

# **Schnelle und einfache Bestimmung der Genotypen des Hepatitis B Virus durch eine Multiplex-PCR**

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

vorgelegt von  
aus

Dipl.-Biol. Oliver Kirschberg  
Herten in Westfalen

Gießen, im Mai 2002

Aus dem Zentrum für Medizinische Mikrobiologie und Virologie

Institut für Medizinische Virologie

Leiter: Prof. Dr. Wolfram H. Gerlich

des Universitätsklinikums Gießen

Gutachter: Priv.-Doz. Dr. med. S. Schaefer

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. E. Beck

Tag der Disputation: 7. November 2002

---

## Inhalt

<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Klinischer Verlauf der Hepatitis B Infektion	1
1.2 Das Hepatitis B Virus	2
1.2.1 Struktur und Genomaufbau des Hepatitis B Virus	3
1.2.2 Replikation des Hepatitis B Virus	6
1.2.3 Virusfamilie und Verwandtschaftsbeziehung des HBV	8
1.3 Genotypen des Hepatitis B Virus	10
1.3.1 Weltweite Verbreitung der Hepatitis B Virus Genotypen	11
1.3.2 Pathogenität der Hepatitis B Virus Genotypen	12
1.4 Ziel der Arbeit	12
<b>2 Materialien</b>	<b>13</b>
2.1 Primer	13
2.1.1 Primer für die Polymerase Kettenreaktion	13
2.1.2 Primer für den LightCycler™	15
2.1.3 Hybridisierungssonden	16
2.2 Plasmide	16
2.2.1 pBlue 991 E-Dimer T7	16
2.2.2 pHTD	16
2.2.3 Plasmid D1 Dimer	17
2.2.4 pSM2	17
2.2.5 GS-A135	17
2.2.6 pBSadw4	18
2.3 Humane Seren	18
2.3.1 ID 221	18
2.3.2 ID 123	18
2.3.3 HBV-C-Serum	18
2.3.4 Eurohep-Standard 2	19
2.3.5 HBV-Referenzserum für den LightCycler™	19
2.4 DNA-Längenstandard	19
2.5 Chemikalien	19
2.6 Verbrauchsmaterialien	20

---

2.7 Geräte	20
2.8 Puffer und Lösungen	21
2.8.1 Lösung zur Agarose-Gelelektrophorese	21
2.8.2 Puffer zur Aufreinigung von viraler DNA und RNA	21
2.8.3 Puffer zur Plasmid-Maxipräparation	22
<b>3 Methoden</b>	<b>23</b>
3.1 Konventionelle PCR	23
3.2 Hot Start PCR	23
3.3 Multiplex-PCR zur Typisierung von HBV	24
3.4 Quantifizierung der Genomäquivalente mit dem LightCycler™	26
3.5 Agarose-Gelelektrophorese	28
3.6 Gewinnung von viraler DNA	29
3.7 Analyse der Schmelztemperatur ( $T_m$ ) der Primer	30
3.8 Sonstige Methoden	31
3.8.1 Plasmid-Maxipräparation	31
<b>4 Ergebnisse</b>	<b>32</b>
4.1 Kein eindeutiger Nachweis durch HBV-Subtypspezifische Primer	32
4.2 Konstruktion Genotyp-spezifischer HBV-Primer	34
4.3 Optimierung der PCR Methodik	39
4.4 Nachweis der Spezifität der Primer	42
4.5 Quantifizierung	45
4.5.1 Quantitätsnachweis der HBV-DNA mit dem LightCycler™	45
4.5.2 Nachweis der Empfindlichkeit in der Hot Start PCR	46
4.6 Nachweis der Anwendbarkeit auf klinische Proben	49
<b>5 Diskussion</b>	<b>50</b>
5.1 Genotypisierung von HBV mit dem Multiplex-PCR Protokoll	50
5.1.1 Optimierung des Systems	50
5.1.2 Empfindlichkeit des Systems	51
5.2 Ist dieses Multiplex PCR Protokoll besser als andere Methoden?	52
5.3 Ausblick	55
5.4 Zusammenfassung	56

<b>6 Abkürzungen</b>	57
<b>7 Literaturverzeichnis</b>	60
<b>8 Lebenslauf</b>	68
<b>9 Danksagung</b>	70

# 1 Einleitung

Pathogenetisch können einer Hepatitis nicht infektiöse (ethyltoxische Genese, Aflatoxine, erbliche Lebererkrankungen sowie eine Vielzahl weiterer Noxen) oder infektiöse Ursachen (zumeist viraler Genese) zugrunde liegen. Bislang konnten 5 hauptsächlich hepatotrope Viren, die sowohl akute als auch chronische Hepatitiden auslösen können, identifiziert werden (Blum, 1998). Das Hepatitis B Virus wurde in den 70er Jahren von Dane et al. (Dane et al., 1970) als Ursache der Serum Hepatitis identifiziert, nachdem B. Blumberg in australischen Ureinwohnern das sogenannte „Australia Antigen“ gefunden hatte (Blumberg et al., 1967). In Australia-Antigenhaltigem Serum konnten Dane und Mitarbeiter neben pleomorphen, sphärischen und filamentösen Partikeln auch die 45 nm großen Hepatitis B Virionen (Dane et al., 1970), die anschließend daran auch Dane-Partikel genannt wurden, entdecken. Gegen Ende der 70er Jahre und Anfang der 80er Jahre wurde das Hepatitis B Virus schließlich kloniert und sequenziert (Tiollais et al., 1981; Sninsky et al., 1979).

## 1.1 Klinischer Verlauf der Hepatitis B Infektion

Das Hepatitis B Virus ist weitestgehend hepatotrop. Je nach Infektionsdosis beträgt die Inkubationsdauer bis zu den ersten klinischen Symptomen zwischen 8 Wochen bis 6 Monaten. Bei Jugendlichen und Erwachsenen verlaufen 65% der Fälle symptomlos, bei den restlichen 35% kommt es zu den klinischen Anzeichen einer Hepatitis. Das Hauptsymptom der akuten Hepatitis ist der Ikterus, der allerdings auch fehlen kann (anikterische Hepatitis). Daneben treten weitere Symptome wie die Hepatomegalie, eine Prodromalsymptomatik (Müdigkeit, Abgeschlagenheit, Appetitlosigkeit, Unwohlsein), selten eine Störung der Hämatopoese und Exantheme auf (Toda, 1999; Pinol Aguade and Mascaro, 1971). In 5 bis 10% aller HBV-Infektionen findet sich ein chronischer Verlauf, der als Hepatitis B Surface-Antigen (HBsAg, Hepatitis B Oberflächen-Protein) Persistenz für mehr als 6 Monate definiert ist. Prä- oder perinatale HBV-Infektionen führen dabei in 90% zu chronischen Hepatitiden, in der Regel ohne Erkrankungssymptomatik. Von den chronisch erkrankten Patienten bleiben ca. 80% asymptomatische Virusträger, die gesund

erscheinen und ca. 20% entwickeln eine klinisch auffällige chronische HBV-Infektion. Histopathologisch unterscheidet man bei den symptomatischen chronischen Hepatitis B Infektionen eine chronisch-persistierende Hepatitis und eine chronisch-aggressive Hepatitis. Die chronisch-aggressive Hepatitis kann spontan in eine chronisch-persistierende Hepatitis übergehen, hat aber im Vergleich zur Letzteren eine schlechtere Prognose. Sie führt öfter zu den Folgeerkrankungen der Leberzirrhose und des Hepatozellulären Karzinoms (HCC) (Kane, 1998). Insgesamt gehen ca. 20 bis 30% der chronischen Hepatitiden in eine Leberzirrhose über. Das Risiko für die Entwicklung eines HCC bei chronisch HBV-Infizierten ist um den Faktor 100 bis 200 gegenüber den Vergleichsgruppen erhöht (Beasley et al., 1982).

Die Krankheitssymptome des akuten und chronischen Stadiums bei einer HBV-Infektion gehen vorwiegend auf die zellvermittelte Immunabwehr des Wirtsorganismus (sogenannte Immunpathogenese) zurück (Chisari und Ferrari, 1995), die zur Elimination und Zerstörung der HBV-infizierten Hepatozyten führt.

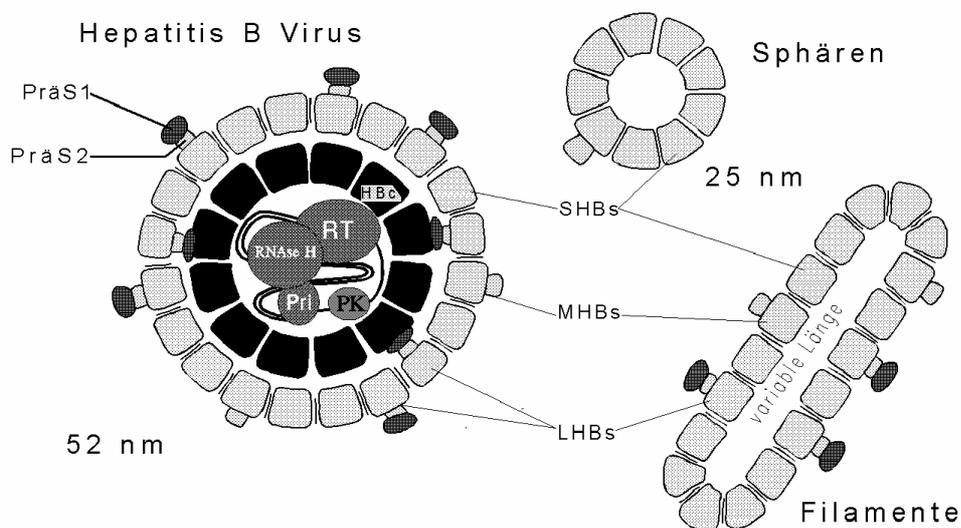
Weltweit stellt HBV ein großes gesundheitliches und wirtschaftliches Problem dar (Harbarth et al., 2000). Nach Schätzung der WHO sind etwa 350 Millionen Menschen chronische Virusträger und ca. 1/3 der Weltbevölkerung hat mindestens einmal Kontakt mit dem Virus gehabt. Im mitteleuropäischen Raum ist der Anteil der chronisch Infizierten relativ gering (Maddrey, 2000), während er in Südostasien und in weiten Teilen Afrikas bis zu 20% der Bevölkerung einnehmen kann. Todesfälle, die im Verlauf einer HBV Infektion auftreten, stehen weltweit an Position 5 der Mortalitätsstatistik.

## **1.2 Das Hepatitis B Virus**

Zum Anfang dieses Kapitels wird die Struktur und der Genomaufbau sowie der Replikationszyklus des Hepatitis B Virus erläutert. Danach wird auf die Zugehörigkeit des Hepatitis B Virus zu seiner Virusfamilie, den Orthohepadnaviridae, und abschließend auf die Verwandtschaftsbeziehung des Hepatitis B Virus zu den übrigen Hepadnaviren eingegangen.

### 1.2.1 Struktur und Genomaufbau des Hepatitis B Virus

Das Hepatitis B Virus stellt sich als ein sphärisches umhülltes DNA-Virus mit einem Durchmesser von 52 nm im hydrierten Zustand dar (Jursch, 2000). Es werden auch in der Negativkontrast-Elektronenmikroskopie Durchmesser mit 42 bis 45 nm beschrieben (Dane et al., 1970). Umgeben ist das Virus von einer Lipidhülle, in der die Hepatitis B Surface-Proteine (HBsAg) verankert sind (Almeida et al., 1971). Im Inneren des Virus befindet sich das etwa 34 nm große ikosaedrische Core-Partikel (Conway et al., 1997), welches aus 180 oder 240 Hepatitis B Core-Proteinen (HBcAg) besteht und die virale Nukleinsäure enthält. Des weiteren findet man ein kovalent gebundenes Protein am 5'-Ende des kodierenden DNA-Stranges (Gerlich und Robinson, 1980). Außer den infektiösen Virionen findet man im Serum infizierter Patienten große Mengen an subviralen Partikeln. Diese sind zum einen sphärische Partikel mit einem Durchmesser von ca. 22 nm und zum anderen Filamente mit variabler Länge. Die Abbildung 1.1 zeigt den strukturellen Aufbau des Hepatitis B Virus sowie der sphärischen und filamentösen Partikel.

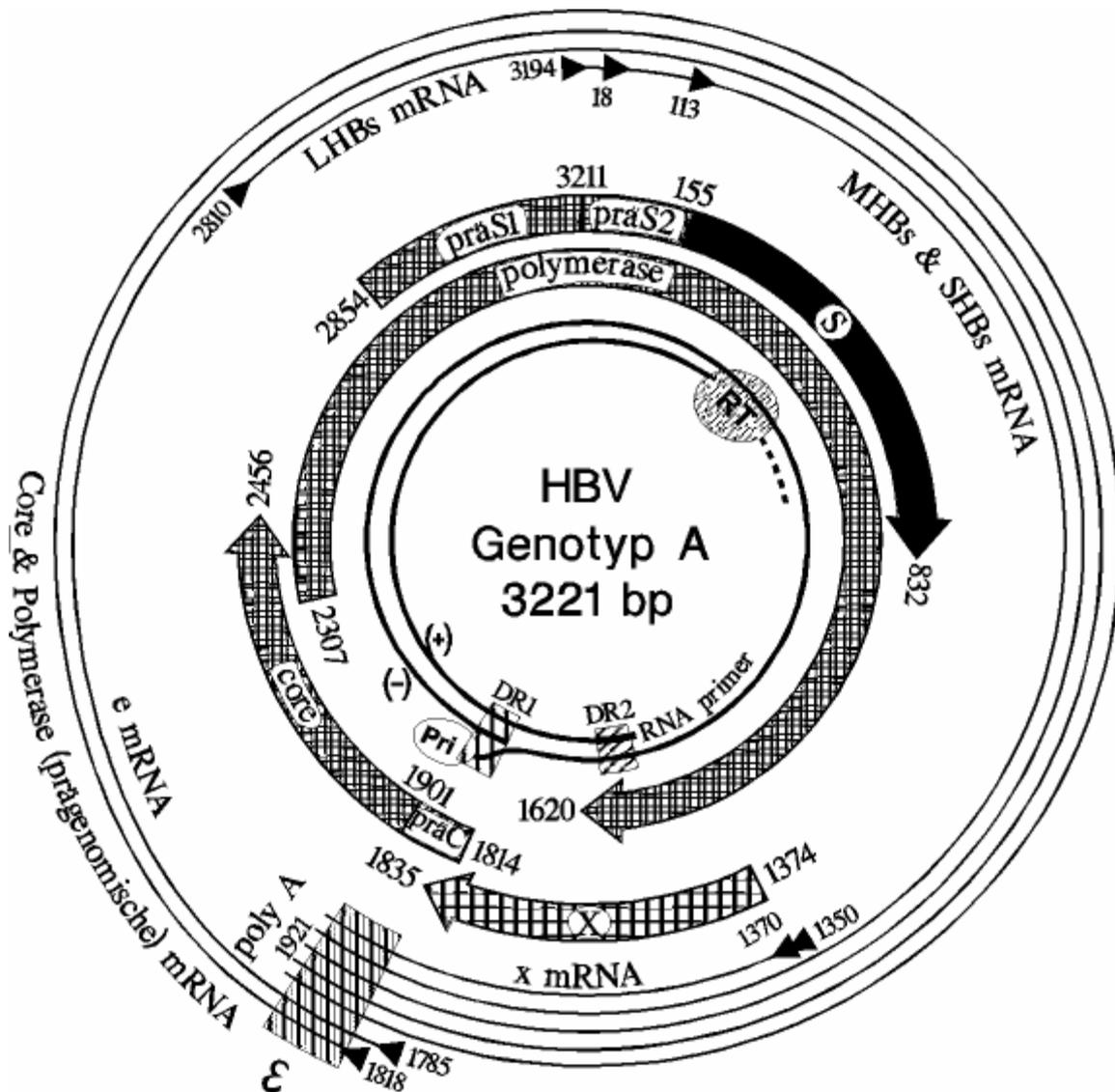


**Abb. 1.1: Struktureller Aufbau des Hepatitis B Virus, sphärischer und filamentöser Partikel.**

Dargestellt sind das innere Nukleokapsid (HBc), das virale Genom, die Polymerase (mit reverser Transkriptaseaktivität (RT), RNase H und einer Primerdomäne (Pri)), sowie die subviralen Partikel (sphärische und filamentöse Elemente). SHBs, MHBs und LHBs repräsentieren das kleine, mittlere und große Hepatitis B Surface-Protein. PräS1 ist die Domäne, die LHBs (39 + 42 kD) zusätzlich gegenüber MHBs hat; PräS2 ist die Domäne, die MHBs (33 + 36 kD) zusätzlich gegenüber SHBs hat; Proteinkinase (PK).

Das Genom des Hepatitis B Virus besteht aus einer etwa 3200 bp langen, nur teilweise doppelsträngigen DNA, wobei der Minusstrang vollständig ist. Der unvollständige und in seiner Länge variable Plusstrang besitzt nur 40 bis 85% des Genoms (1300 bis 2800 Nukleotide) (Hruska et al., 1977; Landers et al., 1977). Der kodierende Minusstrang trägt vier konservierte offene Leserahmen (ORF) (Abb. 1.2); zur Übersicht (Kann und Gerlich, 1998).

Der größte offene Leserahmen kodiert für die virale Polymerase, deren verschiedene Domänen als terminales Protein (Primase), DNA-Polymerase und RNase H fungiert. Der zweite ORF beinhaltet die Information für die drei Hepatitis B Surface-Proteine: das kleine (small), das mittlere (middle) und das große (large) Surface-Protein (SHBs, MHBs und LHBs). Der dritte ORF kodiert für das Core-Protein (HBcAg) und eine modifizierte Form des Core-Proteins (HBeAg), welches sezerniert wird und dessen Funktion noch nicht geklärt ist. Im vierten und letzten offenen Leserahmen ist die Sequenz für ein Protein unbekannter Funktion festgelegt, dem aber in verschiedenen *in vitro* Versuchen eine Vielzahl von Eigenschaften zugeschrieben werden können (Apoptoseinduktion, Zelltransformation, Beteiligung an der HCC-Entstehung, etc. (Schaefer, 2001; Bréchet et al., 2000; Murakami, 1999)). Dabei handelt es sich um das Protein X (HBx) des Hepatitis B Virus.



