

Die Bedeutung der Gentechnik für die Diagnose und Prävention der Hepatitis B Virus Infektionen

W.H. Gerlich

Abteilung für Medizinische Mikrobiologie, Universität Göttingen

Bis heute wird die Untersuchung des Hepatitis B Virus (HBV) durch den Umstand erschwert, daß dieses Virus nicht in Zellkultur oder einfachen Versuchstieren vermehrt werden kann. Für wissenschaftliche und diagnostische Zwecke standen bisher das virale Hüllantigen (HBsAg) und ein lösliches Abbauprodukt des Core-Proteins (e-Antigen, HBeAg) zur Verfügung, weil bei einem Teil der chronischen Virusträger diese Antigene in reichlicher Menge in das Blut sezerniert werden. HBV selbst, sein Genom und das virale Core-Partikel waren jedoch nur in knappen Mengen erhältlich und konnten daher nur unvollständig analysiert werden. Eine wesentliche Erleichterung und Erweiterung der Forschungsmöglichkeiten entstand dadurch, daß Ende der siebziger Jahre das HBV-Genom von mehreren Arbeitsgruppen [4, 14, 15, 25] in bakterielle Plasmide eingesetzt und in *E. coli* transferiert („kloniert“) wurde. Die nunmehr verfügbaren größeren Mengen HBV DNA erlaubten die Sequenzanalyse des Genoms, die Identifikation bislang unbekannter Gene und die Gewinnung der Genprodukte in verschiedenen Wirtszellen wie Bakterien, Hefezellen oder animalen Zellkulturen [15, 27].

Infektiositätsnachweis durch DNA-Hybridisierung

Bei den meisten chronischen Virusträgern befinden sich die Virusgenome nur in der Leberzelle. In das Blut werden bei diesen Personen nur die nicht infektiösen 20 nm Partikel des HBsAg ausgeschieden. Um diesen Personen die großen Restriktionen zu ersparen, die infektiösen Virusträgern auferlegt werden müssen, ist es essentiell, hoch-virämische HBsAg-Träger von nicht- oder gering-virämischen HBsAg-Trägern zu unterscheiden.

Bei hoch-virämischen HBsAg-Trägern werden typischerweise 10^8 infektiöse Einheiten/ml gefunden. Die Zahl der nachweisbaren Virus-Genome liegt in der gleichen Größenordnung und ist somit ein ziemlich direkter Marker für die Infektiosität des Blutes. Zum Nachweis der HBV-Genome werden die Viren am besten in einer kleinen Serumprobe mit Natronlauge aufgelöst und die viralen

DNA-Doppelstränge in Einzelstränge gespalten. Diese lysierte Serumprobe wird durch Membranfilter passiert, wobei sich eventuelle vorhandene virale DNA an das Filter bindet [17]. Das Filter wird nun mit hoch radioaktiver ^{32}P HBV DNA versetzt, die im positiven Fall mit der HBV DNA am Filter hybridisiert und gebunden wird, im negativen Fall weggewaschen werden kann. Erst durch die Genklonierung steht HBV DNA als Reagens in ausreichender Menge und Qualität zur Verfügung. Das relativ einfache Nachweisverfahren erlaubt die Entdeckung von 5000 Genomen in 0,1 ml Serum und ist somit mindestens zwei Zehnerpotenzen empfindlicher als die bisher üblichen umständlicheren Verfahren zum HBV-Nachweis.

Als indirekter Marker für eine massive Virämie wird bislang ersatzweise das HBeAg betrachtet. Personen mit einem HBeAg-Titer über 1:32 im Radioimmunoassay oder Enzymimmunoassay (RIA, EIA) haben im allgemeinen Genom-Titer von 10^7 /ml. Bei Personen mit niedrigerem HBeAg-Titer ist jedoch oft keine HBV-DNA nachweisbar. Gesunde HBsAg-Träger mit anti-HBe waren nach unseren Beobachtungen bisher nie HBV DNA positiv, während Patienten mit chronischer Hepatitis B oft auch dann nachweisbar virämisch sind, wenn anti-HBe vorliegt. Bei chronischen HBsAg-Trägern sollte also neben der HBeAg/anti-HBe-Bestimmung zur besseren Klärung des Infektiositätsproblems eine Bestimmung der HBV DNA im Serum erfolgen (Zyzik et al. in Vorbereitung).

