunological analysis of recurrent HBsAg derived from monoclonal antibody-treated liver transplant patients. *Hepatology* **15**:757-66.
- Meisel H, Endres AS, Walter HU, Wend UC und Gerlich WH.** 2003. Transmission of Hepatitis B Virus 2 Months Prior to Hepatitis Surface Antigen Positivity of Donor Blood. *Transfusion Medicine and Hemotherapy* **30**:228-31.
- Michalak TI, Mulrooney PM und Coffin CS.** 2004. Low Doses of Hepadnavirus Induce Infection of the Lymphatic System That Does Not Engage the Liver. *J. Virol.* **78**:1730-38.
- Milich DR.** 1988. T- and B-cell recognition of hepatitis B viral antigens. *Immunology today* **9**:380-6.
- Miller RH und Robinson WS.** 1986. Common evolutionary origin of hepatitis B virus and retroviruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **83**:2531-5.
- Minegishi K, Yoshikawa A, Kishimoto S, Yugi H, Yokoya N, Sakurada M, Kiyokawa H und Nishioka K.** 2003. Superiority of minipool nucleic acid amplification technology for hepatitis B virus over chemiluminescence immunoassay for hepatitis B surface antigen screening. *Vox Sanguinis* **84**:287-91.

- Murray JM, Wieland SF, Purcell RH und Chisari FV.** 2005. Dynamics of hepatitis B virus clearance in chimpanzees. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**:17780-85.
- Myhre EB und Erntell M.** 1985. A non-immune interaction between the light chain of human immunoglobulin and a surface component of a *Peptococcus magnus* strain. *Molecular immunology* **22**:879-85.
- Nainan OV, Khristova ML, Byun K, Xia G, Taylor PE, Stevens CE und Margolis HS.** 2002. Genetic variation of hepatitis B surface antigen coding region among infants with chronic hepatitis B virus infection. *Journal of medical virology* **68**:319-27.
- Nakabayashi H, Taketa K, Miyano K, Yamane T und Sato J.** 1982. Growth of Human Hepatoma Cell Lines with Differentiated Functions in Chemically Defined Medium. *Cancer Res* **42**:3858-63.
- 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**:4107-16.
- Naumann H, Schaefer S, Yoshida CFT, Gaspar AMC, Repp R und Gerlich WH.** 1993. Identification of a new hepatitis B virus (HBV) genotype from Brazil that expresses HBV surface antigen subtype adw4. *J Gen Virol* **74**:1627-32.
- Neurath AR, Kent SB, Strick N und Parker K.** 1986. Identification and chemical synthesis of a host cell receptor binding site on hepatitis B virus. *Cell* **46**:429-36.
- Niederhauser C, Mansouri Taleghani B, Graziani M, Stolz M, Tinguely C und Schneider P.** 2008. Blood donor screening: how to decrease the risk of transfusion-transmitted hepatitis B virus? *Swiss Med Wkly* **138**:134-41.
- Nikolski AA und Wallschläger D.** 1982. On the specific status of holarctic long-tailed squirrels; a bioacoustical study. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)* **38**:808-09.
- Norder H, Couroucé AM, Coursaget P, Echevarria JM, Lee SD, Mushahwar IK, Robertson BH, Locarnini S und Magnius LO.** 2004. Genetic Diversity of Hepatitis B Virus Strains Derived Worldwide: Genotypes, Subgenotypes, and HB s Ag Subtypes. *Intervirology* **47**:289-309.
- Norder H, Courouce AM und Magnius LO.** 1994. Complete genomes, phylogenetic relatedness, and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes. *Virology* **198**:489-503.