**Abb. 1.2: Genomorganisation des Hepatitis B Virus (Genotyp A).**

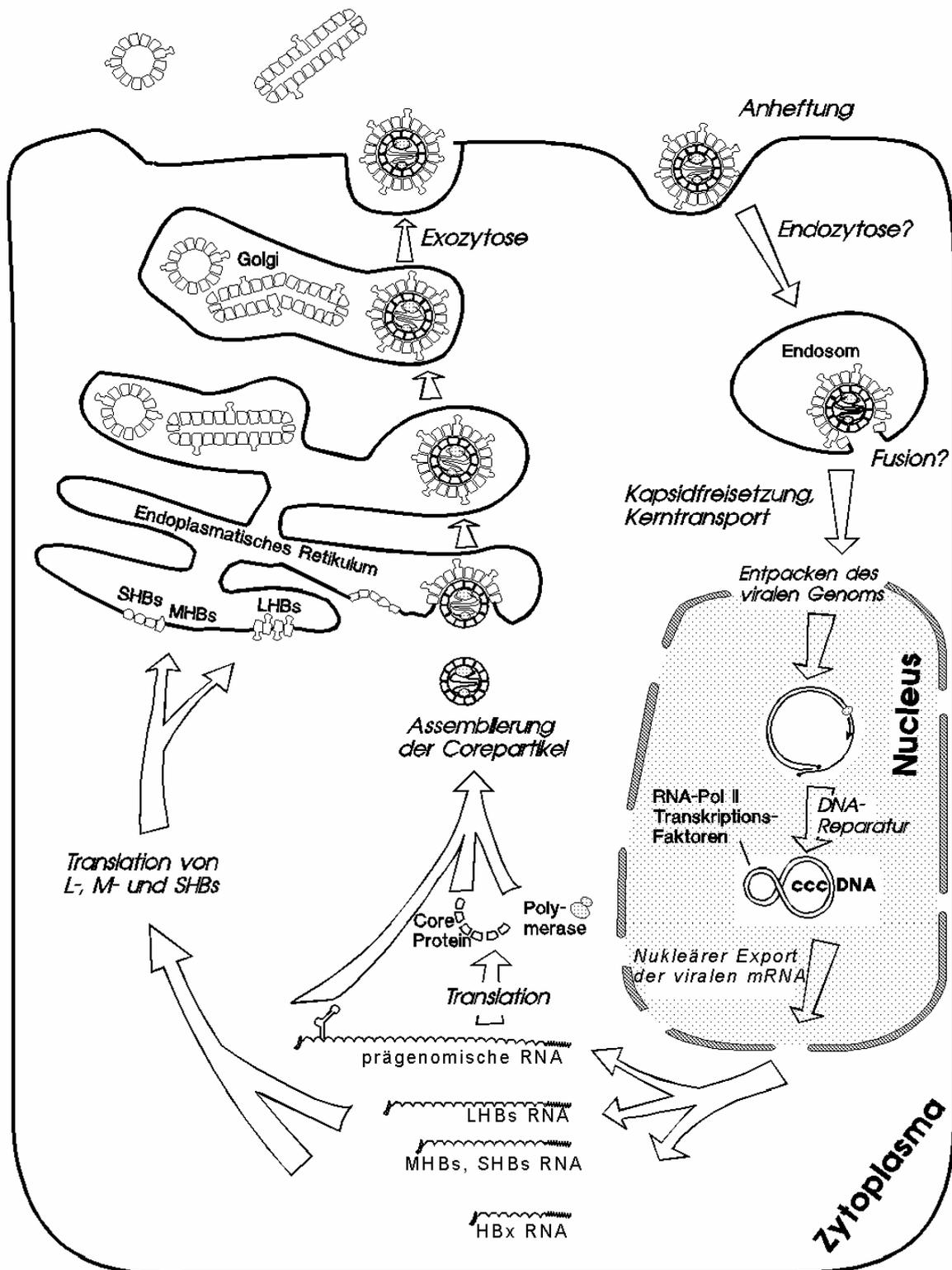
Im Zentrum ist die virale DNA mit dem (-) und dem (+) Strang sowie den Direct Repeats (DR1 und DR2) dargestellt. Daran schließen sich die vier ORF an, die durch die Pfeile repräsentiert werden. Außen sind die mRNAs der abgelesenen Gene eingetragen. Primerdomäne (Pri); reverse Transkriptase (RT); kleines, mittleres, großes Hepatitis B Surface-Protein (SHBsAg, MHBsAg, LHBsAg); PräS1 ist die Domäne, die LHBs (39 + 42 kD) zusätzlich gegenüber MHBs hat; PräS2 ist die Domäne, die MHBs (33 + 36 kD) zusätzlich gegenüber SHBs hat; X-Protein (X); Prä-Core-Protein (PräC); Surface-Protein (S).

Die virale DNA liegt in einer zirkulären Form vor, die durch das Überlappen von ca. 240 bp zwischen dem Plusstrang und dem Minusstrang nicht kovalent zusammengehalten wird (Sattler und Robinson, 1979). In einem Bereich von 9 Basen (terminale Redundanz) an den beiden Enden des Minusstranges kommt es sogar zu einer Dreisträngigkeit der Nukleinsäuren.

Am 5'-Ende des Minusstranges ist ein terminales Protein kovalent gebunden (Gerlich und Robinson, 1980). Am 5'-Ende des Plusstranges befinden sich 18 Ribonukleotide, die eine mRNA-ähnliche Cap-Struktur aufweisen (Seeger et al., 1986). Beide 5'-terminalen Enden übernehmen bei der DNA-Replikation eine Primerfunktion. Des Weiteren schließt das Genom zwei 11 Basen lange direkt wiederholte Sequenzen (direct repeats, DR1 und DR2) mit ein. Ihre Funktion besteht darin, den Plusstrangprimer optimal zu positionieren und die „Lücke“ des Minusstranges zu überbrücken (Seeger et al., 1986; Molnar-Kimber et al., 1984).

### 1.2.2 Replikation des Hepatitis B Virus

Der Mechanismus, wie das Virus aufgenommen wird, ob über einen Rezeptor oder einen speziellen Endozytosemechanismus, ist noch nicht geklärt. Nach der Aufnahme des Virus wird im Zytoplasma die Hülle des Virus entfernt und freie Core-Partikel gelangen zu den Kernporen des Zellkerns, an dem das Virus sein Kapsid „verliert“ und nur noch das HBV-Genom in den Nukleus vordringt (Kann et al. 1997). In vereinfachter Darstellung geschieht nun folgendes: Zuerst wird die nicht kovalent geschlossene zirkuläre DNA unter Beteiligung der viralen DNA-Polymerase, dem unvollständigen Plusstrang und zellulären Enzymen in kovalent geschlossene zirkuläre doppelsträngige DNA (cccDNA) überführt. Diese cccDNA dient als Matrize für die Transkription der viralen mRNAs. Die größte mRNA (3,5 kb) translatiert die virale Polymerase und das Core-Protein. Diese Proteine, zusammen mit der prägenomischen RNA, formen einen Komplex, den man als Prägenom im Zytoplasma finden kann. Danach wird die in diesem Komplex umhüllte virale RNA mit Hilfe der reversen Transkriptaseaktivität in einen kompletten Minusstrang überführt. Anschließend wird das Kapsid am endoplasmatischen Retikulum modifiziert und aus der Zelle sezerniert. Der dargestellte Prozess der HBV Replikation im Zellsystem wird in der folgenden Abbildung (Abb. 1.3) beschrieben:



**Abb. 1.3: Schematischer Verlauf des Replikationszyklus des HBV.**

Kleines, mittleres und großes Hepatitis B Surface-Protein (SHBs, MHBs und LHBs), kovalent geschlossene zirkuläre doppelsträngige DNA (covalently closed circular DNA, cccDNA).

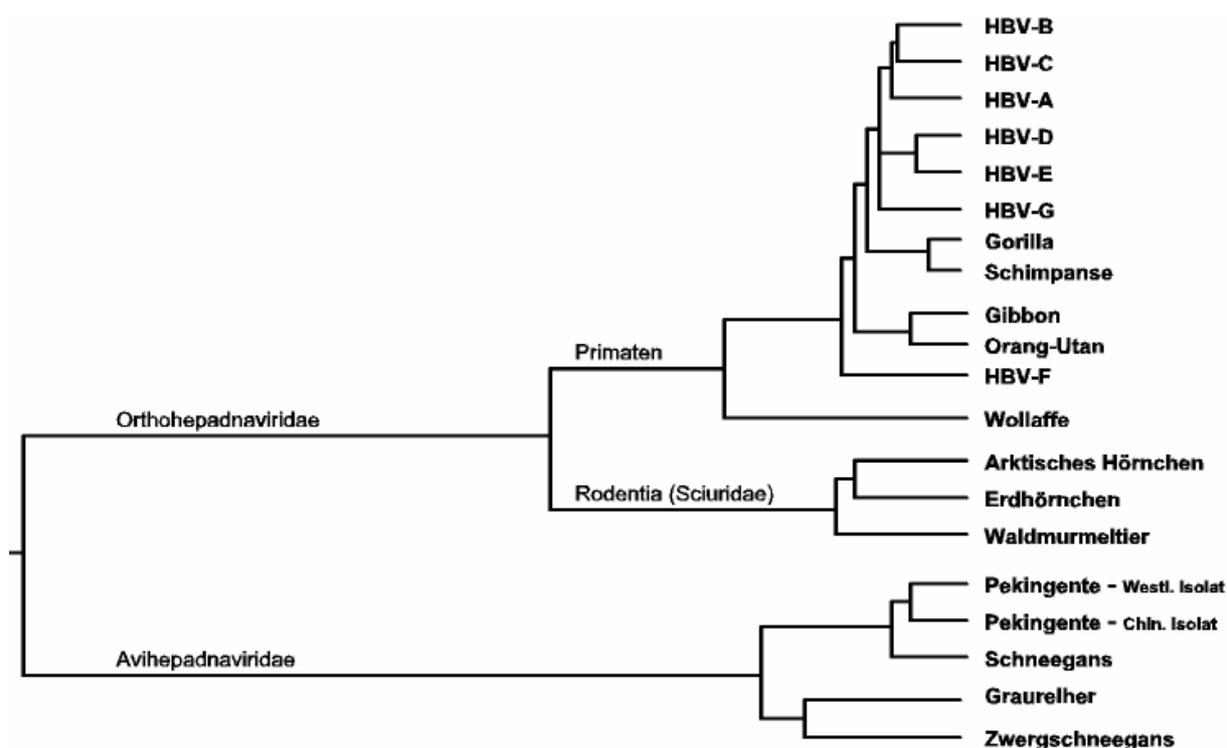
### 1.2.3 Virusfamilie und Verwandtschaftsbeziehung des Hepatitis B Virus

Das Hepatitis B Virus des Menschen ist Mitglied einer Virusfamilie, dessen best untersuchter Vertreter es ist. Durch das Virus wurde auch der Name der Hepadnaviridae geprägt. Einerseits beinhaltet der Familienname die Krankheit, die durch das Virus hervorgerufen wird: die Hepatitis. Andererseits charakterisiert der Familienname das Genom, welches aus teilweise doppelsträngiger DNA besteht. Man teilt die heute bekannten Hepadnaviren in zwei Genera ein. Zum einen in den Genus der Orthohepadnaviren, die Säugetiere befallen, und zum zweiten in den Genus der Avihepadnaviren, die Vögel infizieren. Einen Überblick über die bekannten Hepadnaviren und deren Wirte gibt die Tabelle 1.1 wieder.

**Tab. 1.1: Übersicht der bekannten Hepadnaviren und die zugehörigen Wirtstiere.**

<b>Orthohepadnavirus</b>	<b>Wirt</b>	<b>Literatur</b>
Hepatitis B Virus (HBV)	Mensch	(Dane, Cameron et al. 1970)
Arctic Squirrel Hepatitis Virus (ASHV)	Arktisches Ziesel	(Testut, Renard et al. 1996)
Chimpanzee Hepatitis B Virus (ChHBV)	Schimpanse	(Vaudin, Wolstenholme et al. 1988)
Gibbon Hepatitis B Virus (GiHBV)	Gibbon	(Norder, Ebert et al. 1996)
Gorilla Hepatitis B Virus (GoHBV)	Gorilla	(Grethe, Heckel et al. 2000)
Ground Squirrel Hepatitis Virus (GSHV)	Erdhörnchen	(Marion, Oshiro et al. 1980)
Orangutan Hepatitis B Virus (OuHBV)	Orang-Utan	(Warren, Heeney et al. 1999)
Woolly Monkey Hepatitis B Virus (WMHBV)	Wollaffe	(Lanford, Chavez et al. 1998)
Woodchuck Hepatitis Virus (WHV)	Waldmurmeltier	(Summers, Smolec et al. 1978)
<b>Avihepadnavirus</b>		
Duck Hepatitis B Virus (DHBV)	Pekingente	(Mason, Seal et al. 1980)
Grey Teal Hepatitis B Virus (GTHBV)	Weißkehlente	(Li et al., 1998)
Heron Hepatitis B Virus (HHBV)	Graureiher	(Sprengel, Kaleta et al. 1988)
Maned Duck Hepatitis B Virus (MDHBV)	Mähnenente	(Li et al., 1998)
Ross Goose Hepatitis Virus (RGHV)	Ross Gans	(Shi et al., 1993)
Snow Goose Hepatitis B Virus (SGHBV)	Schneegans	(Chang, Netter et al. 1999)
Stork Hepatitis B Virus (STHBV)	Weißstorch	(Pult et al., 1998)

Die Verwandtschaftsbeziehung der einzelnen Hepadnaviren, die aufgrund eines Vergleichs des gesamten viralen Genoms durchgeführt werden kann, ist in Abbildung 1.4 dargestellt. Aus der Abbildung geht die phylogenetische Beziehung des Woodchuck (Waldmurmeltier) Hepatitis Virus, dem Ground Squirrel (Erdhörnchen) Hepatitis Virus und des Arctic Squirrel (Arktisches Hörnchen) Hepatitis Virus zu den Sciuridae bzw. Rodentia hervor. Klar davon abzugrenzen und phylogenetisch näher zu den humanen Hepatitis B Viren einzuordnen, sind die Hepatitis B Viren des Gorilla, Schimpansen, Gibbon, Orang-Utan und Wollaffen.



**Abb. 1.4: Phylogenetische Verwandtschaftsbeziehung der Hepadnaviren im Vergleich ihrer Genome.**

Wie aus der Abbildung (Abb. 1.4) hervorgeht, kann man die humanen Hepatitis B Viren in sieben bislang bekannte Gruppen (A bis G) unterteilen. Die Genotypen des Hepatitis B Virus werden im folgenden Kapitel (Kap. 1.3) näher beschrieben.

Die untersuchten Genome der Hepadnaviren der nicht-humanen Primaten weisen eine hohe Ähnlichkeit zu HBV auf, deshalb kann man sie als Genotypen der Primaten-Hepadnaviren auffassen (Verschoor et al., 2001).

### 1.3 Genotypen des Hepatitis B Virus

Die Genotypisierung der Hepatitis B Viren geschieht durch die Analyse der DNA Sequenz des kompletten Genoms oder Teilbereichen des HBV-Genoms. Mit der erst kürzlichen Entdeckung des Genotyps G in der Gruppe der humanen Hepatitis B Viren (Stuyver et al., 2000), kann man sieben Genotypen A bis G unterscheiden. Dabei wurde festgelegt, daß ein Unterschied von mindestens 8% in einem Vergleich des kompletten HBV-Genoms vorliegen muss, um einen neuen Genotypen zu begründen (Magnius und Norder, 1995; Norder et al., 1992; Okamoto et al., 1988). Alternativ dazu steht auch ein Vergleich der Teilsequenz des HBV-Genoms (Hepatitis B Surface-Gensequenz) bereit, bei dem ein Unterschied von mehr als 4,1% vorliegen muss, um die Zugehörigkeit zu einem neuen Genotypen zu begründen.

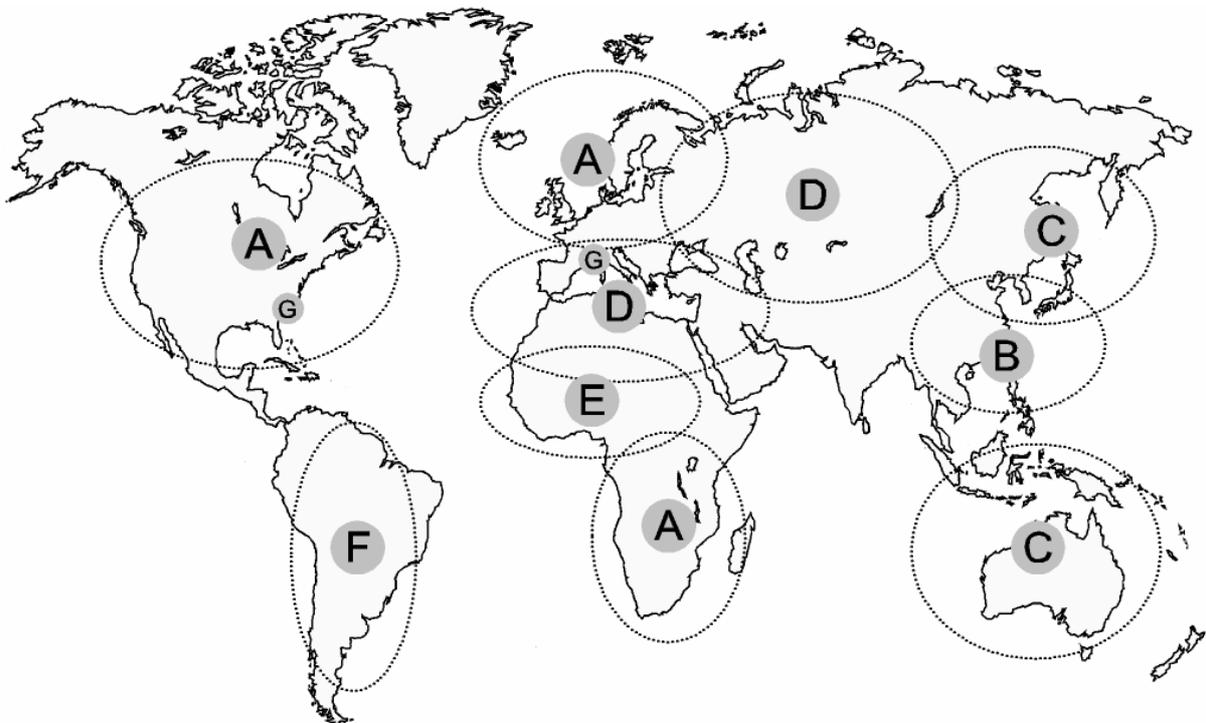
Neben der Einteilung in Genotypen, muss an dieser Stelle noch die Einteilung in verschiedene Subtypen des Hepatitis B Virus aufgrund ihrer Reaktivität mit unterschiedlichen Antiseren erwähnt und die Korrelation zwischen beiden beschrieben werden. Ursprünglich wurden subtyp-spezifische Antikörper gegen das Hepatitis B Surface-Protein (HBsAg) verwendet. Mit dieser Methode wurden neun verschiedene Subtypen unterschieden (Courouce-Pauty et al., 1983). Dabei wurden eine a Determinante (Vorkommen bei allen Subtypen), 2 Subdeterminanten (d oder y, und w oder r) sowie eine weitere Subdeterminante  $q^+$  und  $q^-$  identifiziert. Die resultierenden Subtypen sehen wie folgt aus: ayw1, ayw2, ayw3, ayw4, ayr, adw2, adw4, adr $q^+$  und adr $q^-$ . Die Tabelle 1.2 gibt einen Zusammenhang der Subtypen und der Genotypen wieder. Bis auf den Subtyp adw2 (Vorkommen in den Genotypen A, B und G), können die restlichen Subtypen den Genotypen zugeordnet werden.

**Tab. 1.2: Zuordnung zwischen den bekannten Sub- und Genotypen des Hepatitis B Virus.**

HBV-Genotyp	Genom (bp)	HBV-Subtyp
A	3221	adw2
B	3215	adw2
C	3215	adr und ayr
D	3182	ayw1, ayw2, ayw3
E	3212	ayw4
F	3215	adw4
G	3248	adw2

### 1.3.1 Weltweite Verbreitung der Hepatitis B Virus Genotypen

Die sieben Genotypen des Menschen weisen eine charakteristische geographische Verteilung auf (Andre, 2000; Magdzik, 2000; Stuyver et al., 2000; Tanaka, 2000; Lindh et al., 1999): Genotyp A ist pandemisch, zeigt aber vorwiegend eine weite Ausbreitung über Nordwest Europa, Nordamerika und Zentralamerika; Genotyp B findet sich vornehmlich in Indonesien, China und Vietnam; der Genotyp C wird in Ostasien, China, Japan, Korea, Polynesien und Vietnam gefunden; der Genotyp D ist wie auch der Genotyp A pandemisch mit einem relativ hohen Vorkommen in den mediterranen Ländern und dem Mittleren Osten; der Genotyp E findet sich in West- und Zentralafrika; der Genotyp F ist typisch für südamerikanische Ureinwohner und für Menschen in Polynesien; die Verteilung des Genotyps G ist, bis auf eine Untersuchung, die den Genotypen G mit Frankreich und den Vereinigten Staaten von Amerika in Zusammenhang bringt, noch weitgehend unbekannt (Stuyver et al., 2000). Die Abbildung 1.5 zeigt die Verbreitungsgebiete der Genotypen.