Onkogenität und Replikation des HBV

Klonierte ^{32}P -markierte HBV DNA war auch als Reagens nützlich für den Nachweis integrierter HBV DNA im Genom von primären Leberzellkarzinomen. Der fast regelmäßige Nachweis von integrierter HBV DNA in den Lebertumorzellen [3, 24] scheint die epidemiologischen Beobachtungen zu bestätigen, daß HBV ein wichtiger Faktor für die Entstehung des Leberkarzinoms ist [2]. Trotz aufwendiger molekularbiologischer Studien über die Bedeutung dieser integrierten Sequenzen, gibt

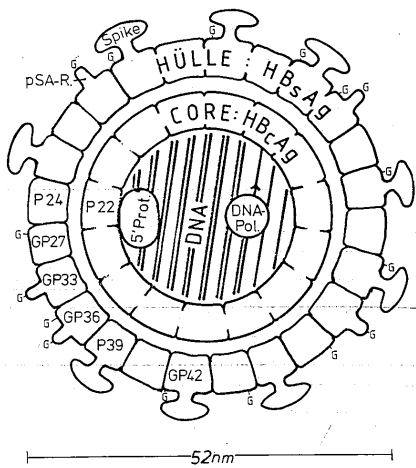


Abb. 2. Schematischer Aufbau des HBV. Die Hülle wird im wesentlichen aus etwa 400 hydrophoben P24/GP27-Untereinheiten gebildet. GP33/36 und P39/GP42 sind über ihren carboxy-terminalen P24/GP27-Anteil in die Hülle integriert. Der poly-Serumalbumin-Rezeptor (pSA-R.) des GP33/36 und die Spikes-Struktur des P39/GP42 ragen als hydrophile Bereiche nach außen. G kennzeichnet asparaginverknüpfte Glykosidseitenketten. Die genaue Form der Spikes oder des pSA-Rezeptors und ihre relative Anordnung zueinander in der Hülle sind nicht bekannt. – Die etwa 180 P22-Untereinheiten des Core-Partikels umschließen die teilweise doppelsträngige HBV-DNA, an die ein Primer-Protein (5' Prot.) und die virale DNA-Polymerase (Pol) gebunden sind

eine antivirale Wirkung hat. In diesem Fall würde das Prä-S(1) des HBV dem genetisch ebenfalls sehr variablen Hämagglutinin des Influenzavirus entsprechen.

Die herkömmlichen Nachweisverfahren für anti-HBs erfassen Antikörper gegen das Prä-S(1)-Stück nicht. Daher ist der Verlauf und die Wirkung der natürlichen Immunantwort gegen das Prä-S(1)-Stück bei unterschiedlichen Typen von Hepatitis B-Infektionen nicht bekannt. Alle bisher bekannten Daten sprechen dafür, daß das Prä-S(1)-Stück wichtige schützende Epitope trägt. Mit der gelungenen gentechnischen Synthese des Prä-S(1)-Polypeptids in *E. coli* sollte es bald möglich sein, die Immunantwort gegen diesen HBV-Bestandteil und seine mögliche Schutzwirkung besser zu untersuchen (Uy et al., in Vorbereitung).

Gentechnische Synthese des viralen Core-Partikels

Das Core-Partikel induziert von allen Bestandteilen des HBV die stärkste humorale Immunantwort. So ist IgM anti-HBc ein wichtiger Parameter der akuten HBV-Infektion, während anti-HBc Gesamtantikörper als universellster Marker einer aktiven oder überwundenen HBV-Infektion gelten. Das für die Diagnostik benötigte Core-Antigen

(HBcAg) wurde bisher aus gereinigten HBV-Partikeln oder aus infizierter Leber von verstorbenen Personen extrahiert. Auf diese problematischen Rohstoffe kann nunmehr verzichtet werden, da HBcAg sehr effizient in *E. coli* produziert werden kann. Das produzierte P22 Core-Protein lagert sich in den Bakterien spontan zu Core-Partikeln mit authentischer HBc-Antigenität zusammen [18, Bruss et al., in Vorbereitung]. Ein umfangreicher Vergleich von HBcAg aus *E. coli* und aus Leber für den Nachweis von anti-HBc in mehr als tausend Seren ergab eine völlige Übereinstimmung. Die bekannte Problematik grenzwertig positiver Befunde bei einem kleinen Teil von nicht infizierten Personen wird auch bei Verwendung des gentechnisch hergestellten HBcAg nicht behoben (Gerlich et al., nicht publiziert). Es handelt sich wohl um eine Kreuzreaktion des HBcAg mit unbekanntem Serumfaktoren.