- Norder H, Ebert JW, Fields HA, Mushahwar IK und Magnius LO.** 1996. Complete sequencing of a gibbon hepatitis B virus genome reveals a unique genotype distantly related to the chimpanzee hepatitis B virus. *Virology* **218**:214-23.
- Nübling MC, Unkelbach U, Chudy M und Seitz R.** 2008. Effect of viral nucleic acid testing on contamination frequency of manufacturing plasma pools. *Transfusion* **48**:822-26.
- Offergeld R, Faensen D, Ritter S und Hamouda O.** 2005. Human immunodeficiency virus, hepatitis C and hepatitis B infections among blood donors in Germany 2000-2002: risk of virus transmission and the impact of nucleic acid amplification testing. *Euro Surveill* **10**:8-11.
- Offergeld R, Ritter S und Hamouda O.** 2007. Infektionsepidemiologische Daten von Blutspendern 2005. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz* **50**:1221-31.
- Ohnuma H, Tanaka T, Yoshikawa A, Murokawa H, Minegishi K, Yamanaka R, Lizuka HY, Miyamoto M, Satoh S, Nakahira S, Tomono T, Murozuka T, Takeda Y, Doi Y, Mine H, Yokoyama S, Hirose T und Nishioka K.** 2001. The first large-scale nucleic acid amplification testing (NAT) of donated blood using multiplex reagent for simultaneous detection of HBV, HCV, and HIV-1 and significance of NAT for HBV. *Microbiol Immunol* **45**:667-72.
- Okamoto H, Imai M, Kametani M, Nakamura T und Mayumi M.** 1987a. Genomic heterogeneity of hepatitis B virus in a 54-year-old woman who contracted the infection through materno-fetal transmission. *The Japanese journal of experimental medicine* **57**:231-6.
- Okamoto H, Imai M, Tsuda F, Tanaka T, Miyakawa Y und Mayumi M.** 1987b. Point mutation in the S gene of hepatitis B virus for a d/y or w/r subtypic change in two blood donors carrying a surface antigen of compound subtype adyr or adwr. *Journal of virology* **61**:3030-4.
- Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, Sastrosoewignjo RI, Imai M, Miyakawa Y und Mayumi M.** 1988. Typing Hepatitis B Virus by Homology in Nucleotide Sequence: Comparison of Surface Antigen Subtypes. *J Gen Virol* **69**:2575-83.
- Orito E, Mizokami M, Ina Y, Moriyama EN, Kameshima N, Yamamoto M und Gojobori T.** 1989. Host-independent evolution and a genetic classification of the hepadnavirus family based on nucleotide sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**:7059-62.
- Paran N, Geiger B und Shaul Y.** 2001. HBV infection of cell culture: evidence for multivalent and cooperative attachment. *The EMBO journal* **20**:4443-53.

- Paronetto F und Tennant BC.** 1990. Woodchuck hepatitis virus infection: a model of human hepatic diseases and hepatocellular carcinoma. *Prog Liver Dis* **9**:463-83.
- Persing DH, Varmus HE und Ganem D.** 1986. Inhibition of secretion of hepatitis B surface antigen by a related presurface polypeptide. *Science* **234**:1388-91.
- Perz JP, Armstrong GL, Farrington LA, Hutin YJF und Bell BP.** 2006. The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. *Journal of hepatology* **45**:529-38.
- Prassolov A, Hohenberg H, Kalinina T, Schneider C, Cova L, Krone O, Frölich K, Will H und Sirma H.** 2003. New Hepatitis B Virus of Cranes That Has an Unexpected Broad Host Range. *J. Virol.* **77**:1964-76.
- Preisler-Adams S, Schlayer HJ, Peters T, Hettler F, Gerok W, Rasenack J.** 1993. Sequence analysis of hepatitis B virus DNA in immunologically negative infection. *Arch Virol* **133**:385-96.
- Prince AM, Lee DH und Brotman B.** 2001. Infectivity of blood from PCR-positive, HBsAg-negative, anti-HBs-positive cases of resolved hepatitis B infection. *Transfusion* **41**:329-32.
- Protzer U und Schaller H.** 2000. Immune escape by hepatitis B viruses. *Virus genes* **21**:27-37.
- Pult I, Netter HJ, Bruns M, Prassolov A, Sirma H, Hohenberg H, Chang SF, Fröhlich K, Krone O, Kaleta EF und Will H.** 2001. Identification and analysis of a new hepadnavirus in white storks. *Virology* **289**:114-28.
- Purdy MA, Talekar G, Swenson P, Araujo A und Fields H.** 2007. A New Algorithm for Deduction of Hepatitis B Surface Antigen Subtype Determinants from the Amino Acid Sequence. *Intervirology* **50**:45-51.
- Qiao M, Macnaughton TB und Gowans EJ.** 1994. Adsorption and penetration of hepatitis B virus in a nonpermissive cell line. *Virology* **201**:356-63.
- Qiu X, Schroeder P und Bridon D.** 1996. Identification and characterization of a C(K/R)TC motif as a common epitope present in all subtypes of hepatitis B surface antigen. *J Immunol* **156**:3350-56.
- Rabe B, Glebe D und Kann M.** 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**:5465-73.