**Abb. 1.5: Weltweite Verteilung der bekannten Genotypen des Hepatitis B Virus.** Es sind die Genotypen A bis G und deren Ausbreitung dargestellt.

### 1.3.2 Pathogenität der Hepatitis B Virus Genotypen

Zur Zeit existiert nur eine geringe Anzahl an Studien, die sich mit dem Thema einer unterschiedlichen Pathogenität der HBV Genotypen befassen. So konnte in Arbeiten einer japanischen Arbeitsgruppe gezeigt werden, daß der Genotyp C des Hepatitis B Virus mit einer schwereren Entzündungssymptomatik und einer häufigeren Entwicklung eines Hepatozellulären Karzinoms einhergeht als der Genotyp B des Hepatitis B Virus (Kao et al., 2000a). Von der selben Arbeitsgruppe liegen auch Ergebnisse vor, die sich mit dem Einfluss einer  $\alpha$ -Interferon Therapie chronisch infizierter HBV-Patienten beschäftigt haben. Hierbei hat sich ein niedrigerer Therapieerfolg von Patienten mit dem Genotypen C im Vergleich mit Patienten, die den Genotypen B des Hepatitis B Virus hatten, eingestellt (Kao et al., 2000b).

Auch treten bei einer antiviralen Therapie mit Lamivudin mehr Resistenzen bei Patienten mit dem Genotypen A, als bei Patienten mit dem Genotypen D auf (Zöllner et al. 2001). Ein anderer Aspekt, der die Immunisierung von Patienten betrifft, beschreibt den unterschiedlichen Impferfolg bzw. das Auftreten von Impfausfällen in bestimmten „Genotypregionen“. So wurde z. B. in einem Verbreitungsgebiet mit dem höchsten Auftreten des HBV-Genotyps D von einer Impfung mit dem Genotyp A berichtet, bei der im Anschluss ein Impfausfall aufgetreten war (Carman et al., 1990).

### 1.4 Ziel der Arbeit

Es ist schon in früheren Arbeiten Anfang der 90er Jahre über die Genotypisierung des Hepatitis B Virus geschrieben und berichtet worden (Repp et al., 1993). Dabei war das Ziel eine einfache und schnelle Methode zu finden, mit der man in der Lage war, die damals bekannten Subtypen des Hepatitis B Virus spezifisch zu bestimmen. Mittlerweile haben sich die Informationen um das Hepatitis B Virus vermehrt, und aus den damals vier bekannten Genotypen sind bis zum heutigen Zeitpunkt sieben Genotypen geworden (Stuyver et al., 2000). Trotzdem oder gerade weil die Informationen über das Hepatitis B Virus stetig ansteigen, ist es notwendig, Methoden zu verbessern und den neuen Gegebenheiten anzupassen.

Aus diesem Grunde sollte in der vorliegenden Arbeit versucht werden, eine Methode zur Typisierung aller sieben Genotypen des Hepatitis B Virus zu etablieren.

## 2 Materialien

### 2.1 Primer

Alle Primer, die hier aufgeführt und nicht anders gekennzeichnet sind, wurden von der MWG-Biotech AG in Ebersberg, Deutschland, bezogen.

#### 2.1.1 Primer für die Polymerase Kettenreaktion

Folgende Primer wurden für die Multiplex-PCR verwendet:

HBV-GT1-A-s	5`-CGG AAA CTA CTG TTG TTA GAC GAC GGG AC-3` HBV 2331-2360 s; 29 Basen (T/A=14; G/C=15) $T_m=68,1^{\circ}\text{C}$ ; Anteil G/C 51,7%
HBV-GT1-A-as	5`-AAT TCC TTT GTC TAA GGG CAA ATA TTT AGT GTG GG-3` HBV 2701-2665 as; 35 Basen (T/A=22; G/C=13) $T_m=66,0^{\circ}\text{C}$ ; Anteil G/C 37,1%
HBV-GT1-B-s	5`-CCG CTT GGG GCT CTA CCG CCC G-3` HBV 1470-1491 s; 22 Basen (T/A=5; G/C=17) $T_m=71,4^{\circ}\text{C}$ ; Anteil G/C 77,3%
HBV-GT1-B-as	5`-CTC TTA TGC AAG ACC TTG GGC AGG TTC C-3` HBV 1660-1633 as; 28 Basen (T/A=13; G/C=15) $T_m=68,0^{\circ}\text{C}$ ; Anteil G/C 53,6%
HBV-GT1-C-s	5`-CCT GAA CAT GCA GTT AAT CAT TAC TTC AAA ACT AGG-3` HBV 2706-2741 s; 36 Basen (T/A=23; G/C=13) $T_m=66,1^{\circ}\text{C}$ ; Anteil G/C 36,1 %
HBV-GT1-C-as	5`-AGC AGG GGT CCT AGG AAT CCT GAT GTT G-3` HBV 192-165 as; 28 Basen (T/A=13; G/C=15) $T_m=68,0^{\circ}\text{C}$ ; Anteil G/C 53,6%

HBV-GT1-D-s	5`-ACA GCA TGG GGC AGA ATC TTT CCA CCA G-3` HBV 2843-2870 s; 28 Basen (T/A=13; G/C=15) $T_m=68,0^{\circ}\text{C}$ ; Anteil G/C 53,6%
HBV-GT1-D-as	5`-CCT ACC TTG TTG GCG TCT GGC CAG G-3` HBV 2990-2966 as; 25 Basen (T/A=9; G/C=16) $T_m=69,5^{\circ}\text{C}$ ; Anteil G/C 64%
HBV-GT1-E-s	5`-CTA ATG ACT CTA GCT ACC TGG GTG GGT GTA-3` HBV 2093-2122 s; 30 Basen (T/A=15; G/C=15) $T_m=68,1^{\circ}\text{C}$ ; Anteil G/C 50%
HBV-GT1-E/G-as	5`-CCA TTC GAG AGG GAC CGT CCA AGA AAG C-3` HBV 2880-2853 as; 28 Basen (T/A=12; G/C=16) $T_m=69,5^{\circ}\text{C}$ ; Anteil G/C 57,1%
HBV-GT1-F-s	5`-ACA GCA TGG GAG CAC CTC TCT CAA CGA CA-3` HBV 2843-2871 s; 29 Basen (T/A=13; G/C=16) $T_m=69,5^{\circ}\text{C}$ ; Anteil G/C 55,2%
HBV-GT1-F-as	5`-AGA GGC AAT AGT CGG AGC AGG GTT CTG-3` HBV 109-83 as; 27 Basen (T/A=12; G/C=15) $T_m=68,0^{\circ}\text{C}$ ; Anteil G/C 55,6%
HBV-GT1-G-s	5`-GGC TTT AGG GCA TGG ATA GAA CAA CTT TGC C-3` HBV 1890-1920; 31 Basen (T/A=16; G/C=15) $T_m=68,2^{\circ}\text{C}$ ; Anteil G/C 48,4%
HBV-GT1-E/G-as	5`-CCA TTC GAG AGG GAC CGT CCA AGA AAG C-3` HBV 2880-2853 as; 28 Basen (T/A=12; G/C=16) $T_m=69,5^{\circ}\text{C}$ ; Anteil G/C 57,1%

Die folgenden Primer wurden bereits von Dr. R. Repp (Repp et al., 1993) benutzt und hier weiterentwickelt, indem ein zusätzlicher Primer (P9 – spezifisch für den Genotypen B) hinzugefügt wurde.

repp-p1	5`-GGG TCA CCA TAT TCT TGG GAA CAA GA-3` HBV 2820-2845 s; 26 Basen (T/A=14; G/C=12) $T_m=63,2^{\circ}\text{C}$ ; Anteil G/C 46,2%
repp-p2	5`-GCA GGG GTC CTA GGA ATC CTG ATG-3` HBV 191-168 as; 24 Basen (T/A=10; G/C=14)

	$T_m=66,1^\circ\text{C}$ ; Anteil G/C 58,3%
repp-p3	5`-TGG GGC AGA ATC TTT CCA CCA GCA-3` HBV 2888-2911 s; 24 Basen (T/A=11; G/C= 13) $T_m=64,4^\circ\text{C}$ ; Anteil G/C 54,2%
repp-p4	5`-TTC AGC GCA GGG TCC CCA ATC CTC G-3` HBV 153-129 as; 25 Basen (T/A=9; G/C=16) $T_m=69,5^\circ\text{C}$ ; Anteil G/C 64%
repp-p5	5`-TCA AGG ACC ACT GGC CAG CAG CCA-3` HBV 2996-3019 s; 24 Basen (T/A=9; G/C=15) $T_m=68^\circ\text{C}$ ; Anteil G/C 65%
repp-p6	5`-AGA TGT GAG AGG CAA TAT TCG GAG-3` HBV 116-93 as;24 Basen (T/A=13; G/C=11) $T_m=61,0^\circ\text{C}$ ; Anteil G/C 45,8%
repp-p7	5`-AGG TTG GTC TTC CAA ACC TCG ACA-3` HBV 2859-2882 s; 24 Basen (T/A=12; G/C=12) $T_m=62,7^\circ\text{C}$ ; Anteil G/C 50%
repp-p8	5`-TAG GCC CCT CAC TCT GGG ATC TAG-3` HBV 49-26 as; 24 Basen (T/A=10; G/C=14) $T_m=66,1^\circ\text{C}$ ; Anteil G/C 58,3%
Genotyp-B-P9	5`-TTC ACC CCT CCC CAT GGG GGA CTG-3` HBV 3073-3096 s; 24 Basen (T/A=8; G/C=16) $T_m=69,6^\circ\text{C}$ ; Anteil G/C 66,7%

### 2.1.2 Primer für den LightCycler™

Die Primer für die Arbeiten mit dem LightCycler™ wurden von der Firma TIB MOLBIOL, Berlin, bezogen. Es handelt sich dabei um die folgenden zwei Primer:

HBV, X2s	5`-gAC gTC CTT TgT YTA CgT CCC gTC-3` HBV 1413-1436; 24 Basen (T/A=10, G/C=13) $T_m=75^\circ\text{C}$ ; Anteil G/C 54,2%
HBV, X2as	5`-TgC AgA ggT gAA gCg AAg TgC ACA-3` HBV 1601-1578); 24 Basen (T/A=11; G/C=13) $T_m=74^\circ\text{C}$ ; Anteil G/C 54,1%

### 2.1.3 Hybridisierungssonden

Für die Arbeiten mit dem LightCycler™, Boehringer-Mannheim, wurden folgende fluoreszenz-markierten Sonden der Firma TIB MOLBIOL, Berlin, verwendet:

HBV, 3FL-X Hybprobe 25-mer (1519-1543)

5`-ACg ggg CgC ACC TCT CTT TAC gCg g X-3`

25 Basen (T/A=8, G/C=17)

T<sub>m</sub>=84°C; Anteil G/C 68%

HBV, 5LC-X Hybprobe 26-mer (1545-1570)

5`-LC Red640-CTC CCC gTC TgT gCC TTC TCA TCT gC p-3`

26 Basen (T/A=10, G/C=16)

T<sub>m</sub>=84°C; Anteil G/C 61,5%

Dabei steht das "X" für den modifizierte Rest (Fluorescein) und bei LCRed 640nm handelt es sich um das LightCycler™Red, die zusammen durch einen Fluoreszenz-Resonanz-Elektronentransfer ein spezifisches Signal hervorrufen.

## 2.2 Plasmide

### 2.2.1 pBlue 991 E-Dimer T7

Dieses Plasmid wurde von Dr. R. Schuster, Institut für Medizinische Virologie, Gießen, zur Verfügung gestellt (Schuster et al., 2000).

Es handelt sich bei pBlue 991 E-Dimer T7 um ein Tandem Dimer des kompletten HBV-Genoms, Genotyp A (Gen Bank: X 51970), der keine anderen eukaryontischen Promoter / Enhancer außer denen des HBV hat.

### 2.2.2 pHTD

Bei diesem Plasmid handelt es sich um ein dimerisiertes HBV-Genom des Genotyps B (GenBank: X 98077; im Plasmid pGem7; (Pult et al., 1997)).

Zur Verfügung gestellt wurde dieses Plasmid von Dr. I. Pult, University of New Mexico, Albuquerque, USA.

### **2.2.3 Plasmid D1Dimer**

Dieses Plasmid (Größe ca. 9kb) stellt ein HBV Referenzgenom für den Genotyp C dar. Es handelt sich um ein Dimer einer serologisch stummen Hepatitis. (GenBank: D16666; HBV-Isolat; (Uchida et al., 1995)).

Dieses Plasmid wurde von Dr. Uchida, Tokio, Japan, zur Verfügung gestellt.

### **2.2.4 pSM2**

Das Plasmid pSM2 beinhaltet einen Dimer des Genotyps D, Subtyp ayw, welcher über die EcoRI Restriktionsschnittstellen in das Plasmid pMa5-8 eingebaut wurde (Günther et al., 1995; Galibert et al., 1979).

Hierbei handelte es sich um eine freundliche Gabe von Prof. Dr. H. Will, Heinrich-Pette-Institut, Hamburg.

### **2.2.5 GS-A135**

Das HBV-Genom (GS-A135) wurde mit 20 Zyklen und dem Taq/Pwo-Mix (HighFidelity-Polymerase, Roche) aus dem Serum eines chronischen Trägers amplifiziert. Bei der Amplifikation wurden HBV-Primer verwendet, die am 5`-Ende eine heterologe Sequenz mit Restriktionsschnittstellen enthalten. Die Amplifikationsprodukte wurden über SstI-Schnittstellen in pUC 19 kloniert. Zur Transfektion kann das HBV-Insert über SapI aus dem Vektor geschnitten und das Restriktionsprodukt direkt transfiziert werden.

Bei einer Überprüfung mit bekannten Genotyp-Sequenzen zeigte das komplette Genom GS-A135 die höchste Homologie mit dem Genotyp E (S. Schaefer, persönliche Mitteilung).

Zur Verfügung gestellt wurde dieses Plasmid von Dr. G. Sommer, Abteilung Prof. Dr. H. Will, Heinrich-Pette-Institut, Hamburg.

### **2.2.6 pBSadw4**

Das komplette Genom eines chronischen HBV-Trägers mit bekanntem Serotyp adw4 wurde durch Ganzgenom PCR amplifiziert und über die Schnittstellen HindIII und KpnI in pBluescript II SK+ kloniert. Die Sequenzierung ergab das erste Gesamt HBV-Genom des Genotyps F (GenBank: X 69798; (Naumann et al., 1993)).

## **2.3 Humane Seren**

Die humanen Seren, die in dieser Arbeit verwendet wurden, wurden aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt. Dabei wurde besonderes Augenmerk auf das sorgfältige und saubere Arbeiten mit den Seren gelegt, da man eine potentielle Gefahr einer Infektion mit anderen Krankheitserregern nicht sicher ausschließen konnte.

Der Genotype der Seren wurde durch Sequenzierung von abschnitten des SHBs bestimmt (S. Schaefer, persönliche Mitteilung)

### **2.3.1 ID 221**

Bei dieser Probe handelt es sich um einen Patienten mit der Identifikationsnummer ID 221, welcher an einer HBV-Infektion erkrankt ist. Bei dem zugrunde liegenden Hepatitis Virus handelt es sich um den Genotypen A.

### **2.3.2 ID 123**

Das Serum dieses Patienten zeigt eine Infektion mit dem Genotypen D des Hepatitis B Virus.

### **2.3.3 HBV-C-Serum**

Hierbei handelt es sich um Serum eines Patienten, der aus dem asiatischen Raum stammte und eine chronische Hepatitis mit dem Hepatitis B Virus des Genotyps C zeigt.

### **2.3.4 Eurohep-Standard 2**

Dieses Serum wurde einem Patienten entnommen, der die D-genotypischen Eigenschaften des Hepatitis B Virus (Eurohep-Standard 2) zeigte (Heermann et al., 1999).

### **2.3.5 HBV-Referenzserum für den LightCycler™**

Das Referenzserum ID 123 mit  $6,25 \times 10^6$  GE/ml beinhaltet den HBV Genotypen D, welcher an einem internationalen Referenzpräparat geeicht wurde. Dieses internationale Referenzpräparat "Eurohep I" besitzt  $10^9$  Eurohep-Einheiten. Dies entspricht  $2,5 \times 10^9$  HBV-DNA-Molekülen pro ml. Nach einer Verdünnung von 1:500 wurden die Proben (0,5 ml) gefriergetrocknet und als WHO-Standard mit  $10^6$  willkürlichen WHO-Einheiten pro ml von der SoGAT-Gruppe am NIBSC verabschiedet (Robertson, 1998). 5 HBV-DNA-Moleküle entsprechen somit einer "neuen" WHO-Einheit (oder 2 "alten" Eurohep-Einheiten).

## **2.4 DNA-Längenstandards**

Der pUC Mix Marker, Nr. 8, der Firma MBI Fermentas, Litauen, zeigt in der Agarose-Gelelektrophorese Banden in den folgenden DNA-Fragmentgrößen 1116, 883, 692, 501, 489, 404, 331, 242, 190, 147, 111, 110, 67, 34, 26 und 19 Basenpaaren.

Der 1 kb DNS Leiter Marker von Gibco BRL® zeigt Banden mit den folgenden Größen in kb: 12,2; 11,1; 10,1; 9,1; 8,1; 7,1; 6,1; 5,0; 4,0; 3,0; 2,0; 1,6; 1,0; 0,5; 0,3; 0,2.