Bedeutung des HBeAg und anti-HBe

Lange Zeit war die molekulare Natur des HBeAg ungeklärt. Erst als das Gen für das Core-Protein identifiziert und sequenziert war, wurde eindeutig klar, daß HBeAg aus gentechnisch hergestelltem Core-Protein durch Behandlung mit anionischen Detergentien und/oder Proteasen erzeugt werden kann [11]. Das im Serum von virämischen Personen zirkulierende P16 HBeAg-Protein leitet sich von einem der Core-Proteine durch Abspaltung des nukleinsäurebindenden Carboxy-Endes ab [22]. Die physikalische Heterogenität des HBeAg entsteht dadurch, daß das P16 an verschiedene Serumproteine, speziell an IgG gebunden ist. Die biochemische Natur des HBeAg so wie sie in chronisch infizierten Personen bisher gesehen wird, gibt keinerlei Anhaltspunkte für seine biologische Funktion, außer daß es ein Abbauprodukt des Core-Proteins ist. Um so überraschender ist es, daß anti-HBe im Gegensatz zu anti-HBc eine gewisse Schutzwirkung hat. Epidemiologische Beobachtungen und Bestimmungen des HBV-Titers in anti-HBe-positiven Proben hatten auf eine solche Schutzwirkung hingedeutet. Nach Immunisierung mit gentechnisch hergestelltem HBcAg waren Schimpansen, die neben viel anti-HBc auch etwas anti-HBe gebildet hatten, gegen Infektion mit 3000 infektiösen HBV-Dosen geschützt. Ein Schimpanse, der nur anti-HBc gebildet hatte, war nicht geschützt [12]. Verständlich wird der rätselhafte Schutzeffekt des anti-HBe eventuell durch die Beobachtung, daß zumindest in gentechnisch entsprechend programmierten *E. coli* Zellen nicht nur HBcAg, sondern auch ein membran-assoziiertes P25 Prä-Core-Protein gebildet wird, das auch ohne Detergens- oder Protease-Einwirkung HBc-Antigenität besitzt (Uy et al., in Vorbereitung). Falls ein ähnliches Produkt auch in der Membran infi-

zierter Leberzellen vorliegt, würde es ein Target für eine Immunreaktion gegen HBeAg darstellen. Die Prä-Core-Sequenz des P25 ähnelt einem Signalpeptid, das bei membran-assoziierten oder sezernierten Proteinen den Übertritt des neugebildeten Genprodukts in das Lumen des endoplasmatischen Reticulums bewirkt. Das im Serum gefundene HBeAg geht möglicherweise aus dem P25 durch die Abspaltung des Signalpeptids hervor, was in Analogie zu vielen sekretorischen Proteinen auf eine aktive Sekretion hindeuten würde.

Zusammenfassung. Gentechnische Methoden erlauben die einfache Herstellung des HBsAg zur Verwendung als Impfstoff gegen Hepatitis B oder des HBcAg als wichtiges diagnostisches Antigen. In *E. coli* klonierte HBV DNA ist ein wichtiges Reagenz zum Nachweis der Virus-Genome im Serum, im infizierten Gewebe und in Lebertumorzellen. Darüber hinaus ermöglichten die modernen molekulargenetischen Methoden die Identifikation bisher unbekannter Virusbestandteile. Einige dieser Genprodukte, wie der poly-Albumin-Rezeptor, das große Oberflächenprotein oder das Prä-Core-Protein induzieren vermutlich eine schützende Immunantwort und könnten als potentielle Impfstoffkomponenten die noch nicht ganz befriedigende Schutzwirkung des bisher verwendeten HBsAg-Impfstoff verbessern.

Danksagung. Die bisher nicht im Detail publizierten Ergebnisse wurden zusammen mit V. Bruss, K.H. Heermann, H. Köchel, A. Uy und E. Zyzik erarbeitet. Prof. Dr. R. Thomssen unterstützte die Arbeiten auf großzügige Weise.