- Rabe B, Vlachou A, Pante N, Helenius A und Kann M.** 2003. Nuclear import of hepatitis B virus capsids and release of the viral genome. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **100**:9849-54.
- Raimondo G, Allain JP, Brunetto MR, Buendia MA, Chen DS, Colombo M, Craxi A, Donato F, et al.** 2008a. Statements from the Taormina expert meeting on occult hepatitis B virus infection. Journal of hepatology **49**:652-7.
- Raimondo G, Navarra G, Mondello S, Costantino L, Colloredo G, Cucinotta E, Di Vita G, Scisca C, Squadrito G und Pollicino T.** 2008b. Occult hepatitis B virus in liver tissue of individuals without hepatic disease. Journal of hepatology **48**:743-6.
- Raimondo G, Pollicino T, Cacciola I und Squadrito G.** 2007. Occult hepatitis B virus infection. Journal of hepatology **46**:160-70.
- Raney AK, Le HB und McLachlan A.** 1992. Regulation of transcription from the hepatitis B virus major surface antigen promoter by the Sp1 transcription factor. J. Virol. **66**:6912-21.
- Rehermann B.** 1996. Immunopathogenesis of viral hepatitis. Baillieres Clin Gastroenterol **10**:483-500.
- Rehermann B, Ferrari C, Pasquinelli C und Chisari FV.** 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**:1104-8.
- Robinson JW und Hoffman RS.** 1975. Geographical and Interspecific Cranial Variation in Big-Eared Ground Squirrels (*Spermophilus*): A Multivariate Study. Systematic Zoology **24**:79-88.
- Robinson WS.** 1977. The Genome of Hepatitis B Virus. Annual Review of Microbiology **31**:357-77.
- Robinson WS.** 1991. Hepadnaviridae and their replication, p. 989-1021. *In* Fields and Knipe (ed.), Fundamental Virology, 2 ed. Raven Press, New York.
- Robinson WS, Clayton DA und Greenman RL.** 1974. DNA of a human hepatitis B virus candidate. Journal of virology **14**:384-91.
- Robinson WS und Greenman RL.** 1974. DNA polymerase in the core of the human hepatitis B virus candidate. Journal of virology **13**:1231-6.
- Roggendorf M und Tolle TK.** 1995. The woodchuck: an animal model for hepatitis B virus infection in man. Intervirology **38**:100-12.

- Roingeard P und Sureau C.** 1998. Ultrastructural analysis of hepatitis B virus in HepG2-transfected cells with special emphasis on subviral filament morphogenesis. *Hepatology* **28**:1128-33.
- Roth WK, Weber M, Petersen D, Drosten C, Buhr S, Sireis W, Weichert W, Hedges D und Seifried E.** 2002. NAT for HBV and anti-HBc testing increase blood safety. *Transfusion* **42**:869-75.
- Saldanha J, Gerlich W, Lelie N, Dawson P, Heermann K und Heath A.** 2001. An international collaborative study to establish a World Health Organization international standard for hepatitis B virus DNA nucleic acid amplification techniques. *Vox Sang* **80**:63-71.
- Salisse J und Sureau C.** 2009. A Function Essential to Viral Entry Underlies the Hepatitis B Virus "a" Determinant. *J. Virol.* **83**:9321-28.
- Satake M, Taira R, Yugi H, Hino S, Kanemitsu K, Ikeda H und Tadokoro K.** 2007. Infectivity of blood components with low hepatitis B virus DNA levels identified in a lookback program. *Transfusion* **47**:1197-205.
- Sattler F und Robinson WS.** 1979. Hepatitis B Viral DNA Molecules Have Cohesive Ends. *J. Virol.* **32**:226-33.
- Sayiner AA, Harun A, Aylin S, Ali C und Mesut A.** 2007. A new hepatitis B virus vaccine escape mutation in a renal transplant recipient. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* **38**:157-60.
- Schaefer S.** 2005. Hepatitis B virus: significance of genotypes. *Journal of Viral Hepatitis* **12**:111-24.
- Schaefer S.** 2007. Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes. *World J Gastroenterol* **13**:14-21.
- Schaefer S, Glebe D und Gerlich WH.** 2009. Hepatitis B Virus (Hepadnaviridae), *Medizinische Virologie*, 2 ed. Thieme, Stuttgart.
- Schlicht HJ und Schaller H.** 1989. Analysis of hepatitis B virus gene functions in tissue culture and in vivo. *Curr Top Microbiol Immunol* **144**:253-63.
- Schmidt M, Nübling CM, Scheiblaue H, Chudy M, Walch LA, Seifried E, Roth WK und Hourfar KM.** 2006. Anti-HBc screening of blood donors: a comparison of nine anti-HBc tests. *Vox Sanguinis* **91**:237-43.
- Schuster R, Gerlich WH und Schaefer S.** 2000. Induction of apoptosis by the transactivating domains of the hepatitis B virus X gene leads to suppression of oncogenic transformation of primary rat embryo fibroblasts. *Oncogene* **19**:1173-80.