## **2.5 Chemikalien**

Die für diese Arbeit verwendeten Chemikalien wurden nur in höchstem Reinheitsgrad (p.A.) verwendet. Wasser, wenn nicht im Besonderen mitgeliefert, wurde der

Reinstwasseranlage des Instituts für Medizinische Virologie, Gießen, entnommen bzw. von den Mitarbeitern des Instituts zur Verfügung gestellt.

dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Amersham, Braunschweig
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Ethanol	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Ladepuffer (6x)	MBI Fermentas, Litauen
MetaPhor <sup>®</sup> Agarose	FMC, Biozym, Hess. Oldendorf
Mineralöl	Sigma, Deisenhofen
NuSieve <sup>®</sup> 3:1 Agarose	FMC, Biozym, Hess. Oldendorf
pUC Mix Marker Nr. 8	MBI Fermentas, Litauen
Tris	Serva, Heidelberg

## 2.6 Verbrauchsmaterialien

Sammelröhrchen	Qiagen, Hilden
Einweg-Handschuhe	Ansell, München
Gefäße 50 ml, 100 ml	Schott, Deutschland
Glasflaschen 500 ml	Schott, Deutschland
LightCycler <sup>™</sup> Capillaries	Roche, Boehringer-Mannheim, Mannheim
Pipettenspitzen, gestopft	FMC, Biozym, Hess. Oldendorf
Reaktionsgefäße, 50 µl - 1500 µl	Eppendorf, Hamburg
Zentrifugensäulen	Qiagen, Hilden
Tücher (brozell)	Brod, Hanau

## 2.7 Geräte

DNA Thermal Cycler	Perkin-Elmer Cetus, Überlingen
DU <sup>®</sup> -70 Spectrophotometer	Beckman, Deutschland
Gelkamera CSI, Thermodrucker	Cybertec, Berlin
GeneAmp PCR System 9600	Perkin-Elmer Cetus, Überlingen
Hybaid OmniGene	MWG-Biotech AG, Ebersberg

LightCycler™	Roche, Boehringer-Mannheim, Mannheim
Mikrowelle (spaceCUBE50, M734)	Philips, Deutschland
pH-Meter (Modell CG840)	Schott, Deutschland
PicoFuge™	Stratagene, UK
Reinstwasseranlage	Millipore, Eschborn
Spannungsgerät	Hofer, San Francisco
Tischwaage (Modell 1413)	Sartorius AG, Deutschland
Tischzentrifuge (Modell 5417C)	Eppendorf, Hamburg
UV-Transilluminator	Cybertec, Berlin
Vortexer	Janke & Kunkel, Staufen i. Br.
Zentrifuge CR 422	Jouan, Unterhaching

## 2.8 Puffer und Lösungen

### 2.8.1 Lösung zur Agarose-Gelelektrophorese

TAE Puffer:	Tris	242 g
(50x Stammlösung)	Eisessig	57,1 ml
	EDTA (0,5 molar)	100 ml (pH 8,0)
	H <sub>2</sub> O	ad 1 l
EDTA 0,5 molar	EDTA	186,12 g
	H <sub>2</sub> O	ad 1 l (pH 8,0)
Ethidiumbromid	10 mg/ml	

### 2.8.2 Puffer zur Aufreinigung von viraler DNA und RNA

AVL Puffer (incl. Carrier RNA)	Qiagen, Hilden
AW1 Puffer	Qiagen, Hilden
AW2 Puffer	Qiagen, Hilden
AVE Puffer	Qiagen, Hilden

### 2.8.3 Puffer zur Plasmid-Maxipräparation

P1-Puffer (Resuspensionspuffer)	Qiagen, Hilden
P2-Puffer (Lysispuffer)	Qiagen, Hilden
P3-Puffer (Kaliumacetatlösung)	Qiagen, Hilden
QBT-Puffer (Äquilibrierungspuffer)	Qiagen, Hilden
QC-Puffer (Waschpuffer)	Qiagen, Hilden
QF-Puffer (Elutionspuffer)	Qiagen, Hilden

## 3 Methoden

Bei den Arbeiten mit PCR ist es besonders wichtig sorgfältig und kontaminationsfrei zu arbeiten. Es wurde deshalb (i) in einem templatefreien Raum des Instituts für Medizinische Virologie, Gießen, gearbeitet, (ii) darauf geachtet ausschließlich mit nur dafür bereitstehenden templatefreien Pipetten umzugehen und (iii) nur sterile gestopfte Pipettenspitzen, sterile Gerätschaften, etc. zu benutzen.

Im Folgenden werden die Methoden, die zur Genotypisierung eingesetzt wurden, vorgestellt:

### 3.1 Konventionelle PCR

Die konventionelle PCR (Polymerase Chain Reaction) ist eine einfache Methode zur Amplifikation von DNA-Fragmenten (Mullis und Faloona, 1987). Die Ausgangs-DNA (Template) wird in einem ersten Schritt bei Temperaturen von 92 °C bis 95 °C denaturiert, in einem zweiten Schritt erfolgt die Anlagerung zweier spezifischer Primer (Sense und Antisense), zwischen denen sich die zu amplifizierende Sequenz befindet, an die nun einzelsträngige DNA. In einem dritten Schritt werden dann die angelagerten Primer durch eine thermostabile DNA-Polymerase von *Thermus aquaticus* (Taq) bei 72 °C verlängert. In den weiteren Reaktionszyklen wird diese Abfolge beibehalten und da dabei immer die zuvor synthetisierten DNA-Stränge zusätzlich als Matrizen dienen, erfolgt eine exponentielle Vermehrung der ausgewählten DNA-Sequenz.

### 3.2 Hot Start PCR

Für die Spezifität der Amplifikation ist die für das Annealing der Primer gewählte Temperatur von außerordentlicher Bedeutung. Beim Mischen des Reaktionsansatzes kann die thermostabile Polymerase bereits bei Raumtemperatur kleinere Fragmente polymerisieren. Da bei diesen niedrigen Temperaturen das Annealing relativ unspezifisch erfolgt, sind die entstehenden Fragmente in der Regel auch

unspezifisch. Um dieses zu verhindern, wurde in der Multiplex-PCR (Kap. 3.3) mit einer Hot Start PCR gearbeitet. Hierzu wurde eine thermostabile Polymerase (Taq) verwendet, die erst durch Erhitzen bei Temperaturen zwischen 93 °C und 96 °C für 10 bis 20 Min. aktiviert wird.

In einem 50 µl Reaktionsansatz für die Hot Start PCR waren folgende Bestandteile enthalten:

25 µl	HotStarTaq™ Master Mix, Qiagen, Hilden
1 µl	je sense-Primer (10 µmol/l), MWG-Biotech AG, Ebersberg
1 µl	je antisense-Primer (10 µmol/l), MWG-Biotech AG, Ebersberg
5 µl	Template
ad 50 µl	H <sub>2</sub> O

Für das Arbeiten mit größeren Mengen und Proben wurde ein "Master"-Mix angefertigt und auf die einzelnen Proben verteilt. Als Negativkontrolle wurden Proben eingesetzt, die statt einer zu untersuchenden Probe nur gereinigtes Wasser enthielten. Anschließend wurde das Gerät von Perkin-Elmer (GeneAmp PCR System 9600) folgendermaßen programmiert (s.u.) und gestartet:

15 Min.	95 °C (Enzymaktivierung)
1 Min.	94 °C (Denaturierung)
2 Min.	60 °C (Anlagerung (= Annealing))
2 Min.	72 °C (Verlängerung (= Elongation))
40 x	Zyklen

Nach Beendigung der Hot Start PCR wurden 15 µl des entstandenen Produktes in einer Agarose-Gelelektrophorese eingesetzt und ausgewertet.

### 3.3 Multiplex-PCR zur Typisierung von HBV

Mit dieser Methode wurde zum ersten Mal eine Multiplex-PCR beschrieben, die eine Typisierung aufgrund von stabilen, für die damals bekannten HBV-Subtypen,

spezifischen Sequenzen ermöglichte (Repp et al., 1993). Prinzipiell ließen sich mit diesem Multiplex-PCR Protokoll vier verschiedene HBV-Subtypen unterscheiden.

Damit in der Multiplex-PCR äquivalente Mengen als Template eingesetzt werden, wurde in einer ersten PCR mit universellen Primern ein HBV-Amplifikat erstellt. Dieses wurde in einer zweiten Runde als Template eingesetzt und die sieben für die Multiplex-PCR benötigten Primerpaare verwendet.

In einem 50 µl Reaktionsansatz für die 1. Runde der Multiplex-PCR waren enthalten:

5 µl	Standard Reaction Buffer mit Mg <sup>++</sup> , PAN™ Biotech GmbH, Aidenbach
1 µl	sense-Primer, repp-p1 (4 pmol/µl), MWG-Biotech AG, Ebersberg
1 µl	antisense-Primer, repp-p2 (4 pmol/µl), MWG-Biotech AG, Ebersberg
1 µl	dNTP-Mix (0,1 µmol/l), Amersham, Braunschweig
0,5 µl	PanScript DNA Polymerase (5 U/µl), PAN™ Biotech GmbH, Aidenbach
5 µl	Template
ad 50 µl	H <sub>2</sub> O

Nach Überschichten des Reaktionsansatzes mit 1 bis 2 Tropfen Mineralöl, Sigma, Deisenhofen, wurde der 1. Teil der PCR mit folgendem Programm und 35 Zyklen gestartet:

5 Min.	94 °C
1 Min.	94 °C (Denaturierung)
2 Min.	60 °C (Annealing)
2 Min.	74 °C (Elongation)

Nach Beendigung des ersten Teiles der Multiplex-PCR, wurde der zweite Teil begonnen. Auch hierfür wurde ein 50 µl Reaktionsansatz benötigt. Dieser wurde folgendermaßen zusammengemischt:

5 µl	Standard Reaction Buffer (Mg <sup>2+</sup> ), PAN™ Biotech GmbH, Aidenb.
2 µl	sense-Primer, repp-p1, repp-p3, repp-p5, repp-p7, (10 pmol/µl),

	MWG-Biotech AG, Ebersberg
2 µl	antisense-Primer, repp-p4, repp-p6, repp-p8, (10 pmol/µl), MWG-Biotech AG, Ebersberg
1 µl	dNTP-Mix (0,1 µmol/l), Amersham, Braunschweig
0,5 µl	PanScript DNA Polymerase (5 U/µl), PanBiotech GmbH, Aidenb.
5 µl	Amplifikat der 1. Multiplex-PCR
ad 50 µl	H <sub>2</sub> O

Nach Überschichten mit Mineralöl, Sigma, Deisenhofen, wurde der zweite Teil der Multiplex-PCR mit dem unten aufgeführten Programm begonnen. Für beide Teile der PCR ist es möglich, einen "Master"-Mix anzufertigen und diesen dann auf die einzelnen Proben zu verteilen, auch wurden beide Runden der hier beschriebenen PCR auf dem Gerät Hybaid OmniGene von der MWG-Biotech AG, Ebersberg, durchgeführt.

5 Min.	94 °C
1 Min.	94 °C (Denaturierung)
2 Min.	68 °C (Annealing)
2 Min.	74 °C (Elongation)
25 x Zyklen	

Nach der zweiten Runde wurden 15 µl des Multiplex-PCR Produktes in einer Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt.

### **3.4 Quantifizierung der Genomäquivalente mit dem LightCycler™**

Mit dem LightCycler™, Roche, Boehringer-Mannheim, Mannheim, ist es möglich, eine quantitative PCR in Echtzeit ("Real-Time-PCR") durchzuführen (Brechtbuehl et al., 2001). Das LightCycler™ System ist besonders für kleine und mittlere Probenzahlen geeignet, wobei auch die Schnelligkeit des Verfahrens innerhalb von 60 Min. vorteilhaft ist (Wittwer und Garling, 1991). Einen gewissen aber dennoch bestehenden Nachteil stellt das geringe einsetzbare Probenvolumen dar, welches zwischen 5 µl und 10 µl liegt und die analytische Empfindlichkeit begrenzt.

Das Prinzip, das dem LightCycler™ zu Grunde liegt, ist eine fluoreszenz-photometrische Auswertung der entstandenen Produkte der PCR. Hierbei werden dem PCR-Ansatz zusätzlich zwei Hybridisierungssonden, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert sind, in die Reaktionskapillaren hinzugegeben. Anschließend lagern sie sich nach jedem Zyklus an das Amplifikat an und können entsprechend dem Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer vom Fluorescein zum LightCycler™ Red640 durch Photozellen in dem Photometer des LightCycler™ gemessen werden. Die Höhe des Energietransfers und somit die Intensität der roten Fluoreszenz ist proportional der Amplifikatmenge.

Bei einer hohen Probenzahl ist es ratsam, sich einen "Master"-Mix für die gesamten Proben herzustellen und diesen anschließend auf die einzelnen Reaktionskapillaren wieder aufzuteilen. Als Negativkontrolle wurde steriles H<sub>2</sub>O, als Primer wurden die Primer HBV, X2s und HBV, X2as und für die Quantifizierung der HBV-DNA der Proben wurde das HBV-Referenzserum ID 123 verwendet. Dieses Referenzserum wurde in mehreren Verdünnungsstufen (bis 10<sup>-5</sup>) eingesetzt und mitgeführt.

Das typische Arbeitsprotokoll für einen 20 µl Ansatz sah wie folgt aus:

2,6 µl	H <sub>2</sub> O
2,4 µl	MgCl <sub>2</sub> (4 mmol/l)
1 µl	sense-Primer (10 pmol/µl)
1 µl	antisense-Primer (10 pmol/µl)
0,5 µl	Hybridisierungssonde, HBV, 3FL-X (8 pmol/µl)
0,5 µl	Hybridisierungssonde, HBV, 5LC-X (8 pmol/µl)
2 µl	FastStart Taq

Nachdem dieser 10 µl Ansatz in je eine LightCycler™ Glaskapillare hinzugegeben wurde, wurden die Proben bzw. die Standards ebenfalls in die Glaskapillaren pipettiert und verschlossen. Nach einer kurzen Zentrifugation von 5 s bei 3000 Upm, wurden die Glaskapillaren vorsichtig in das Karussell des LightCyclers™ gesteckt.

Die Arbeiten erfolgten ausschließlich auf Eis oder in vorher dafür vorgekühlten Metallblöcken. Das Programm mit dem der LightCycler™ versehen wurde, enthielt folgende Parameter:

Aktivierungsschritt 1 Zyklus; Inkubation bei 95 °C für 10 Min.; FastStart-

	Enzym wird aktiviert.
3-Schritt-Zyklus (Amplifikation)	45 Zyklen bestehend aus: Denaturierung; Inkubation bei 95 °C für 10 s Annealing; Inkubation für 15 s bei 64 °C-50 °C in 1 °C Schritten ("Touch-Down-PCR") Elongation; Inkubation bei 72 °C für 13 s
Schmelzkurve	1 Zyklus; Inkubation bei 95 °C für 10 s, bei 52 °C für 15 s und in 0,1 °C Schritten bis 95 °C
Kühlung	1 Zyklus; Inkubation bei 40 °C für 30 s

Nach Ermittlung der Genomäquivalente konnten entsprechende Mengen in der Hot Start PCR (Kap. 3.2) eingesetzt werden, um deren Empfindlichkeit bzw. Nachweisgrenze zu ermitteln.

### 3.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der DNA-Fragmente fand in 2%-igen bis 3%-igen (w/v) Agarosegelen statt. Dazu wurde die Agarose in 20 bis 50 ml 1 x TAE in der Mikrowelle, Philips, Deutschland, kurz auf eine Schmelztemperatur von über 75 °C (MetaPhor<sup>®</sup>) bzw. über 90 °C (NuSieve<sup>®</sup> 3:1) aufgekocht, nach kurzem Abkühlen wurden 1 bis 3 µl Ethidiumbromidlösung [10 mg/ml] pro Gel hinzugegeben und auf einen rechteckigen Gelschlitten einer horizontalen Elektrophoresekammer gegossen. Die Agarosegele sollten anschließend nach Erstarren noch für ca. 20 Min. bei 4 °C ruhen, um optimale Auftrennungseigenschaften zu erzielen. Die für MetaPhor<sup>®</sup> Agarose angegebenen Trenngrößen für DNA-Fragmente liegen bei einem 3%-igen Gel zwischen 20 und 800 bp Länge; bei NuSieve<sup>®</sup> 3:1 Agarose hingegen bei einem 4%-igen Gel bei  $\leq 1000$  bp Länge.

Die Proben wurden mit 1/6 Volumen 6 x Ladepuffer versetzt, in die durch einen Teflonkamm ausgesparten Taschen aufgetragen und bei 60 bis 90 Volt in 1 x TAE Puffer aufgetrennt, der nach max. 10 Läufen erneuert wurde. Für die Größenbestimmung der DNA-Fragmente wurde zusätzlich ein DNA-Längenstandard mit aufgetragen.

Zur Auswertung der Agarosegele wurden die Gele auf einen Transilluminator gelegt und mit UV-Licht (302 nm) bestrahlt. Aufgrund der fluoreszierenden Eigenschaften des in der DNA interkalierenden Ethidiumbromids konnten so die dargestellten DNA-Banden sichtbar gemacht werden. Zur Dokumentation der dargestellten Banden wurde der angeschlossene Thermodrucker benutzt. Für die Arbeit wurden die Bilder weiter verarbeitet, indem sie mit einem Scanner eingelesen und mit einem Graphikprogramm beschriftet wurden.

### **3.6 Gewinnung von viraler DNA**

Die Aufreinigung der Serumproben wurde mit Hilfe des QIAamp<sup>®</sup> Viral RNA Mini Kit der Firma Qiagen, Hilden, durchgeführt. Das Verfahren ist sowohl für die Aufreinigung von RNA, als auch DNA aus Serumproben, geeignet. Das typische Arbeitsprotokoll beschreibt folgendes Vorgehen:

In dem ersten Schritt wird einem Volumen von 560 µl Puffer AVL (incl. Carrier RNA) 140 µl der Serumprobe hinzugefügt, für ca. 15 s auf einem Vortex gemischt und anschließend für 10 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Es handelt sich hierbei um eine Lyse der viralen Bestandteile, um die DNA freizusetzen. Nach der Inkubation wird der Probe ein Volumen von 560 µl 96-100% Ethanol hinzugefügt und ein zweites Mal auf dem Vortex gemischt. Im Folgenden schließen sich zwei Zentrifugationsschritte an, bei denen die Probe (je 630 µl) in eine Zentrifugationssäule gefüllt und bei 8000 Upm für 1 Min. zentrifugiert wird. Nachdem das Filtrat mitsamt dem Sammelröhrchen verworfen wurde, wurde die Probe mit einem neuen Sammelröhrchen bestückt, mit dem Puffer AW1 (500 µl) versetzt und für 1 Min. bei 8000 Upm zentrifugiert. Nach diesem Waschprozeß schließt sich ein weiterer Waschprozeß mit dem Puffer AW2 an. Hierbei werden wieder, nach dem Aufsetzen der Zentrifugationssäule auf ein neues Sammelröhrchen, 500 µl Volumen (Puffer AW2) hinzugefügt und in der Tischzentrifuge 5417C, Eppendorf, Hamburg, bei 14000 Upm für 3 Min. zentrifugiert. Abschließend wird die gereinigte DNA mit Hilfe des Puffers AVE (50 µl) aus der Zentrifugationssäule eluiert, indem zuerst 1 Min. bei Raumtemperatur inkubiert und danach für 1 Min. bei 8000 Upm zentrifugiert wurde.

Durch den letzten Elutionschritt können bis zu 90% der viralen DNA von der Zentrifugationssäule gewonnen werden.

### **3.7 Analyse der Schmelztemperatur ( $T_m$ ) der Primer**

Für diese Arbeit wurden die Schmelztemperaturen der Primer bestimmt. Dazu wurde das Programm Oligonucleotide Properties Calculator nach der Methode des Nächsten Nachbarn ("nearest neighbour") benutzt. Der wissenschaftliche Zugang zu diesem Programm und der Methode ist über die Internetadresse <http://www.basic.nwu.edu/biotools/oligocalc.html> möglich. Hierbei werden die thermodynamischen Eigenschaften berücksichtigt, die von Breslauer et al., 1986 für DNA-Oligomere und DNA-Polymere formuliert wurden und auf jegliche Form von DNA mit bekannter Basensequenz angewendet werden können (Breslauer et al., 1986). Dabei hat sich gezeigt, daß die thermodynamische Gesamtheit der DNA-Struktur (Stabilität, Schmelztemperatur, etc.), sich aus der Summe der thermodynamischen Wechselwirkung der einzelnen nächsten Nachbarn zusammensetzt.

Um die Schmelztemperaturen zu bestimmen, mußten die Sequenzen der Primer in das Programm eingegeben werden und die bestimmte Methode ausgewählt werden. Anschließend konnten die errechneten Werte dem Programm entnommen werden.

### **3.8 Sonstige Methoden**

#### **3.8.1 Plasmid-Maxipräparation**

Diese Methode (modifiziert nach Birnboim und Doly, 1979) dient zur Aufreinigung größerer Mengen Plasmid-DNA aus Bakteriensuspensionen mit 400 bis 500 ml Volumen (Birnboim und Doly, 1979). Dazu wurde ein Plasmid Maxi Kit der Firma Qiagen, Hilden, in dem die benötigten Puffer und Anionenaustauschersäulen enthalten waren, verwendet.