Literatur

- Alberti A, Diana S, Scullard GH, Eddlestone ALWF, Williams R (1978) Detection of a new antibody system reacting with Dane particles in hepatitis B virus infections. *Br Med J* 2:1056
- Beasley RP, Hwang LY (1984) Epidemiology of hepatocellular carcinoma. In: Vyas GN, Dienstag JL, Hoofnagle JH (Hrsg) *Viral Hepatitis and Liver Disease*. Grune & Stratton, Orlando, S 209
- Brechot C, Lugasay C, Dejean A, Pontisso P, Thiers V, Berthelot P, Tiollais P (1984) Hepatitis B Virus DNA in infected human tissues. In: *dto*, S 395
- Galibert F, Mandart E, Fitoussi F, Tiollais P, Charney P (1979) Nucleotide sequence of the hepatitis B genome (sub-type ayw) cloned in *E. coli*. *Nature (London)* 281:646-650
- Gerin JL, Alexander H, Shih JW-K, Purcell RH, Dapolito G, Engle R, Green N, Sutcliffe JG, Shinnick TM, Lerner RA (1983) Chemically synthesized peptides of hepatitis B surface antigen duplicate known serological specificity and induce type-specific antibody in chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci* 80:2365
- Gerlich WH, Robinson WS (1980) Hepatitis B Virus contains protein attached to 5' terminus of its complete DNA strand. *Cell* 21:801
- Heermann KH, Goldmann U, Schwartz W, Seyffarth T, Baumgarten H, Gerlich WH (1984) Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-S sequence. *J Virol* 52:396
- Kennedy RC, Dreesman GR (1984) Enhancement of the immune response to hepatitis B surface antigen. *J Exp Med* 159:655
- Machida A, Kishimoto S, Ohnuma H, Baba K, Ito Y, Miyamoto H, Funatsu G, Oda K, Usuda S, Togami S, Nakamura T, Miyakawa Y, Mayumi M (1984) A polypeptide containing 55 amino acid residues coded by the pre-S region of hepatitis B virus deoxyribonucleic acid bears the receptor for polymerized human as well as chimpanzee albumins. *Gastroenterology* 86:910-918
- McAleer WJ, Buynak EB, Maigetter RZ, Wampler DE, Miller WJ, Hilleman MR (1984) Human hepatitis B vaccine from recombinant yeast. *Nature* 307:178
- McKay P, Lees J, Murray K (1981) The conversion of hepatitis B core antigen synthesized in *E. coli* into e Antigen. *J Med Virol* 8:237
- Murray K, Bruce SA, Hinnen A, Wingfield P, van Erd PMCA, de Reus A, Schellekens H (1984) Hepatitis B virus antigens made in microbial cells immunize against viral infection. *EMBO Journal* 3:645
- Neurath AR, Kent SBH, Strick N (1984) Location and chemical synthesis of a pre-S gene coded immunodominant epitope of hepatitis B virus. *Science* 224:392
- Pasek M, Goto T, Gilbert W, Zink B, Schaller H, McKay P, Leadbetter G, Murray K (1979) Hepatitis B virus genes and their expression in *E. coli*. *Nature (London)* 282:575-579
- Robinson WS (1983) Hepatitis B Virus in: Deinhardt F, Deinhardt J. *Viral Hepatitis Laboratory and Clinical Science*. Marcel Dekker, New York-Basel, S 57-117
- Scolnick EM, McLean AA, West JD, Dienstag JL, Watkins E, Deinhardt F, Jilg W (1984) Antibody and clinical responses among healthy adults to a hepatitis B vaccine made by recombinant DNA. In: *s. Lit.* 27, S 315
- Scoto J, Hadchouel M, Hery C, Yvart J, Tiollais P, Brechot C (1983) Detection of hepatitis B virus DNA in serum by a simple spot hybridization technique: comparison with results for other viral marker. *Hepatology* 3:279
- Stahl S, McKay P, Magazini M, Bruce SA, Murray K (1982) Hepatitis B virus antigen: Synthesis in *Escherichia coli* and application in diagnosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 79:1606
- Sübbe W, Gerlich WH (1982) Variable protein composition of hepatitis B surface antigen from different donors. *Virology* 123:436-442
- Stibbe W, Gerlich WH (1983) Structural relationships between minor and major proteins of hepatitis B surface antigen. *J Virol* 46:626-628
- Summers J (1984) Replication of hepatitis B viruses. In: *s. Lit.* Nr. 27, S 87
- Takahashi K, Michada A, Funatsu G, Nomura M, Usuda S, Aoyagi S, Tachibana K, Miyamoto H, Imai M, Nakamura T, Miyakawa Y, Mayumi M (1983) Immunochemical structure of hepatitis B e antigen in the serum. *J Immunol* 130:2903
- Thung SN, Gerber MA (1983) Albumin binding sites of human hepatocytes. *Liver* 3:290
- Tiollais P, Dejean A, Brechot C, Michel ML, Sonigo P, Wain-Hobson S (1984) Structure of Hepatitis B Virus DNA. In: *s. Lit.* Nr. 27, S 49
- Valenzuela P, Quiroga M, Zaldivar J, Gray P, Rutter WJ (1981) The nucleotide sequence of the hepatitis B viral genome and the identification of the major viral genes. p 57-70. In: Fields B, Jaenisch R, Fox CF (eds) *Animal virus genetics*. Academic Press, New York
- Varmus HE (1984) Do hepatitis B viruses make a genetic contribution to primary hepatocellular carcinoma? In: *s. Lit.* Nr. 27, S 411
- Vyas GN, Dienstag JL, Hoofnagle JH (Herausgeber) (1984) *Viral Hepatitis and Liver Disease*. Grune & Stratton, Orlando

Prof. Dr. W.H. Gerlich
Hygiene Institut
Kreuzbergstr 57
D-3400 Göttingen