- Seeger C, Baldwin B, Hornbuckle WE, Yeager AE, Tennant BC, Cote P, Ferrell L, Ganem D und Varmus HE.** 1991. Woodchuck hepatitis virus is a more efficient oncogenic agent than ground squirrel hepatitis virus in a common host. *J. Virol.* **65**:1673-79.
- Seeger C, Ganem D und Varmus HE.** 1984. Nucleotide sequence of an infectious molecularly cloned genome of ground squirrel hepatitis virus. *J. Virol.* **51**:367-75.
- Seeger C, Ganem D und Varmus HE.** 1986. Biochemical and genetic evidence for the hepatitis B virus replication strategy. *Science (New York, N.Y)* **232**:477-84.
- Seeger C, Marion PL, Ganem D und Varmus HE.** 1987. In vitro recombinants of ground squirrel and woodchuck hepatitis viral DNAs produce infectious virus in squirrels. *Journal of virology* **61**:3241-7.
- Seglen PO und David MP.** 1976. Chapter 4 Preparation of Isolated Rat Liver Cells, p. 29-83, *Methods in Cell Biology*, vol. Volume 13. Academic Press.
- Seifer M, Zhou S und Standing DN.** 1993. A micromolar pool of antigenically distinct precursors is required to initiate cooperative assembly of hepatitis B virus capsids in *Xenopus* oocytes. *J. Virol.* **67**:249-57.
- Seitz S, Urban S, Antoni C und Bottcher B.** 2007. Cryo-electron microscopy of hepatitis B virions reveals variability in envelope capsid interactions. *The EMBO journal* **26**:4160-7.
- Sells MA, Chen ML und Acs G.** 1987. Production of hepatitis B virus particles in Hep G2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**:1005-09.
- Shiels MT, Taswell HF, Czaja AJ, Nelson C und Swenke P.** 1987. Frequency and significance of concurrent hepatitis B surface antigen and antibody in acute and chronic hepatitis B. *Gastroenterology* **93**:675-80.
- Shouval D.** 2003. Hepatitis B vaccines. *Journal of hepatology* **39 Suppl 1**:S70-6.
- Shyamala V, Cottrell J, Arcangel P, Madriaga D, Linnen J, Phelps B und Chien D.** 2004. Detection and quantitation of HBV DNA in the WHO International Standard for HIV-1 RNA (NIBSC code: 97/656). *J Virol Methods* **118**:69-72.
- Simonsen CC und Levinson AD.** 1983. Analysis of processing and polyadenylation signals of the hepatitis B virus surface antigen gene by using simian virus 40-hepatitis B virus chimeric plasmids. *Mol. Cell. Biol.* **3**:2250-58.