Bakterien einer Übernachtskultur (max. 12 h) wurden für 15 Min. bei 4 °C und 4500 Upm zentrifugiert (Jouan-Zentrifuge), das Bakterienpellet in 10 ml

Resuspensionspuffer aufgenommen, mit 10 ml Lysispuffer durchmischt und bei Raumtemperatur für 5 Min. inkubiert. Dies diente der Zellyse und Freisetzung der Plasmid-DNA. Zur Fällung von Proteinen und chromosomaler DNA wurden 10 ml einer 3 molaren Kaliumacetatlösung (pH 5,5,) hinzugegeben, für 20 Min. auf Eis inkubiert und danach in der Jouan-Zentrifuge für 30 Min. bei 4500 Upm und 4 °C zentrifugiert. Der klare Überstand wurde über eine mit 10 ml Äquilibriumspuffer behandelte Anionenaustauschersäule gegeben. Anschließend wurden die Säulen durch zweimaliges Auftragen von jeweils 30 ml Säulenwaschpuffer gewaschen und die Plasmid-DNA danach mit 15 ml des Elutionspuffers herausgelöst. Das Eluat wurde mit dem 0,7fachen Volumen an Isopropanol (Entsalzung und Konzentrierung) versetzt und durch Zentrifugation bei 4 °C und 4500 Upm für 1,5 h pelletiert. Abschließend wurde das Pellet mit 70%-igem Ethanol gewaschen und die getrocknete DNA in 50 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen.

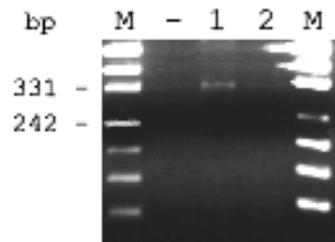
## 4 Ergebnisse

Die hier gezeigten Ergebnisse dienten dazu eine Methode zu entwickeln, mit der in einem Ansatz alle bekannten HBV-Genotypen in einer Multiplex-PCR spezifisch nachgewiesen werden können.

### 4.1 Kein eindeutiger Nachweis durch HBV-Subtypspezifische Primer

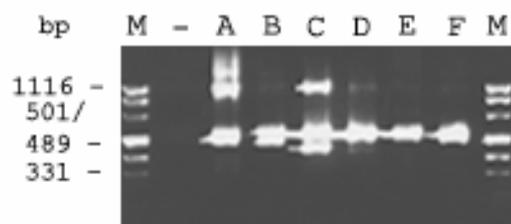
Zu Beginn der Arbeit wurde auf eine publizierte Methode zurückgegriffen. Diese Multiplex-PCR ermöglichte die Unterscheidung von HBV-Genomen des Subtyps adw2, adw4, ad/yr und ayw (Repp et al., 1993). Nach heutigen Kenntnissen konnte diese Multiplex-PCR also die HBV Genotypen A, C, D und F diskriminieren.

In der damaligen Publikation war ein neues Bandenmuster aufgefallen, dem später (R. Repp, pers. Mitteilung) eine Erkennung des Genotyps E zugeordnet werden konnte. Somit fehlten also nur noch Primer, die spezifisch Genotyp B erkannten, um alle zum damaligen Zeitpunkt bekannten sechs Genotypen A bis F zu unterscheiden. Mit Hilfe eines Alignments von 73 kompletten HBV-Sequenzen wurde ein Primer herausgesucht, welcher spezifisch für den Genotypen B des Hepatitis B Virus war. Eine Amplifikation des B-spezifischen Primers zusammen mit dem in der Multiplex-PCR enthaltenen universellen Primer repp-P2 sollte eine für den Genotypen B spezifische Bande von 331 bp generieren. Es wurde also eine Amplifikation mit den Primern repp-P2 und Genotyp-B-P9 unter Verwendung eines Templates des Genotyps B durchgeführt. Hierbei konnte gezeigt werden, daß dieses Primerpaar spezifisch die entsprechende Sequenz des Genotyps B des Hepatitis B Virus amplifiziert (Abb. 4.1). Aufgrund dieses Ergebnisses sollte danach überprüft werden, ob die Primer repp-P1 bis P8 und Genotyp-B-P9 ein ähnliches spezifisches Ergebnis liefern, wenn sie in einem Reaktionsansatz vorliegen. Die Ergebnisse dieser Versuche zeigen die folgenden Abbildungen 4.1 und 4.2.



**Abb. 4.1: Spezifität der Amplifikation mit dem Primerpaar repp-P2 und Genotyp-B-P9 spezifisch für den Genotypen B.**

Dargestellt sind in den Spuren 1 und 2 die amplifizierten Produkte mit den angegebenen Primern unter Verwendung des Genotyp B-spezifischen Templates pHTD in der Multiplex-PCR. Spur 2 ist im Vergleich zu Spur 1 10fach verdünnt. Die Bande liegt bei den erwarteten 331 bp. M = Längenstandard (pUC Mix Marker Nr. 8, MBI Fermentas); - = Negativkontrolle; Agarose: 2,5% MetaPhor; DNA Thermal Cycler, Perkin-Elmer Cetus.



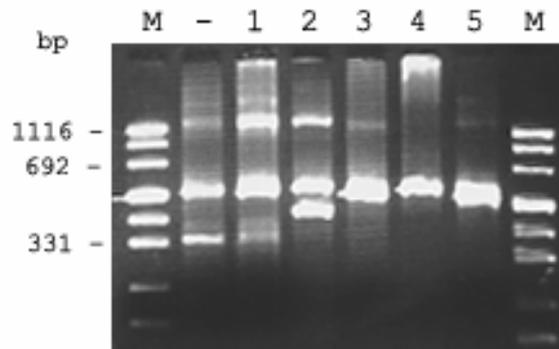
**Abb. 4.2: Suboptimaler Nachweis spezifischer Multiplex-PCR Amplifikate mit den Primern repp-P1 bis P8 und Genotyp-B-P9.**

In den Spuren A bis F wurde die PCR mit gereinigter HBV-DNA der Genotypen A bis F durchgeführt. Dargestellt ist ein suboptimaler Nachweis der einzelnen HBV-Genotypen. M = Längenstandard (pUC Mix Marker Nr. 8, MBI Fermentas); - = Negativkontrolle; Agarose: 2,5%; MetaPhor DNA Thermal Cycler, Perkin-Elmer Cetus.

Die Abbildung 4.2 zeigt das wenig vielversprechende Ergebnis dieses methodischen Ansatzes. Die dargestellten Banden in dieser Abbildung sind nicht dazu geeignet problemlos die Spezifität der Genotypen erkennen zu lassen. Die Banden liegen eindeutig zu dicht beieinander, um sie in einem gebräuchlichen Agarosegel diskriminieren zu können.

Ein weiterer Aspekt, der bei dieser Methode erwähnt werden muß, ist der Einsatz eines Protokolls nach der nested PCR. Anfänglich wurde für diese Arbeit die Methode der Multiplex-PCR angewendet (Repp et al., 1993). Allerdings hat dieses Verfahren einen wichtigen Nachteil in der potentiellen Kontaminationsgefahr. Da hierbei das PCR-Produkt der 1. Runde weiter verarbeitet wird, ist es auch unter

sorgfältigstem Arbeiten möglich, daß Plasmide, DNA-Fragmente, etc. den Reaktionsansatz der zweiten Runde verschmutzen und so das Ergebnis belasten (Abb. 4.3).



**Abb. 4.3: Kontamination der Reaktionsansätze.**

Dargestellt ist die Kontamination der Negativkontrolle (Spur -). Weiterhin sind unspezifische Banden in den Spuren 1 bis 5 (A, C-F) aus einer Multiplex-PCR mit den Primern repp-P1 bis P-8 und Genotyp-B-P9 abgebildet. M = Längenstandard (pUC Mix Marker Nr. 8, MBI Fermentas); Agarose: MetaPhor 2,5%; DNA Thermal Cycler, Perkin-Elmer Cetus.

Die unangenehmen Erfahrungen der Kontaminationen der nested PCR, und die Tatsache, daß die eingesetzten Primer im Reaktionsansatz zwar spezifische Banden erbrachten, diese aber sehr dicht beieinander lagen, führte dazu, neue Primer für die nunmehr sieben bekannten Genotypen (Stuyver et al., 2000) zu entwerfen.

## 4.2 Konstruktion Genotyp-spezifischer HBV-Primer

Das Herausarbeiten der Genotyp-spezifischen HBV-Primer wurde anhand eines Alignments ausgeführt. Hierbei wurde ein Alignment herausgegriffen mit 73 verschiedenen humanen Isolaten zu denen 9 Isolate zu Genotyp A, 9 Isolate zu Genotyp B, 21 Isolate zu Genotyp C, 27 Isolate zu Genotyp D, 3 Isolate zu Genotyp E, 3 Isolate zu Genotyp F und 1 Isolat zu Genotyp G gehörten.

Nach der Analyse verschiedener Stellen in diesem Alignment, wurden visuell solche Nukleotidsequenzen herausgesucht, die spezifisch für den einen oder anderen Genotyp stehen und einen relativ hohen Unterschied zu den anderen Genotypen zeigen. Hierbei wurde besonders auf Unterschiede der 3`-Enden gelegenen Basen geachtet, da diese besonders wichtig für eine spezifische PCR sind. Wurden

geeignete Bereiche gefunden, die auch auf 20 bis 30 Nukleotide konserviert im jeweiligen Genotyp waren, so wurde mit Hilfe des Programms Oligonucleotide Properties Calculator und der Methode des "Nearest Neighbour" die Schmelztemperatur des Primers bestimmt. Das Ziel war es, sieben Primersätze zu entwickeln, die exakt die gleiche Schmelztemperatur aufwiesen. Da einige Primer einen relativ niedrigen G/C Anteil aufwiesen, mußten diese Primer am 5`-Ende auf über 30 Nukleotide verlängert werden. Die Tabelle 4.1 zeigt die Position der Primer, die Länge des erwarteten DNA-Fragments und die ermittelte Schmelztemperatur.

**Tab. 4.1: Eigenschaften der Genotyp-spezifischen HBV-Primer.**

In der Tabelle sind die Charakteristika der Genotyp-spezifischen HBV-Primer, wie sie zur Typisierung der HBV-Genotypen eingesetzt wurden, aufgelistet. Neben der Polarität der Primer (sense oder antisense), der Primerlänge in Nukleotiden (nt) und der Schmelztemperatur ( $T_m$ ) in °C, ist noch die erwartete DNA-Fragmentlänge in Basenpaaren (bp) angegeben.

HBV-Genotyp		Position im	Primerlänge	$T_m$ [°C]	Fragment-
Primer		HBV-Genom	[nt]		länge [bp]
A	s	2331-2360	29	72	370
	as	2701-2665	35	71	
B	s	1470-1491	22	73	189
	as	1660-1633	28	72	
C	s	2706-2741	36	71	702
	as	192-165	28	72	
D	s	2843-2870	28	72	147
	as	2990-2966	25	72	
E	s	2093-2122	30	72	834
	as	2880-2853	28	73	
F	s	2843-2871	29	72	481
	as	109-83	27	71	
G	s	1890-1920	31	72	1037
	as	2880-2853	28	73	

Anschließend wurden die Oligonukleotide, resp. Primer, synthetisiert. Das Ergebnis der Synthese sind die Primer HBV-GT1-A-s und -as bis HBV-GT1-G-s und -as, wie sie in Abbildung 4.4 dargestellt sind.

In der Abbildung werden zuerst die Primer und deren Sequenzen gezeigt und anschließend die Gemeinsamkeiten (dargestellt durch Punkte ".") bzw. Unterschiede (dargestellt durch Buchstaben, s.u.) zu den 7 Genotypen beschrieben. Es stehen neben den 4 Buchstaben G, C, A und T für die Basen Guanin, Cytosin, Adenin und Thymin, auch noch weitere Abkürzungen, wie R (=A+G), Y (=C+T), M (=A+C), K (=G+T), S (=G+C), W (=A+T), H (=A+T+C), B (=G+T+C), D (=G+A+T), V (=G+A+C) und N (=A+G+C+T) zum Gebrauch. Diese wurden eingesetzt, wenn in den untersuchten Isolaten-Alignments mindestens zwei unterschiedliche Basen im Vergleich zum "Optimal-Primer" aufgetreten sind. Einzelne Basenabweichung, die im Alignment auftreten, wurden als Kleinbuchstabe der auftretenden Base gekennzeichnet.

Die Abbildung 4.4 zeigt die Sequenzen der Genotyp-spezifischen Primer sowie die Unterschiede im Vergleich zu allen anderen Genotypen:

**Primer: HBV-GT1-A-s (2331-2360)**

**Sequenz: 5`-CGG AAA CTA CTG TTG TTA GAC GAC GGG AC-3`**

A	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
B	...	...	c.a	...	...	...	g..	..M	.Ag	G.		
C	...	...	...	...	..R	...	...	Rac	gAS	G.		
D	...	.R.	..W	S..	..R	...	g..	R..	.ag	g.		
E	...	.G.	A..	...	...	...	...	..A	.A.	G.		
F	...	.G.	...	...	...	...	...	...	.A.	G.		
G	...	.G.	...	...	...	...	...	..A	.A.	G.		

**Primer: HBV-GT1-A-as (2701-2665)**

**Sequenz: 5`-AAT TCC TTT GTC TAA GGG CAA ATA TTT AGT GTG GG-3`**

A	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
B	c..	G..	...	T..	...	...	...	...	...	Y..	TTG	Ta
C	Y..	B..	...	Y..	R..	H..	V.t	t..	a..	c..	TTH	cA
D	Y..	T..	G..	T..	R..	a..	R..	...	...	c..	tTg	Ka
E	A..	t..	...	G..	..C	...	g..	...	...	g..	TCT	.T
F	t..	cg.	...	g..	G.H	Hc.	c..	...	...	c..	Ttc	gA
G	C..	T..	...	...	...	A..	A..	...	...	...	TCT	.A

**Primer: HBV-GT1-B-s (1470-1491)**

**Sequenz: 5`-CCG CTT GGG GCT CTA CCG CCC G-3`**

A	...	...	...	.c.	..c	T..	T..	C
B	...	...	g..	g..	...	...	...	.
C	Y..	T..	g..	Nc.	...	Y..	T..	C
D	Y..	Y..	...	RMt	c.B	T..	T..	C
E	T..	...	...	.A.	..a	T..	T..	c
F	c..	...	...	...	g..	...	...	t
G	...	T..	...	...	..G	T..	...	C

**Primer: HBV-GT1-B-as (1660-1633)**

**Sequenz: 5`-CTC TTA TGC AAG ACC TTG GGC AGG TTC C-3`**

A	...	...	..A	...	...	...	...	...	...	T..	A
B	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	.
C	...	..t	.YR	...	.S.	..c	...	..tV	tg.	D	
D	..a.	..t	.YA	..c	...	G.A	..C	GTH	NtV	N	
E	...	...	..A	...	...	...	...	..Tc	T.A	A	
F	..a.	...	..A	...	..A	C.A	...	..TT	G..	.	
G	..T.	...	..TA	..G	AC.	G.A	...	..T	..CT	A	

**Primer: HBV-GT1-C-s (2706-2741)**

**Sequenz: 5`-CCT GAA CAT GCA GTT AAT CAT TAC TTC AAA ACT AGG-3`**

A	..A	G.T	..G	.T.	...	...	...	...	...	C..	..C	..A
B	..A	..G	Y.t	gT.	...	a..	...	...	...	C.G	..g	M.A
C	...	...	Y..	...	...	...	...	...	...	M..	..D	...
D	..R	..a	H.Y	YT.	...	...	...	..C	..C	C.A	a.Y	M.A
E	..A	..T	A..	GT.	...	...	...	...	..C	C.A	..C	A.A
F	..a	..g	C.t	GC.	...	...	...	..t	..T	c.A	..C	A.A
G	..A	..A	A..	GT.	...	...	...	..C	..C	C.G	..C	A.A

**Primer: HBV-GT1-C-as (192-165)**

**Sequenz: 5`-AGC AGG GGT CCT AGG AAT CCT GAT GTT G-3`**

A	t..	...	...	...	...	..T.	...	...	..C	T	
B	...	...	c..	...	...	..C.	...	...	..gC	T	
C	...	...	...	...	...	..t.	...	...	...	.	
D	..K	...	...	...	...	..Ya	...	...	..M	T	
E	...	...	...	...	...	..T.	...	...	..C	T	
F	t..	...	...	...	...	..C.	...	...	..c	T	
G	...	...	...	...	...	..T.	...	...	..C	T	

**Primer: HBV-GT1-D-s (2843-2870)**

**Sequenz: 5`-ACA GCA TGG GGC AGA ATC TTT CCA CCA G-3`**

A	...	...	..gg	..ag	gTt	Ggt	cat	Ba.	aac	c	
B	...	...	...	..AG	GTT	GGT	CT.	...	AAC	A	
C	..a	...	tgg	gAg	gTt	Ggt	ctt	c..	aac	c	
D	...	...	...	...	...	a..	..W.	...	...	.	
E	...	T..	...	...	TTT	C.T	GGA	..GG	T.C	C	
F	...	...	...	..AG	CAC	C..	..C.	..A.	..G.	C	
G	...	...	...	...	TTT	C.T	GGA	..GG	TCC	C	

**Primer: HBV-GT1-D-as (2990-2966)**

**Sequenz: 5`-CCT ACC TTG TTG GCG TCT GGC CAG G-3`**

A	..A	T.g	..C.	...	..A	C..	...	...	A	
B	..G	T..	..c	aHc	..KC	..G	...	...	A	
C	..a	T..	..MB	W.M	c.V	..a	...	..H	A	
D	..a	t..	...	...	..C	...	...	...	.	
E	..A	T..	...	...	..A	..V	..A.	...	A	
F	..A	T..	...	..A	..G	TA.	...	..T	g	
G	..A	T..	...	...	..G	...	...	..T	.	



<b>Primer:</b>	<b>HBV-GT1-E/G-as (2880-2853)</b>												
<b>Sequenz:</b>	<b>5`-CCA TTC GAG AGG GAC CGT CCA AGA AAG C-3`</b>												
A	C.G	A.A	.G.	...	AAA	AcT	AC.	GG.	.GG	A			
B	C.G	A.M	AG.	...	AAA	C.T	YC.	GG.	.GG	A			
C	C.G	AaM	RG.	...	AAA	C.T	TC.	GG.	.GG	A			
D	.TC	TCC	TAA	CGA	.CA	C.T	WTC	.aA	GA.	.			
E	...	A..	...	...	...	...	...	...	...	.			
F	C.G	gGA	AGa	A.A	GCA	A.T	CTC	..C	ACG	A			
G	...	G..	...	...	...	...	...	...	...	.			

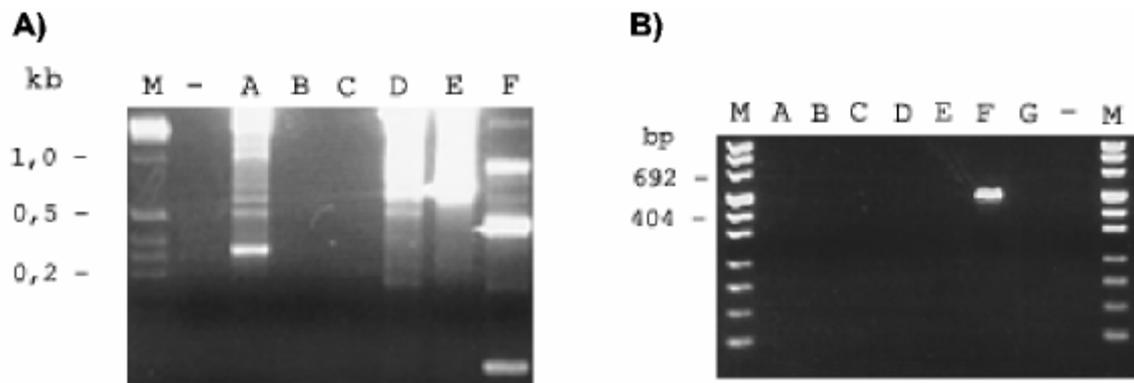
**Abb. 4.4: Nukleotidsequenz und -vergleich der Genotyp-spezifischen Primer HBV-GT1-A-s und -as bis HBV-GT1-G-s und -E/G-as.**

Abgebildet sind die Sequenzen der Primer HBV-GT1-A-s und as, HBV-GT1-B-s und as, HBV-GT1-C-s und as, HBV-GT1-D-s und as, HBV-GT1-E-s und E/G-as, HBV-GT1-F-s und as und HBV-GT1-G-s und E/G-as, die Anlagerungssequenz im Genotyp-spezifischen HBV-Genom und der Vergleich zu allen anderen Genotypen des HBV-Genoms. Durch die Punkte werden die für die Anlagerung des Primers an die HBV-DNA optimale (komplementäre) Basenabfolge dargestellt.

### 4.3 Optimierung der PCR Methodik

Um eine Genotypisierung durchzuführen, müssen klar und eindeutig zuzuordnende Banden entstehen. Um dieses Ziel zu erreichen, mußten verschiedene Parameter in der PCR Methodik experimentell überprüft und verbessert werden.

Bevor im einzelnen die durchgeführten Optimierungsschritte aufgezeigt werden, soll in Abbildung 4.5 dargestellt werden, in welchem Ausmaße die PCR verbessert wurde.

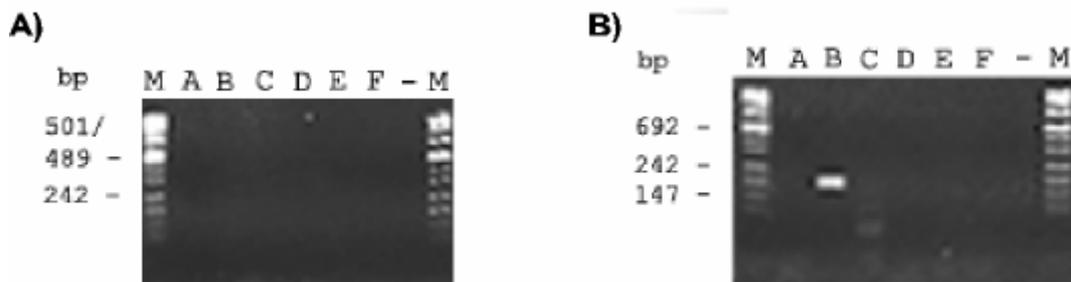


**Abb. 4.5: Nachweis der PCR Amplifikate vor (A) und nach (B) Optimierung der PCR Methodik.**

Vor der Optimierung der PCR **(A)** sind unspezifische Banden und ein relativ hoher "Hintergrundschmier" zu erkennen. Die PCR wurde ohne Hot Start durchgeführt. Die Annealingtemperatur betrug 55 °C.

Spur A „Primer-Mix“ (HBV-GT1-A bis G) und Template des Genotyps A des HBVs; Spur B „Primer-Mix“ und Template des Genotyps B; Spur C „Primer-Mix“ und Template des Genotyps C; Spur D „Primer-Mix“ und Template des Genotyps D; Spur E „Primer-Mix“ und Template des Genotyps E; Spur F „Primer-Mix“ und Template des Genotyps F; Spur - = Negativkontrolle; M = Längenstandard (1 kb DNS Leiter Marker von Gibco BRL®); - = Negativkontrolle; Hybaid OmniGene, MWG-Biotech AG. **(B)** zeigt die Verbesserung der PCR Methodik mit "Hot Start" und optimierter Annealingtemperatur (60 °C). Dargestellt ist der Referenzgenotyp F (Template), wie er gegen die spezifischen Primer HBV-GT1-A bis G (Spuren A bis G) getestet wurde. M = Längenstandard (pUC Mix Marker Nr. 8, MBI Fermentas); - = Negativkontrolle; GeneAmp PCR System 9600.

Neben der Umstellung von einer einfachen PCR zu einer Hot Start PCR mit dem Wechsel von einer einfachen thermostabilen (PanScript, Pan™ Biotech) Polymerase zu einer hitzeaktivierten (HotStarTaq™, Qiagen) Polymerase wurden weitere wichtige Parameter im Verlaufe dieser Arbeit optimiert und verbessert. Dazu zählt die Annealingtemperatur. Es handelt sich um die Temperatur, bei der sich die Primer an die einsträngige DNA anlagern und anschließend verlängert werden. Hierbei hat sich gezeigt, daß für die verwendeten Primer eine Temperatur im Anlagerungsschritt der PCR von 65 °C zu hoch war und zu wenig PCR-Amplifikat gebildet wurde. Durch systematisches Testen, stellte sich heraus, daß die Temperatur, bei der sich die verwendeten Primer optimal an ihre Templates anlagerten bei 60 °C lag. Die Ergebnisse in Abbildung 4.6 zeigen diesen Einfluss der Temperatur auf.



**Abb. 4.6: Optimierung der Annealingtemperatur.**

Dargestellt sind die Ergebnisse zweier PCR, die außer den unterschiedlichen Annealingtemperaturen, in identischer Weise durchgeführt wurden. In **(A)** liegt die Temperatur mit 65°C zu hoch und es entstehen keine Amplifikate. Gezeigt ist der Referenzgenotyp B (Template), wie er gegen die spezifischen Primer HBV-GT1-A bis F (Spuren A bis F) getestet wurde; in **(B)** ist die Temperatur 5°C niedriger. Es entsteht eine spezifische Bande für den Genotypen B des Hepatitis B Virus. Auch hier dient der Genotyp B als Template. Eingesetzte Primer sind die Primer HBV-GT1-A bis F (Spuren A bis F). M = Längenstandard (pUC Mix Marker Nr. 8, MBI Fermentas); - = Negativkontrolle; Agarose: 2,5% MetaPhor; Hybaid OmniGene, MWG-Biotech AG.

Weitere Parameter, die in dieser Arbeit untersucht wurden, waren der Einfluß unterschiedlicher DNA-Polymerasen, die bei den Vorversuchen benutzt wurden. Hierbei ergab sich, daß je nach Enzym (PCR-Gerät, Medien, eingesetzte Enzymmengen etc.) unterschiedliche Ergebnisse erzielt wurden. So wurde in dem einen Fall ein Genotyp-spezifische Bande erzeugt, in dem anderen nicht. In diesem Zusammenhang wurden auch verschiedene PCR-Geräte verwendet; auch hier wurden bei sonst konstanten Bedingungen unterschiedliche Ergebnisse gewonnen. Nach Auswertung dieser Ergebnisse wurden die weiteren Arbeiten an dem GeneAmp PCR System 9600, Perkin-Elmer, und mit der DNA-Polymerase von Qiagen, HotStarTaq™, durchgeführt.

Weiterhin wurden die Zeiten für die einzelnen Schritte in der PCR optimiert. Die Zeit für die Denaturierung wurde auf 1 Min. festgesetzt. Die Annealingzeit wurde zwischen 1 und 2 Min., genauso wie die Elongationszeit, variiert. Wichtig ist dabei zu berücksichtigen, ob die erwarteten PCR Produkte über 1 kb Länge liegt. Hierbei sollten die Zeiten, vor allem in der Elongation, entsprechend um ca. 1 Min. pro 1 kb verlängert werden. In dieser Arbeit liegen die PCR Produkte aber in einem Bereich um 1 kb Länge (längstes erwartetes Amplifikat: Genotyp G mit 1037 bp; Tab. 4.1), so daß es kaum einen großen Spielraum für die einzusetzenden Zeiten gab. Aus diesem Grunde sind die Ergebnisse mit den oben beschriebenen Zeiten nicht dargestellt.

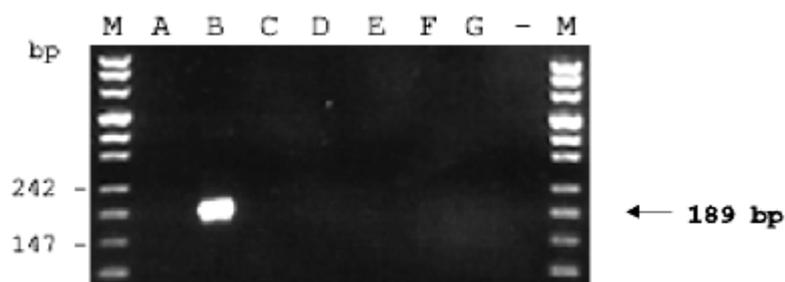
#### 4.4 Nachweis der Spezifität der Primer

Nach Optimierung der PCR-Bedingungen wurden die konstruierten Primer auf ihre Spezifität gegenüber den einzelnen Genotypen hin überprüft. Hierzu wurden die Genotypen (Templates) jeweils mit einem für den entsprechenden Genotyp-spezifischen Primersatz getestet. Die Abbildungen 4.7 bis einschließlich 4.12 geben die Ergebnisse dieser Versuche wieder.



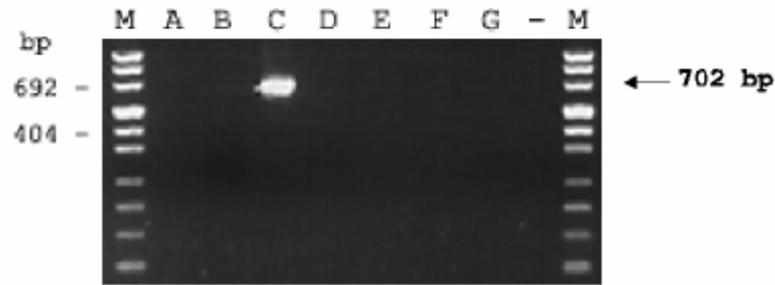
**Abb. 4.7: Spezifität der Amplifikation mit dem Primerpaar HBV-GT1-A-s und -as, spezifisch für den Genotypen A.**

In den Spuren wurde die PCR mit gereinigter HBV-DNA des Genotyps A durchgeführt und mit den Primerpaaren A bis G getestet. Die angefärbte Bande liegt bei 370 bp. Spur A: Amplifikation der HBV-DNA mit dem Primerpaar GT1-A; Spur B: Amplifikation der HBV-DNA mit dem Primerpaar GT1-B; Spur C: Amplifikation der HBV-DNA mit dem Primerpaar GT1-C; Spur D: Amplifikation der HBV-DNA mit dem Primerpaar GT1-D; Spur E: Amplifikation der HBV-DNA mit dem Primerpaar GT1-E; Spur F: Amplifikation der HBV-DNA mit dem Primerpaar GT1-F; Spur G: Amplifikation der HBV-DNA mit dem Primerpaar GT1-G; M = Längenstandard (pUC Mix Marker, Nr. 8, MBI Fermentas); - = Negativkontrolle; Agarose: MetaPhor 2,5%; GeneAmp PCR System 9600.



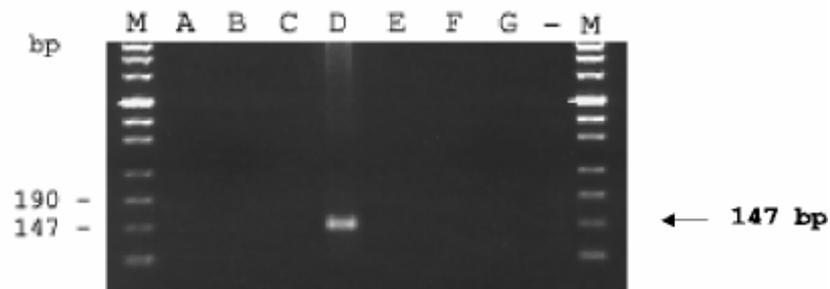
**Abb. 4.8: Spezifität der Amplifikation mit dem Primerpaar HBV-GT1-B-s und -as, spezifisch für den Genotypen B.**

In den Spuren wurde die PCR mit gereinigter HBV-DNA des Genotyps B durchgeführt und mit den Primerpaaren A bis G getestet. Die angefärbte Bandenlänge liegt bei 189 bp. Die Belegung der Spuren und die Abkürzungen sind der Abb. 4.7 zu entnehmen.



**Abb. 4.9: Spezifität der Amplifikation mit dem Primerpaar HBV-GT1-C-s und -as, spezifisch für den Genotypen C.**

In den Spuren wurde die PCR mit gereinigter HBV-DNA des Genotyps C durchgeführt und mit den Primerpaaren A bis G getestet. Die Höhe der Bande liegt bei 702 bp. Die Belegung der Spuren und die Abkürzungen sind der Abb. 4.7 zu entnehmen.



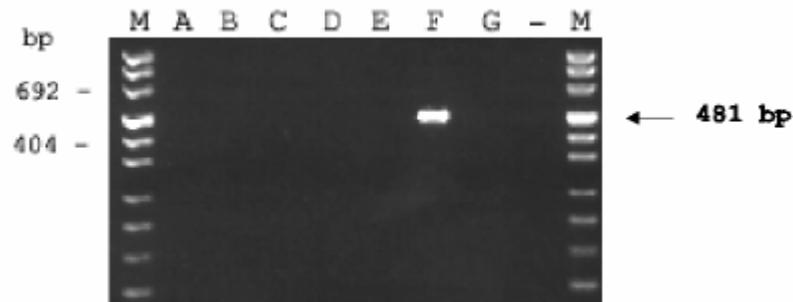
**Abb. 4.10: Spezifität der Amplifikation mit dem Primerpaar HBV-GT1-D-s und -as, spezifisch für den Genotypen D.**

In den Spuren wurde die PCR mit gereinigter HBV-DNA des Genotyps D durchgeführt und mit den Primerpaaren A bis G getestet. (Bandenlänge 147 bp). Die Belegung der Spuren und die Abkürzungen sind der Abb. 4.7 zu entnehmen.



**Abb. 4.11: Spezifität der Amplifikation mit dem Primerpaar HBV-GT1-E-s und -E/G-as, spezifisch für den Genotypen E.**

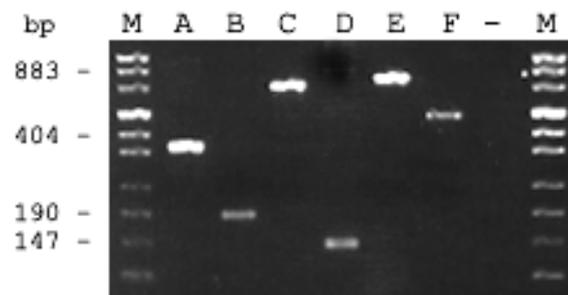
In den Spuren wurde die PCR mit gereinigter HBV-DNA des Genotyps E durchgeführt und mit den Primerpaaren A bis G getestet. Nachgewiesene Bandenlänge bei 834 bp. Die Belegung der Spuren und die Abkürzungen sind der Abb. 4.7 zu entnehmen.



**Abb. 4.12: Spezifität der Amplifikation mit dem Primerpaar HBV-GT1-F-s und -as, spezifisch für den Genotypen F.**

In den Spuren wurde die PCR mit gereinigter HBV-DNA des Genotyps F durchgeführt und mit den Primerpaaren A bis G getestet. Die Höhe der Bande liegt bei 481 bp. Die Belegung der Spuren und die Abkürzungen sind der Abb. 4.7 zu entnehmen.

Im folgenden Schritt wurden die Primer nicht mehr einzeln gegenüber den Templates verwendet, sondern es wurde eine Primer-Mix, bestehend aus den sieben Primersätzen, erstellt. Anschließend wurde in der PCR dieser Mix mit den Genotypen überprüft, ob er in der Lage war, ausschließlich DNA des entsprechenden Genotypen zu amplifizieren und nicht einfach nur unspezifische Banden, resp. Sequenzen, amplifiziert. Das Ergebnis dieses Ansatzes zeigt die Abbildung 4.13.



**Abb. 4.13: Nachweis der spezifischen Genotyp-Sequenzen im Primer-Mix.**

Es sind die Genotyp-spezifischen Banden des Hepatitis B Virus dargestellt. Nach erfolgreicher Hot Start PCR können Amplifikate mit 370, 189, 702, 147, 834 und 481 bp nachgewiesen werden. Eingesetzte Primer sind die Primer HBV-GT1-A bis G. Eingesetzte Menge des Templates liegt zwischen 5 und 10 ng. M = Längenstandard (pUC Mix Marker, Nr. 8, MBI Fermentas); - = Negativkontrolle; Agarose: MetaPhor 2,5%; GeneAmp PCR System 9600.

Es zeigte sich, daß die Spezifität der verwendeten Primer auch in einer Multiplex-PCR mit sieben Primerpaaren gewahrt blieb.

## 4.5 Quantifizierung

### 4.5.1 Quantitätsnachweis der HBV-DNA mit dem LightCycler™

Um die Empfindlichkeit der Multiplex-PCR festzustellen, wurden anhand eines HBV-DNA-Standards, die Genotyp-spezifischen Konstrukte quantitativ bestimmt und anschließend in Verdünnungsreihen die Sensitivität der genotyp-spezifischen Primerpaare erfaßt.

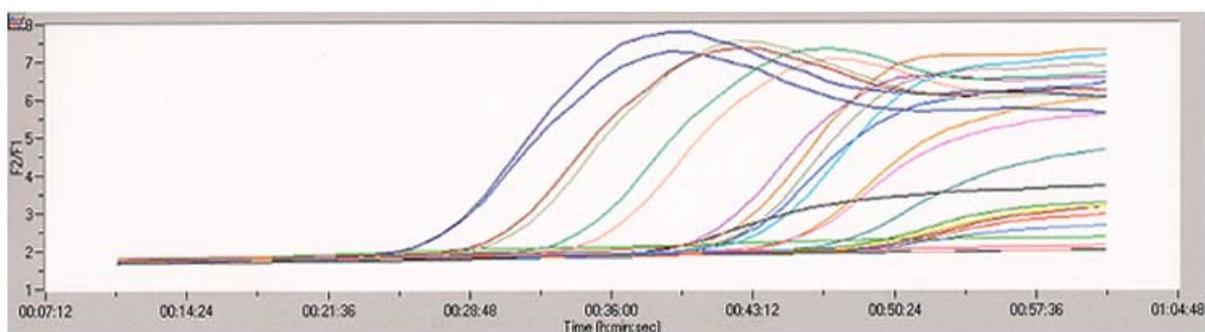
Für den LightCycler™ wurden die Primer HBV, X2s und HBV, X2as verwendet. Als Positivkontrolle wurde das Referenzserum ID 123 mit  $6,25 \times 10^6$  Genomäquivalenten pro ml und zum Erstellen der Eichkurve dieselbe Probe in den Verdünnungsstufen von  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  und  $10^{-5}$  eingesetzt (Brechtbuehl et al., 2001). Daraus konnte anschließend die Menge an Genomäquivalenten pro ml in den Proben errechnet werden. Im Anschluss an die durchgeführte PCR wurde die Eichgerade vom LightCycler™ Programm erstellt. Die durch den Einsatz des LightCyclers™ gewonnenen Daten wurden danach für den Empfindlichkeitsnachweis der Hot Start PCR benutzt. Als Negativkontrolle wurde stets sauberes steriles Wasser mitgeführt. Als Proben wurden hier die Plasmide der Genotypen A bis F eingesetzt, die in einer Verdünnungsreihe von  $10^{-1}$  bis  $10^{-6}$  erfaßt wurden. Die Ergebnisse dieser quantitativen Analyse gibt Tabelle 4.2 wieder.

**Tab. 4.2: Quantifikation der Genotypen A bis F mit dem LightCycler™.**

Es sind die Ergebnisse des LightCyclers™ in Genomäquivalenten pro ml, [GE/ml], dargestellt.