- Sprengel R, Kaleta EF und Will H.** 1988. Isolation and characterization of a hepatitis B virus endemic in herons. *J. Virol.* **62**:3832-39.
- Stephan S, Dieter G, Ulrike CW, Oyunbileg J und Wolfram HG.** 2003. Universal primers for real-time amplification of DNA from all known Orthohepadnavirus species. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* **27**:30-37.
- Steward MW, Partidos CD, D'Mello F und Howard CR.** 1993. Specificity of antibodies reactive with hepatitis B surface antigen following immunization with synthetic peptides. *Vaccine* **11**:1405-14.
- Stirk HJ, Thornton JM und Howard CR.** 1992. A topological model for hepatitis B surface antigen. *Intervirology* **33**:148-58.
- Stoll-Becker S, Repp R, Glebe D, Schaefer S, Kreuder J, Kann M, Lampert F und Gerlich WH.** 1997. Transcription of hepatitis B virus in peripheral blood mononuclear cells from persistently infected patients. *J. Virol.* **71**:5399-407.
- Stuyver L, De Gendt S, Van Geyt C, Zoulim F, Fried M, Schinazi RF und Rossau R.** 2000. A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. *J Gen Virol* **81**:67-74.
- Su JJ.** 1987. [Experimental infection of human hepatitis B virus (HBV) in adult tree shrews]. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi* **16**:103-6, 22.
- Sugauchi F, Kumada H, Acharya SA, Shrestha SM, Gamutan MTA, Khan M, Gish RG, Tanaka Y, Kato T, Orito E, Ueda R, Miyakawa Y und Mizokami M.** 2004. Epidemiological and sequence differences between two subtypes (Ae and Aa) of hepatitis B virus genotype A. *J Gen Virol* **85**:811-20.
- Sugiyama M, Tanaka Y, Kato T, Orito E, Ito K, Acharya SK, Gish RG, Kramvis A, Shimada T, Izumi N, Kaito M, Miyakawa Y und Mizokami M.** 2006. Influence of hepatitis B virus genotypes on the intra- and extracellular expression of viral DNA and antigens. *Hepatology (Baltimore, Md)* **44**:915-24.
- Summers J, O'Connell A und Millman I.** 1975. Genome of hepatitis B virus: restriction enzyme cleavage and structure of DNA extracted from Dane particles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **72**:4597-601.
- Summers J, Smith PM und Horwich AL.** 1990. Hepadnavirus envelope proteins regulate covalently closed circular DNA amplification. *Journal of virology* **64**:2819-24.

- Summers J, Smolec JM und Snyder R.** 1978. A virus similar to human hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **75**:4533-7.
- Sureau C, Romet-Lemonne JL, Mullins JI und Essex M.** 1986. Production of hepatitis B virus by a differentiated human hepatoma cell line after transfection with cloned circular HBV DNA. Cell **47**:37-47.
- Tacke F, Gehrke C, Luedde T, Heim A, Manns MP und Trautwein C.** 2004. Basal Core Promoter and Precore Mutations in the Hepatitis B Virus Genome Enhance Replication Efficacy of Lamivudine-Resistant Mutants. J. Virol. **78**:8524-35.
- Tamura K, Dudley J, Nei M und Kumar S.** 2007a. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. Mol Biol Evol **24**:1596-99.
- Tamura K, Dudley J, Nei M und Kumar S.** 2007b. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol Biol Evol **24**:1596-9.
- Tang H, Banks KE, Anderson AL und McLachlan A.** 2001. Hepatitis B virus transcription and replication. Drug News Perspect **14**:325-34.
- Testut P, Renard CA, Terradillos O, Vitvitski-Trepo L, Tekaia F, Degott C, Blake J, Boyer B und Buendia MA.** 1996. A new hepadnavirus endemic in arctic ground squirrels in Alaska. J. Virol. **70**:4210-19.
- Thierfelder W, Hellenbrand W, Meisel H, Schreier E und Dortschy R.** 2001. Prevalence of markers for hepatitis A, B and C in the German population. Results of the German National Health Interview and Examination Survey 1998. European Journal of Epidemiology **17**:429-35.
- Thimme R, Wieland S, Steiger C, Ghayeb J, Reimann KA, Purcell RH und Chisari FV.** 2003. CD8+ T Cells Mediate Viral Clearance and Disease Pathogenesis during Acute Hepatitis B Virus Infection. J. Virol. **77**:68-76.
- Thomas L.** 2000. Labor und Diagnose: Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik, TH-Books Verlagsgesellschaft, Frankfurt/Main.
- Tiollais P, Charnay P und Vyas GN.** 1981. Biology of hepatitis B virus. Science **213**:406-11.
- Toh H, Hayashida H und Miyata T.** 1983. Sequence homology between retroviral reverse transcriptase and putative polymerases of hepatitis B virus and cauliflower mosaic virus. Nature **305**:827-9.

- Tong SP, Li JS, Vitvitski L und Trepo C.** 1990. Active hepatitis B virus replication in the presence of anti-HBe is associated with viral variants containing an inactive pre-C region. *Virology* **176**:596-603.
- Torbenson M und Thomas DL.** 2002. Occult hepatitis B. *Lancet Infect Dis* **2**:479-86.
- Torresi J.** 2002. The virological and clinical significance of mutations in the overlapping envelope and polymerase genes of hepatitis B virus. *J Clin Virol* **25**:97-106.
- Tur-Kaspa R, Burk RD, Shaul Y und Shafritz DA.** 1986. Hepatitis B virus DNA contains a glucocorticoid-responsive element. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **83**:1627-31.
- Vaudin M, Wolstenholme AJ, Tsiquaye KN, Zuckerman AJ und Harrison TJ.** 1988. The Complete Nucleotide Sequence of the Genome of a Hepatitis B Virus Isolated from a Naturally Infected Chimpanzee. *J Gen Virol* **69**:1383-89.
- Vuori K, Pihlajaniemi T, Myllyla R und Kivirikko KI.** 1992. Site-directed mutagenesis of human protein disulphide isomerase: effect on the assembly, activity and endoplasmic reticulum retention of human prolyl 4-hydroxylase in *Spodoptera frugiperda* insect cells. *The EMBO journal* **11**:4213-7.
- Wallace LA und Carman WF.** 1997. Surface gene variation of HBV: scientific and medical relevance. *Viral Hepatitis Rev* **3**:5-16.
- Wallace LA, Echevarria JE, Echevarria JM und Carman WF.** 1994. Molecular characterization of envelope antigenic variants of hepatitis B virus from Spain. *The Journal of infectious diseases* **170**:1300-3.
- Walter E, Keist R, Niederost B, Pult I und Blum HE.** 1996. Hepatitis B virus infection of tupaia hepatocytes in vitro and in vivo. *Hepatology* **24**:1-5.
- Warren KS, Heeney JL, Swan RA, Heriyanto und Verschoor EJ.** 1999. A New Group of Hepadnaviruses Naturally Infecting Orangutans (*Pongo pygmaeus*). *J. Virol.* **73**:7860-65.
- Waters JA, Kennedy M, Voet P, Hauser P, Petre J, Carman W und Thomas HC.** 1992. Loss of the common "A" determinant of hepatitis B surface antigen by a vaccine-induced escape mutant. *J Clin Invest* **90**:2543-7.
- Weinberger KM, Bauer T, Bohm S und Jilg W.** 2000. High genetic variability of the group-specific a-determinant of hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) and the corresponding fragment of the viral polymerase in chronic virus carriers lacking detectable HBsAg in serum. *J Gen Virol* **81**:1165-74.

- Westhoff TH, Jochimsen F, Schmittel A, Stoffler-Meilicke M, Schafer JH, Zidek W, Gerlich WH und Thiel E.** 2003. Fatal hepatitis B virus reactivation by an escape mutant following rituximab therapy. *Blood* **102**:1930.
- WHO.** 2002. Hepatitis B, WHO/CDS/CSR/LYO/2002.2: Hepatitis B.
- WHO.** 2008. Hepatitis B, vol. Fact sheet 204. World Health Organisation.
- Wieland SF und Chisari FV.** 2005. Stealth and Cunning: Hepatitis B and Hepatitis C Viruses. *J. Virol.* **79**:9369-80.
- Will H, Reiser W, Weimer T, Pfaff E, Buscher M, Sprengel R, Cattaneo R und Schaller H.** 1987. Replication strategy of human hepatitis B virus. *J. Virol.* **61**:904-11.
- Willand L, Ritter S, Reinhard B, Offergeld R und Hamouda O.** 2008. Infektionsepidemiologische Daten von Blutspendern 2006. Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz **51**:902-14.
- www.Polartravel.de**, posting date. Expeditionsbuch Nordpazifik. [Online.]
- Xiong Y und Eickbush TH.** 1990. Origin and evolution of retroelements based upon their reverse transcriptase sequences. *The EMBO journal* **9**:3353-62.
- Yamamoto K, Horikita M, Tsuda F, Itoh K, Akahane Y, Yotsumoto S, Okamoto H, Miyakawa Y und Mayumi M.** 1994. Naturally occurring escape mutants of hepatitis B virus with various mutations in the S gene in carriers seropositive for antibody to hepatitis B surface antigen. *Journal of virology* **68**:2671-6.
- Yan RQ, Su JJ, Huang DR, Gan YC, Yang C und Huang GH.** 1996. Human hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma. I. Experimental infection of tree shrews with hepatitis B virus. *J Cancer Res Clin Oncol* **122**:283-8.
- Yang Z und Nielsen R.** 2000. Estimating Synonymous and Nonsynonymous Substitution Rates Under Realistic Evolutionary Models. *Mol Biol Evol* **17**:32-43.
- Yeh CT, Chien R-N, Chu C-M und Liaw Y-F.** 2000. Clearance of the original hepatitis B virus YMDD-motif mutants with emergence of distinct lamivudine-resistant mutants during prolonged lamivudine therapy. *Hepatology* **31**:1318-26.
- Yugi H, Mizui M, Tanaka J und Yoshizawa H.** 2006. Hepatitis B virus (HBV) screening strategy to ensure the safety of blood for transfusion through a combination of immunological testing and nucleic acid amplification testing - Japanese experience. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* **36**:S56-S64.