Verdünnungsstufe	A	B	C	D	E	F
$10^{-1}$	$1,1 \times 10^9$	$1,6 \times 10^6$	$1,4 \times 10^{10}$	$2,3 \times 10^{10}$	$0,9 \times 10^7$	$1,5 \times 10^6$
$10^{-2}$	$1,9 \times 10^8$	$2,1 \times 10^5$	$3,0 \times 10^9$	$1,7 \times 10^9$	$2,4 \times 10^6$	$1,3 \times 10^5$
$10^{-3}$	$1,8 \times 10^7$	$2,2 \times 10^4$	$2,7 \times 10^8$	$2,8 \times 10^8$	$4,1 \times 10^5$	$0,8 \times 10^4$
$10^{-4}$	$1,6 \times 10^6$	∅	$3,2 \times 10^7$	$5,3 \times 10^7$	$5,3 \times 10^4$	∅
$10^{-5}$	$2,3 \times 10^5$	∅	$1,1 \times 10^6$	$2,6 \times 10^6$	∅	∅
$10^{-6}$	$5,8 \times 10^4$	∅	∅	∅	∅	∅

Die Tabelle 4.2 gibt die Absolutwerte wieder, die aus den Stammlösungen berechnet wurden. Die Protokolle des LightCyclers™ sollen exemplarisch an der Abbildung 4.14 dargestellt werden. Man kann den zeitlichen Verlauf der PCR sowie das Ansteigen der gemessenen Fluoreszenz erkennen. Außerdem ist die zeitliche Zusammenfassung des gesamten Protokolls wiedergegeben, aber es ist hier zu erwähnen, daß es möglich ist, die PCR in Echtzeit ("Real-Time-PCR") zu verfolgen und schon während des Verfahrens erste Ergebnisse zu erhalten. In dem Hot Start Verfahren einer PCR sind Ergebnisse erst nach Auswertung eines Agarosegels möglich.

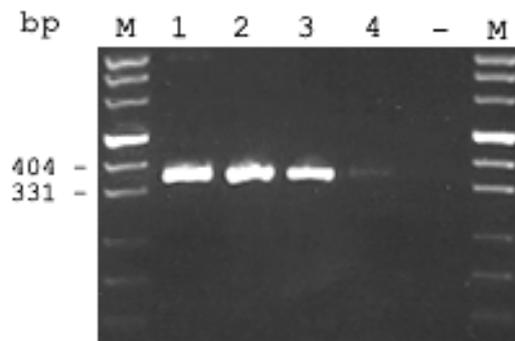


**Abb. 4.14: LightCycler™ Protokoll für den Nachweis von HBV-DNA.**

Dargestellt ist der zeitliche Verlauf von insgesamt drei Genotypen in unterschiedlichen Konzentrationen in Abhängigkeit der Fluoreszenz. Auf die Entschlüsselung der farblichen Komponenten wurde verzichtet, da nur ein exemplarisches Protokoll für die Arbeit mit dem LightCycler dargestellt werden sollte.

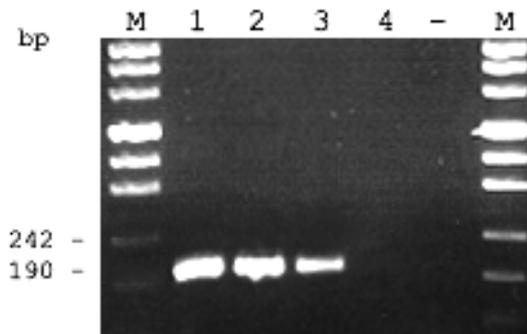
#### 4.5.2 Nachweis der Empfindlichkeit in der Hot Start PCR

Mit der Entwicklung der Genotyp-spezifischen Multiplex-PCR sollte nicht nur der Nachweis des Genotyps möglich sein, sondern auch ein empfindlicher Nachweis von HBV in Proben unbekannter Konzentration möglich sein. Die Hot Start PCR sollte nicht nur qualitativ funktionieren, sondern auch empfindlich in niedrig-konzentrierten Proben Ergebnisse liefern. Zu diesem Zweck wurden nun die Ergebnisse, die in Kap. 4.5.1 gewonnen wurden, angewendet. So wurde das System der Hot Start PCR (mit den Primern HBV-GT1-A-s und as, HBV-GT1-B-s und as, HBV-GT1-C-s und as, HBV-GT1-D-s und as, HBV-GT1-E-s und E/G-as, HBV-GT1-F-s und as, HBV-GT1-G-s und E/G-as) mit bekannten Konzentrationsreihen der Genotypen verwendet. Die folgenden Abbildungen 4.15 bis 4.20 dokumentieren die Ergebnisse.



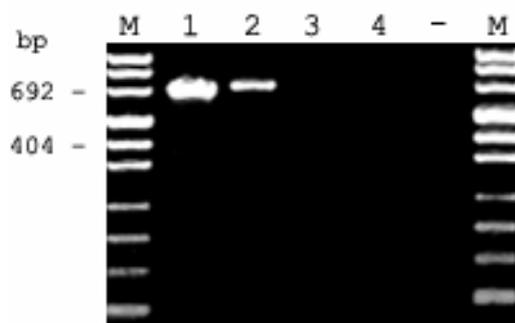
**Abb. 4.15: Nachweis der Empfindlichkeitsgrenze mit der Hot Start PCR für den Genotypen A.**

Dargestellt sind die mit Ethidiumbromid angefärbten DNA-Banden (370 bp). Es zeigt sich bis zur Konzentration von  $10^3$  GE/ml (Spur 4) ein positives Signal. M = Längenstandard (pUC Mix Marker Nr. 8, MBI Fermentas); Spur - = Negativkontrolle;; Spuren 1-3 entsprechen  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$  GE/ml; Agarose: MetaPhor 2,5%; GeneAmp PCR System 9600.



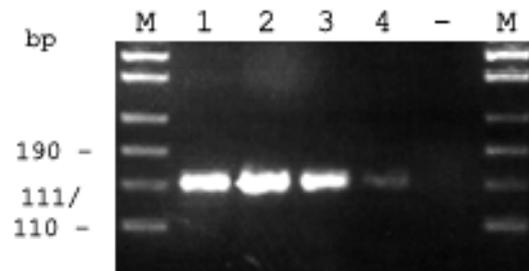
**Abb. 4.16: Nachweis der Empfindlichkeitsgrenze mit der Hot Start PCR für den Genotypen B.**

Die Empfindlichkeit ist durch ein positives Signal (189 bp lange Bande; Ethidiumbromid gefärbt) bei einer Konzentration von  $10^4$  GE/ml (Spur 3) dargestellt. M = Längenstandard (pUC Mix Marker Nr. 8, MBI Fermentas); Spur - = Negativkontrolle; Spuren 1-4 entsprechen  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$  und  $10^3$  GE/ml; Agarose: MetaPhor 2,5%; GeneAmp PCR System 9600.



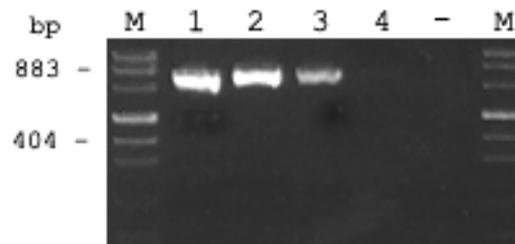
**Abb. 4.17: Nachweis der Empfindlichkeitsgrenze mit der Hot Start PCR für den Genotypen C.**

Nachweis einer 702 bp langen Bande bis zu einer Konzentration von  $10^5$  GE/ml (2). Die Bande ist mit Ethidiumbromid gefärbt. M = Längenstandard (pUC Mix Marker Nr. 8, MBI Fermentas); Spur - = Negativkontrolle; Spuren 1-4 entsprechen  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$  und  $10^3$  GE/ml; Agarose: MetaPhor 2,5%; GeneAmp PCR System 9600.



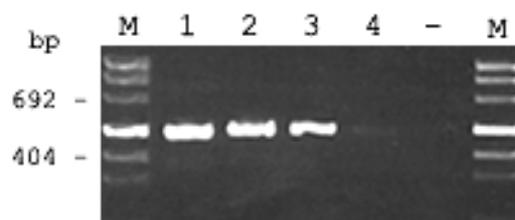
**Abb. 4.18: Nachweis der Empfindlichkeitsgrenze mit der Hot Start PCR für den Genotypen D.**

Die Abbildung zeigt den positiven Nachweis einer 147 bp langen DNA-Bande (Genotyp D). Die Banden, die mit Ethidiumbromid gefärbt sind, sind bis zu einer Konzentration von  $10^3$  GE/ml (Spur 4) nachzuweisen. M = Längenstandard (pUC Mix Marker Nr. 8, MBI Fermentas); Spur - = Negativkontrolle; Spuren 1-4 entsprechen  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$  und  $10^3$  GE/ml; Agarose: MetaPhor 2,5%; GeneAmp PCR System 9600.



**Abb. 4.19: Nachweis der Empfindlichkeitsgrenze mit der Hot Start PCR für den Genotypen E.**

Hier zeigen die Spuren einen positiven Nachweis einer Ethidiumbromid gefärbten Bande von 834 bp Länge. Die Empfindlichkeit des dargestellten Genotyps E kann bis zu einer Konzentration von  $10^4$  GE/ml (Spur 3) nachgewiesen werden. M = Längenstandard (pUC Mix Marker Nr. 8, MBI Fermentas); Spur - = Negativkontrolle; Spuren 1-4 entsprechen  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$  und  $10^3$  GE/ml; Agarose: MetaPhor 2,5%; GeneAmp PCR System 9600.



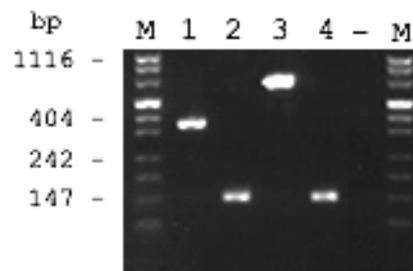
**Abb. 4.20: Nachweis der Empfindlichkeitsgrenze mit der Hot Start PCR für den Genotypen F.**

Dargestellt ist die Grenze der Empfindlichkeit in der Hot Start PCR Methode für den Genotyp F. Die mit Ethidiumbromid gefärbte Bande (481 bp) kann bis zu einer Konzentration von  $10^4$  GE/ml (Spur 3) nachgewiesen werden. M = Längenstandard (pUC Mix Marker Nr. 8, MBI Fermentas); Spur - = Negativkontrolle; Spuren 1-4 entsprechen  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$  und  $10^3$  GE/ml; Agarose: MetaPhor 2,5%; GeneAmp PCR System 9600.

Bemerkenswert ist die Tatsache, daß unter den beschriebenen Bedingungen der Hot Start PCR alle Genotypen eine Empfindlichkeit von  $10^4$  GE/ml (evtl. sogar  $10^3$ ) aufwiesen bis auf den Genotypen C, der eine Empfindlichkeit von  $10^5$  GE/ml zeigte.

#### 4.6 Nachweis der Anwendbarkeit auf klinische Proben

Neben allen diesen Versuchen, sollte natürlich auch die Anwendbarkeit und die Übertragbarkeit auf den medizinischen Bereich getestet werden. Das System soll dazu dienen, diagnostische und epidemiologische Daten zu erheben und nachzuprüfen. Dazu wurden verschiedene HBV-positive Seren bekannter Genotypen getestet. Das Ergebnis zeigt die Abbildung 4.21.



**Abb. 4.21: Positiver Nachweis der Anwendbarkeit der Methode.**

Dargestellt ist der positive Nachweis von Genotyp-spezifischen Banden in den Spuren der Seren ID 221 (1), ID 123 (KG) (2), HBV-C-Serum (3) und Eurohep-Standard 2 (4). Die mit Ethidiumbromid gefärbten Banden haben eine Höhe von 370 bp, 147 bp, 702 bp und wieder 147 bp und entsprechen somit den Genotypen A, D, C und wieder D. M = Längenstandard (pUC Mix Marker Nr. 8, MBI Fermentas); Spur - = Negativkontrolle; Agarose: MetaPhor 2,5%; GeneAmp PCR System 9600.

Die Ergebnisse zeigen, daß die Multiplex-PCR empfindlich einen HBV-Genotypen im Serum erfassen kann. Bis zur klinischen Anwendung sollen jedoch noch eine größere Reihe von Seren getestet werden.

## 5 Diskussion

### 5.1 Genotypisierung von HBV mit dem Multiplex-PCR Protokoll

Die neu entwickelte Methode der Hot Start PCR im Multiplex-PCR Protokoll ist in der Lage sechs der sieben bekannten HBV-Genotypen zu differenzieren. Das System liefert spezifische und empfindliche Banden.

#### 5.1.1 Optimierung des Systems

Um eine optimale Einstellung des Systems zu erhalten, wurden unterschiedliche Parameter, wie unterschiedliche PCR Maschinen, die Verwendung einer hitzeaktivierbaren Polymerase, die Annealingtemperatur und die Schmelztemperaturen des Primer-Template Komplexes untersucht. Durch den Austausch der PCR Maschinen, von DNA Thermal Cycler zum GeneAmp PCR System 9600, konnte auf das Überschichten der Proben mit Mineralöl verzichtet werden. Der GeneAmp PCR System 9600 besitzt einen beheizbaren Deckel, welcher in der Lage ist, die Proben konstant zu erhitzen, ohne daß es zur Verdunstung von Wasser aus dem Reaktionsansatz kommt. Die Verwendung der hitzeaktivierbaren Polymerase verhindert im Vergleich zu einer normalen hitzestabilen Polymerase das Auftreten von unspezifischen Banden (Abb. 4.5), die durch eine frühe Polymerisierung der Taq bei Raumtemperatur entstehen können (Elnifro et al., 2000; Moretti et al., 1998; Chou et al., 1992). Bei Temperaturen zwischen 4 °C und 25 °C entstehen Primerdimere, die die Spezifität und Sensitivität der PCR negativ beeinflussen können (Elnifro et al., 2000). Es würden also u.a. falsch positive Ergebnisse resultieren.

Bei der Untersuchung der Annealingtemperatur mußte darauf geachtet werden, daß sie nicht zu hoch gewählt wird, da so keine auswertbaren Banden (Abb. 4.3A) entstehen. Eine hohe Temperatur verhindert die Ausbildung von spezifischen Wechselwirkungen zwischen dem Primer und dem Template. Ist die Annealingtemperatur zu niedrig gewählt, so entstehen Banden, die nicht eindeutig diskriminiert werden können (Henegariu et al., 1997; Cha and Thilly, 1993). Interessant war, daß trotz Verwendung eines Programms zur Ermittlung der

Schmelztemperaturen eine effiziente Amplifikation erst 12 °C unter der errechneten Schmelztemperatur gelang.

Ein weiterer wichtiger Punkt zur Optimierung ist die Schmelztemperatur ( $T_m$ ) des Primer-Template Komplexes. Er hängt von der Länge des Primers und dem relativen Anteil an G/C im Vergleich zu dem Anteil an A/T ab (Robertson und Walsh-Weller, 1998; Shuber et al., 1995; Wu et al., 1991). Je höher der Anteil an G/C in einem Primer liegt, desto höher ist die Schmelztemperatur (Naito et al., 2001; Repp et al., 1993).

Ein anderer Aspekt in der Optimierung betraf die Position und Art von Primer-Template Falschpaarungen. Es werden Primer (optimale Länge: <500 Nukleotide) mit einem Anteil von 14% Falschpaarungen toleriert (Kaneko und Miller, 1990). Hierbei ist eine Falschpaarung am 3`-Ende mit mehr Konsequenzen behaftet als eine Falschpaarung am 5`-Terminus des Primers, da es zu Störungen in der Anlagerung der DNA-Polymerase kommt. Die Taq-Polymerase ist bei falschem 3`-Nukleotid nicht mehr in der Lage, einwandfrei Nukleotide an die 3`-OH-Gruppe des Primers anzuheften und so komplementäre DNA-Sequenzen zu liefern. Es ist auch bedeutungsvoll, ob es sich bei dem falschgepaarten Nukleotid um ein Thyminrest handelt oder nicht. So zeigt ein Thyminrest noch die Fähigkeit zur Basenpaarung und damit steht die Möglichkeit zur Primer-Template Basenpaarung noch offen (Gelfand et al., 1990). Da diese Aspekte bei der Primerauswahl berücksichtigt wurden, war im Verlauf der Arbeit ein Austausch oder Abwandlung der Primer aufgrund mangelnder Spezifität nicht nötig.

### 5.1.2 Empfindlichkeit des Systems

Die Empfindlichkeit mit der die HBV-Genotypen nachgewiesen werden konnte, lag bei  $10^3$ - $10^4$  GE/ml. Dieses Ergebnis muß kritisch betrachtet werden. Bei einer Empfindlichkeitsgrenze in der Höhe von  $10^4$  GE/ml, liegt die in den untersuchten Serumproben (50 µl Extraktionsvolumen) minimal zu erfassende Konzentration bei ca.  $10^5$  GE/ml. Somit könnten potentiell infektiöse Proben (Caspari und Gerlich, 1998) von  $10^5$  GE/ml u. U. falsch negativ getestet werden.

Die Empfindlichkeit, die sich hieraus ergibt, liegt für diagnostische Zwecke bzw. für die diagnostische Routine also zu niedrig. Die Empfindlichkeit kann aber durch unterschiedliche Parameter verbessert werden. Das kann durch den Einsatz einer

PCR im LightCycler™ mit einer Zyklenzahl von ca. 55 bis 65 Runden erfolgen, oder durch ein zusätzliches in der Diagnostik verwendetes universelles Primerpaar, das unter Umständen auch in diesem Primer-Mix empfindlicher ist. Weiterhin könnte vor der Genotypisierungs-PCR eine ca. 10 bis 20 Zyklen langen Ganzgenom PCR durchgeführt werden (Naumann et al., 1993; Günther et al., 1995). Dies führt zu der Empfindlichkeit einer nested PCR. Zusätzlich wird die Wahrscheinlichkeit einer Kontamination der PCR aber wesentlich erhöht (Elnifro et al., 2000).

Verbesserungswürdig sind die Genotyp-spezifischen Primer für den Genotypen C des Hepatitis B Virus. Die Nachweisempfindlichkeit speziell diesem Genotyp gegenüber war niedriger als gegenüber allen anderen Genotypen in der beschriebenen Multiplex-PCR. Der HBV-Genotyp C konnte nur bis  $10^5$  GE/ml nachgewiesen werden. Mögliche Gründe dafür sind, daß die Sequenz im Primerbereich nicht perfekt konserviert war und die Primer eine zu hohe Länge (Abb. 4.3) hatten. Ein weiterer Nachteil der Primer des HBV-Genotyps C war, daß das Amplifikat mit der Bande von 702 bp (Genotyp C) schlecht von dem Amplifikat mit der Bande von 834 bp (Genotyp E) unterschieden werden konnte. Demzufolge werden in folgenden Arbeiten andere Primersätze für den Genotypen C ausgesucht und getestet.

## **5.2 Ist dieses Multiplex-PCR Protokoll besser als andere Methoden?**

Die hier vorgestellte Methode der Multiplex-PCR soll in einem Vergleich mit weiteren bekannten HBV-Typisierungsmethoden betrachtet werden. Im klinischen Alltag ist Handhabung, Durchführung, Aussagekraft und die Schnelligkeit der Methode wichtig. Die Methode der HBV-Typisierung durch Antikörper zeigt Mängel auf in der Durchführung und der Differenzierung. Zuerst sind die einzelnen Antikörper nicht kommerziell in dem Maßstab erhältlich wie es für z.B. eine diagnostische Routine nötig wäre. Weiterhin besteht die Schwierigkeit in der Differenzierung der Genotypen A, B und G, welche alle den Subtypen adw2 besitzen (Schaefer, 2001). Hier könnte auf andere serologische Typisierungsverfahren zurückgegriffen werden, die mit Antisera arbeiten, die gegen den präS-Bereich generiert wurden. Hier besteht aber das Problem, daß dieses Verfahren auf mAK beruht, die nur einer japanischen

Arbeitsgruppe zur Verfügung stehen (Usuda et al., 2000; Usuda et al., 1999). Somit ist die Aussagekraft bezüglich der Genotypen begrenzt.