- Zahn A, Li C, Danso K, Candotti D, Owusu-Ofori S, Temple J und Allain J-P.** 2008. Molecular characterization of occult hepatitis B virus in genotype E-infected subjects. *J Gen Virol* **89**:409-18.
- Zhang JM, Xu Y, Wang XY, Yin YK, Wu XH, Weng XH und Lu M.** 2007. Coexistence of hepatitis B surface antigen (HBsAg) and heterologous subtype-specific antibodies to HBsAg among patients with chronic hepatitis B virus infection. *Clin Infect Dis* **44**:1161-9.
- Zoulim F und Locarnini S.** 2009. Hepatitis B Virus Resistance to Nucleos(t)ide Analogues. *Gastroenterology*.
- Zuckerman JN und Zuckerman AJ.** 2003. Mutations of the surface protein of hepatitis B virus. *Antiviral Res* **60**:75-8.

8 Danksagung

Prof. Dr. phil. nat. Wolfram H. Gerlich

(Institut für Medizinische Virologie, FB 11, Humanmedizin, JLU Gießen)

Herzlichen Dank für die Bereitstellung des interessanten Themas, die engagierte Betreuung, die rege Diskussionsbereitschaft und dass Sie stets ein offenes Ohr für die Belange Ihrer Mitarbeiter haben.

Prof. Dr. Albrecht Bindereif

(Institut für Biochemie, FB 08, Biologie, JLU Gießen)

Danke für die freundliche Betreuung und die Vertretung meiner Arbeit vor dem Fachbereich 08, Biologie und Chemie.

Prof. Dr. Tina E. Trenczek

(Institut für Allg. Zoologie und Entwicklungsbiologie, FB 08, Biologie, JLU Gießen)

Danke für die freundliche Bereitschaft als Drittprüferin meiner Disputation beizusitzen und Ihr Engagement als Studiendekanin wodurch ich die Möglichkeit erhielt im Institut für Medizinischen Virologie meine Diplomarbeit anzufertigen.

PD Dr. Dieter Glebe

(Institut für Medizinische Virologie, FB 11, Humanmedizin, JLU Gießen)

Danke für die Betreuung im Labor und die wissenschaftliche Hilfestellung.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Virologie

Herzlichen Dank für eure Unterstützung! Durch das kollegiale und freund(schaft)-liche Arbeitsklima sind mir viele von Euch in den letzten Jahren sehr ans Herz gewachsen. Deshalb ein besonderer Dank nochmals an: **Siggi** (die gute Seele des Labors, welches nicht ganz rund läuft wenn sie im Urlaub ist. Danke für die Tipps und Tricks bei der Zellkultur), **Ulli** (die Königin, und meine ganz persönliche Heldin, der Sequenzauswertungen! Es ist mal wieder Zeit für einen Spieleabend), **Nicky** (die nicht nur „Die Tante“, sondern auch die liebste Freundin, Kollegin und „Mitbewohnerin“ des Kabuffs ist. Danke für die tolle Zeit!), **Andi** (der

„Besserwisser“; Danke für die vielen guten Gespräche und die unterhaltsamen Kaffeepausen mit den Gesangseinlagen von Roy; Grüße vom/ans Hepple), **Alex** (der „Chaos“-Mann; Denk dran, du hast noch eine „Grill-Schuld“ zu begleichen!), **Heidi** (die liebenswerte Medizinerin, die mit ihrer Begeisterung und positiven Art jeden mitreißt!), **Corinna** (die Frau auf der Überholspur; Interesse am Musenkeller oder Paddeln mit den Malzbierbrüdern?), **Alex** (die tapfere Marburgerin; Tchacka!!! Bald ist es geschafft! *Good luck!*)

Und ein Dank natürlich an einige Ehemalige wie: **Steffi** (die Krebsfrau mit der harten Schale, aber dem weichen Kern. Danke für die kurzweiligen Mittagspausen!), **Heike** (meine Zweifach-Kollegin, Danke für die Hilfestellung im EV), **Christiane** (meine Mitstreiterin im FCE-Kurs, dem Anfang einer tollen Freundschaft), **André** (der „2-Meter-Mann“; Danke für die anregenden Unterhaltungen während der Frühstückspausen und der guten alten Mittwochs-*Events*), **Evi** (Grüße vom Dorf, lass uns unbedingt mit den Gummistiefeln ins „Tirili“ gehen), **Birgit** (für die Pseudo-Raucherpausen als es noch schwer war sich an das Leben eines Nichtraucher zu gewöhnen) und allen die ich hier namentlich nicht erwähnt habe...

Meinen Mädels

Einen lieben Dank besonders an **Steffi** (auf die nächsten 10 Jahre!) und natürlich an **Anja, Susi, Angela, Sabine, Dörte, Michi, Alex** und **Isa**. Ohne euch wäre meine Studienzeit nicht so interessant, lustig, schön, aufreibend und erfolgreich gewesen. Ein besonderer Dank auch meiner lieben Freundin **Karo**, die mit mir seit der Oberstufe durch dick und dünn geht. Obwohl unserer Wege streckenweise so unterschiedlich verlaufen sind, treffen wir uns immer wieder!

Meinem Freund und Partner Jens

Ein besonders lieber Dank gilt dem Mann an meiner Seite. Danke für deine Unterstützung und den Stubs in die richtige Richtung. Nun wird es eng auf dem Klingelschild :-)

meinen Eltern

Danke, dass ihr mir das alles ermöglicht und mich immer unterstützt habt!

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the
electronic version of the paper.**

10 Publikationen und Kongressbeiträge

Bremer CM, **Saniewski M**, Wend UC, Torres P, Lelie N, Gerlich WH, Glebe D.
Transient occult hepatitis B virus infection in a blood donor with high viremia

Transfusion. 2009 Apr 24. [Epub ahead of print]

Gerlich WH, Wagner FF, Chudy M, Harritshoj LH, Lattermann A, Wienzek S, Glebe D, **Saniewski M**, Schüttler CG, Wend UC, Willems WR, Bauerfeind U, Jork C, Bein G, Platz P, Ullum H, Dickmeiss E

HBsAg Non-Reactive HBV Infection in Blood Donors: Transmission and Pathogenicity

Journal of Medical Virology. 2007.79, S32-S36

Third European Congress of Virology,

Nürnberg, Deutschland, 1.-5. September, 2007,

Infectivity and pathogenicity of HBsAg negative blood donations containing mutants of hepatitis B virus

M.Saniewski, D.Glebe, W.H.Gerlich

International Meeting of Molecular biology of Hepatitis B viruses

Rom, Italien, 16.-20.September, 2007

HBsAg-negative HBV variants in blood donors: infectivity, pathogenicity and variability

M.Saniewski, D.Glebe, W.H.Gerlich

13th International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease

Washington, DC USA, 20.-24.März, 2009

Occult Hepatitis B virus variants in persistently infected blood donors without detectable HBsAg: infectivity, pathogenicity and variability

W.H.Gerlich, **M.Saniewski**, D.Glebe

11 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt,
die vorliegende Dissertation selbständig ausgeführt
und keine anderen als die angegebenen
Hilfsmittel verwendet zu haben.

Gießen, 20.10.2009

Mona Saniewski