Eine andere Methode, die für die Genotypisierung von HBV in Betracht kommt, ist die Sequenzierung. Der Vorteil der Sequenzierung liegt in den zusätzlich aus der Sequenz interpretierbaren Informationen. Die untersuchte Probe ist eindeutig in die eine oder andere Gruppe der HBV-Genotypen einzuordnen. Ein weiterer Vorteil ist, daß auffällige Austausche in den sequenzierten Abschnitten die eindeutige Zuordnung zu Infektionsketten erleichtern können (Dumpis et al., 2001; Oon et al., 2000; Schories et al., 2000; Schüttler et al., 2000). Ein wesentlicher Nachteil ist aber der Zeitaufwand. Im Vergleich mit der Multiplex-PCR verliert man bei einer großen Probenanzahl viel Zeit. In der Regel wird ein PCR-Produkt sequenziert. Selbst unter optimalen Bedingungen vergeht knapp ein Arbeitstag mehr als bei der Multiplex-PCR bis das PCR-Produkt für die Sequenzierung aufgereinigt wurde, sequenziert und die Sequenz mit entsprechenden Programmen analysiert wurde (Costa et al., 2000). Relativ häufig ergibt die Sequenzierung von PCR-Produkten Sequenzen, die im Strang und Gegenstrang nicht übereinstimmen, so daß erneut amplifiziert werden muß. Der höhere Informationsgehalt der HBV-Genotypisierung durch Sequenzieren wird also durch einen erhöhten absoluten Zeitbedarf, eine erhöhte zeitliche Belastung qualifizierten Personals und erhebliche Mehrkosten erkauft. Diese Zeit- und Kostenersparnis macht die Multiplex Methode für eine diagnostische oder epidemiologische Fragestellung interessant.

Die hier vorgestellte Multiplex-PCR stellt eine Verbesserung der publizierten Methode von Repp et al. und Naito et al. dar (Naito et al., 2001; Repp et al., 1993). Bei Repp et al. wurden in einem Multiprimer-PCR Protokoll mit zwei Runden die zum damaligen Zeitpunkt bekannten Genotypen bestimmt. Bei dieser Methode liegen die Banden aber zu dicht beieinander und es wurden nur fünf von sieben Genotypen erkannt (Kap. 4.1). Dadurch ist eine eindeutige Zuordnung nicht möglich. Eine ähnliche Methode wurde von Naito et al. verwendet, die im Prinzip eine schnelle und einfache Durchführung der Typisierung der HBV-Genotypen zuläßt, aber durch das Fehlen eines HBV-Primers, der den Genotypen G nachweisen kann, ist diese Methode nur unvollständig. Zusätzlich kommt in dieser Methode ein weiterer Schritt vor, der in der hier beschriebenen Multiplex-PCR vereinfacht werden konnte. Um die sechs Genotypen zu differenzieren hat Naito et al. mit zwei Primeransätzen gearbeitet. Der erste Ansatz kann die HBV-Genotypen A, B und C diskriminieren, der

zweite die HBV-Genotypen D, E und F. Dadurch muss eine Probe immer in zwei Ansätzen untersucht werden. Im Vergleich dazu ist die vorgestellte Multiplex-PCR in der Lage die bekannten sieben Genotypen in einem Ansatz mit den sieben Primerpaaren zu bestimmen.

Nach der neueren Arbeit von Kato et al., der einen Primersatz aus der präC-Region des HBV-Genoms und mehreren Isolaten des HBV- Genotyps G gewählt hat, ist es prinzipiell möglich den Genotyp G zu diskriminieren (Kato et al., 2001). In der vorliegenden Arbeit wurde - ohne Kenntnis der bei der Primerauswahl noch nicht publizierten Daten von Kato et al., 2001- aus derselben Region ein Primersatz etabliert, der den Genotypen spezifisch erkennt. Allerdings stand hierfür nur die Sequenz eines Isolats zur Verfügung. Obwohl der Genotyp G des HBV epidemiologisch noch weitgehend unbekannt ist und keine Positivkontrollen zum Zeitpunkt der Fertigstellung der Arbeit vorlagen, aber für beide Arbeiten eine ähnliche Region für die Primer gewählt wurde, ist es sehr wahrscheinlich, daß der Primeransatz in der Lage sein sollte, auch den HBV-Genotypen G zu diskriminieren.

Abschließend soll eine vierte Methode, die den Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP) betrifft, angeschaut werden. Diese Methode ist zu umständlich und zu zeitintensiv, um sie in einer diagnostischen Routine einzusetzen. Bei dem Einsatz der RFLP wird zuerst durch eine PCR ein Amplifikat hergestellt, welches anschließend gereinigt und danach mit Restriktions-Nukleasen verdaut wird (Lin et al., 1991; Shih et al., 1991). Das daraus resultierende Bandenmuster kann unter Umständen so komplex sein, daß eine einfache und schnelle Zuordnung zu den HBV-Genotypen nicht möglich ist. Es ist auch vorstellbar, daß durch einen Austausch einer Nukleotidsequenz ein spezifischer Verdau durch eine Restriktions-Nuklease nicht mehr möglich ist. Die Multiplex-PCR zeigt auch hier ihre Überlegenheit in der Einfachheit, der Schnelligkeit und der Aussagekraft in der HBV-Genotypisierung.

Zusammenfassend ist die Multiplex-PCR in der Lage mit den hier verglichenen Methoden in bestimmten Anwendungsgebieten in punkto Handhabung, Durchführung und Differenzierung mitzuhalten, wenn nicht sogar sie zu übertreffen.

### 5.3 Ausblick

Mit der hier vorgestellten Methode der Multiplex-PCR kann einfach und schnell eine HBV-Genotypisierung durchgeführt werden. Dabei spielt es keine Rolle ob es sich nur um wenige oder mehrere hundert Proben handelt. Die Schnelligkeit und leichte Handhabung machen den Einsatz mit riesigen Fallzahlen möglich. Auch ist es sehr interessant zu erfahren, ob sich die Genotypen von chronisch infizierten Patienten im Verlauf ihrer Krankheit verändern (Friedt et al., 1999; Gerner et al., 1998).

Ein weiterer Aspekt für die routinemäßige Anwendung der Methode ist die Untersuchung von Lamivudin behandelten Patienten (Nafa et al., 2000; Petry et al., 2000). In der BRD sind die HBV-Genotypen A und D sehr häufig, unterscheiden sich aber darin, daß unter der Therapie mit Lamivudin der Genotyp A viel schneller resistent wird als der Genotyp D (Papatheodoridis und Hadziyannis, 2001; Zöllner et al., 2001; Norder et al., 1992). Aus diesem Grunde sollte vor der Therapie genotypisiert werden und gegebenenfalls die Patienten mit dem HBV-Genotypen A häufiger auf Resistenz und HBV-Serumkonzentration unter der Therapie getestet werden als Patienten mit dem HBV-Genotypen D. In Japan hingegen ist der HBV-Genotyp C sehr häufig und hier wurde von Ogata et al. berichtet, dass es in dieser Gruppe zu einer erhöhten Rate an Resistenzen unter Lamivudin behandelten chronisch-infizierten HBV-Patienten gekommen ist (Ogata et al., 1999). Daher erscheint auch hier eine regelmäßige Kontrolle auf Resistenz und HBV-Serumkonzentration vor und unter Therapie sinnvoll.

## 5.4 Zusammenfassung

Das Ziel der Arbeit war es eine einfache und zeitsparende Methode zu etablieren, die in der Lage war, die heute bekannten sieben Genotypen des Hepatitis B Virus zu erkennen. Zu Beginn der Arbeit wurde versucht eine publizierte Methode zu verbessern. Bei der verwendeten Multiplex-PCR wurden die HBV-Genotypen A, C, D und F diskriminiert. Nach unveröffentlichten Ergebnissen sollte auch noch der Genotyp E erkannt werden. Um diese Multiplex-PCR zu verbessern, wurde ein spezifischer Primer für den Genotypen B getestet. Zwar gelang der spezifische Nachweis eines Genotyp-B-Isolates wodurch alle zum damaligen Zeitpunkt bekannten Genotypen A-F in einer Multiplex-PCR nachweisbar waren; aber die Methode erwies sich für die Routinediagnostik als zu störungsanfällig.

Deshalb wurde mit einem etwas anderen methodischen Ansatz eine neue Multiplex-PCR entwickelt, die in einem Reaktionsansatz die heute gängigen sieben HBV-Genotypen zu differenzieren vermochte. Mit Hilfe verschiedener Computerprogramme wurden sieben Primerpaare entwickelt, die die gleiche vorhergesagte Annealingtemperatur aufwiesen. In umfangreichen Experimenten wurden dann die verschiedenen Parameter wie Annealing- und Elongationstemperaturen, Zykluszeiten, verschiedene Thermocycler sowie verschiedene hitzestabile Polymerasen optimiert. Unter den gefundenen Bedingungen erwies sich die Multiplex-PCR als hochspezifisch. Eine Genotypisierung gelang nicht nur mit HBV-DNA haltigen Plasmiden, sondern auch in einer kleinen Auswahl von Patientenseren mit durch Sequenzierung bekanntem Genotyp. Auch die Empfindlichkeit des System war mit  $10^3$ - $10^4$  Genomäquivalenten pro ml befriedigend.

Nunmehr steht ein System zur Verfügung, welches seinem Ziel - der einfachen und schnellen HBV-Genotypisierung – gerecht wird.

## 6 Abkürzungen

Die unten aufgeführten Abkürzungen, alphabetisch geordnet, wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet.

A	Adenin
Abb.	Abbildung
as	antisense
B	Cytosin und Guanin und Thymin
bp	Basenpaar(e)
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
cccDNA	kovalent geschlossene zirkuläre DNA (covalently closed circular DNA)
D	Adenin und Guanin und Thymin
dATP	Desoxyadenosin-5`-phosphat
dCTP	Desoxycytosin-5`-phosphat
dGTP	Desoxyguanidin-5`-phosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid-5`-phosphat
DR	Direct Repeat (1 & 2)
dTTP	Desoxythymidin-5`-triphosphat
et al.	et alia (und andere)
evtl.	eventuell
G	Guanin
g	Gramm
GE	Genomäquivalente
H	Adenin und Cytosin und Thymin
h	Stunde(n)
HBV	Hepatitis B Virus
HBcAg	Hepatitis B Core-Antigen (Hepatitis B Core-Protein)
HBsAg	Hepatitis B Surface-Antigen (Hepatitis B Surface-Protein)
HBeAg	Hepatitis B e-Antigen

---

HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HBx	Hepatitis B Virus X-Protein
K	Guanin und Thymin
k	kilo ( $10^3$ )
kb	Kilobasenpaare
l	Liter
LHBs	Large Hepatitis B Virus Surface-Antigen
M	Adenin und Cytosin
m	milli ( $10^{-3}$ )
MHBs	Middle Hepatitis B Surface-Antigen
Min.	Minute(n)
mRNA	messenger-RNA
$\mu$	mikro ( $10^{-6}$ )
N	Adenin und Cytosin und Guanin und Thymin
NIBSC	National Institute for Biological Standards & Control
nm	Nanometer
nt	Nukleotide
p.A.	per analysi (Reinheitsgrad)
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PK	Proteinkinase
Pri	Primase
R	Adenin und Guanin
resp.	respektive
RNA	Ribonukleinsäure
RT	reverse Transkriptase
Upm	Umdrehungen pro Minute
S	Cytosin und Guanin
s	sense
SHBs	Small Hepatitis B Virus Surface-Antigen
SoGAT	Standardization of Gene Amplification Techniques (for the Virological Safety Testing of Blood and Blood Products)
T	Thymin
$T_m$	Schmelztemperatur

---

TAE	Tris/Acetat/EDTA
U	Unit(s), Enzymeinheiten
u.U.	unter Umständen
UV	Ultraviolett (-es Licht)
V	Adenin und Cytosin und Guanin
w/v	Gewicht pro Volumen
W	Adenin und Thymin
WHO	World Health Organization
Y	Cytosin und Thymin
z.B.	zum Beispiel

## 7 Literaturverzeichnis

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

Andre, F. (2000). Hepatitis B epidemiology in Asia, the Middle East and Africa, *Vaccine 18 Suppl 1*, S20-2.

Beasley, R. P., Lin, C. C., Chien, C. S., Chen, C. J., and Hwang, L. Y. (1982). Geographic distribution of HBsAg carriers in China, *Hepatology* 2, 553-6.

Birnboim, H. C., und Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA, *Nucleic Acids Res* 7, 1513-23.

Blum, H. E. (1998). [Virale Hepatitis: Molekulare Diagnostik], *Schweiz Rundsch Med Prax* 87, 1381-8.

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

Bréchet, C., Gozuacik, D., Murakami, Y., und Paterlini-Bréchet, P. (2000). Molecular bases for the development of hepatitis B virus (HBV)-related hepatocellular carcinoma (HCC), *Semin Cancer Biol* 10, 211-31.

Brechtbuehl, K., Whalley, S. A., Dusheiko, G. M., und Saunders, N. A. (2001). A rapid real-time quantitative polymerase chain reaction for hepatitis B virus, *J Virol Methods* 93, 105-13.

Breslauer, K. J., Frank, R., Blocker, H., und Marky, L. A. (1986). Predicting DNA duplex stability from the base sequence, *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 3746-50.

Carman, W. F., Zanetti, A. R., Karayiannis, P., Waters, J., Manzillo, G., Tanzi, E., Zuckerman, A. J., und Thomas, H. C. (1990). Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus, *Lancet* 336, 325-9.

- Caspari, G., und Gerlich, W. H. (1998). Mandatory hepatitis B virus testing for doctors, *Lancet* 352, 991.
- Cha, R. S., und Thilly, W. G. (1993). Specificity, efficiency, and fidelity of PCR, *PCR Methods Appl* 3, S18-29.
- Chisari, F. V., und Ferrari, C. (1995). Hepatitis B virus immunopathology, *Springer Semin Immunopathol* 17, 261-81.
- Chou, Q., Russell, M., Birch, D. E., Raymond, J., und Bloch, W. (1992). Prevention of pre-PCR mis-priming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications, *Nucleic Acids Res* 20, 1717-23.
- Conway, J. F., Cheng, N., Zlotnick, A., Wingfield, P. T., Stahl, S. J., und Steven, A. C. (1997). Visualization of a 4-helix bundle in the hepatitis B virus capsid by cryo-electron microscopy, *Nature* 386, 91-4.
- Costa, J. M., Ernault, P., Vidaud, D., Vidaud, M., Meyer, D., und Lavergne, J. M. (2000). Fast and efficient mutation detection method using multiplex PCR and cycle sequencing--application to haemophilia B, *Thromb Haemost* 83, 244-7.
- Courouce-Pauty, A. M., Plancon, A., und Soulier, J. P. (1983). Distribution of HBsAg subtypes in the world, *Vox Sang* 44, 197-211.
- Dane, D. S., Cameron, C. H., und Briggs, M. (1970). Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen- associated hepatitis, *Lancet* 1, 695-8.
- Dumpis, U., Holmes, E. C., Mendy, M., Hill, A., Thursz, M., Hall, A., Whittle, H., und Karayiannis, P. (2001). Transmission of hepatitis B virus infection in Gambian families revealed by phylogenetic analysis, *J Hepatol* 35, 99-104.
- Elnifro, E. M., Ashshi, A. M., Cooper, R. J., und Klapper, P. E. (2000). Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology, *Clin Microbiol Rev* 13, 559-70.
- Friedt, M., Gerner, P., Lausch, E., Trubel, H., Zabel, B., und Wirth, S. (1999). Mutations in the basic core promotor and the precore region of hepatitis B virus and their selection in children with fulminant and chronic hepatitis B, *Hepatology* 29, 1252-8.

Galibert, F., Mandart, E., Fitoussi, F., Tiollais, P., und Charnay, P. (1979). Nucleotide sequence of the hepatitis B virus genome (subtype ayw) cloned in *E. coli*, *Nature* 281, 646-50.

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

Gerner, P. R., Friedt, M., Oettinger, R., Lausch, E., und Wirth, S. (1998). The hepatitis B virus seroconversion to anti-HBe is frequently associated with HBV genotype changes and selection of preS2-defective particles in chronically infected children, *Virology* 245, 163-72.

Günther, S., Li, B. C., Miska, S., Krüger, D. H., Meisel, H., und Will, H. (1995). A novel method for efficient amplification of whole hepatitis B virus genomes permits rapid functional analysis and reveals deletion mutants in immunosuppressed patients, *J Virol* 69, 5437-44.

Harbarth, S., Szucs, T., Berger, K., und Jilg, W. (2000). The economic burden of hepatitis B in Germany, *Eur J Epidemiol* 16, 173-7.

Heermann, K. H., Gerlich, W. H., Chudy, M., Schaefer, S., und Thomssen, R. (1999). Quantitative detection of hepatitis B virus DNA in two international reference plasma preparations. Eurohep Pathobiology Group, *J Clin Microbiol* 37, 68-73.

Henegariu, O., Heerema, N. A., Dlouhy, S. R., Vance, G. H., und Vogt, P. H. (1997). Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol, *Biotechniques* 23, 504-11.

Hruska, J. F., Clayton, D. A., Rubenstein, J. L., und Robinson, W. S. (1977). Structure of hepatitis B Dane particle DNA before and after the Dane particle DNA polymerase reaction, *J Virol* 21, 666-72.

Jursch, C. A. (2000) Größenbestimmung von Viren in menschlichem Blutplasma durch Ausschlußchromatographie, Inaugural-Dissertation, Justus-Liebig-Universität, Gießen.

Kane, M. A. (1998). [World-wide epidemiology of hepatitis B], *Soz Praventivmed* 43, S24-6, S98-100.

Kaneko, S., und Miller, R. H. (1990). Characterization of primers for optimal amplification of hepatitis B virus DNA in the polymerase chain reaction assay, *J Virol Methods* 29, 225-9.

Kann, M., und Gerlich, W. H. (1998). Hepatitis B. In *Virology*, B. W. J. Mahy, and L. Collier, eds. (London, Sydney, Auckland, Arnold), pp. 745-773.

Kao, J. H., Chen, P. J., Lai, M. Y., und Chen, D. S. (2000a). Hepatitis B genotypes correlate with clinical outcomes in patients with chronic hepatitis B, *Gastroenterology* 118, 554-9.

Kao, J. H., Wu, N. H., Chen, P. J., Lai, M. Y., und Chen, D. S. (2000b). Hepatitis B genotypes and the response to interferon therapy, *J Hepatol* 33, 998-1002.

Kato, H., Orito, E., Sugauchi, F., Ueda, R., Gish, R. G., Usuda, S., Miyakawa, Y., and Mizokami, M. (2001). Determination of hepatitis B virus genotype G by polymerase chain reaction with hemi-nested primers, *J Virol Methods* 98, 153-9.

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

Lin, Z., Kato, A., Kudou, Y., und Ueda, S. (1991). A new typing method for the avian infectious bronchitis virus using polymerase chain reaction and restriction enzyme fragment length polymorphism, *Arch Virol* 116, 19-31.

Lindh, M., Hannoun, C., Dhillon, A. P., Norkrans, G., und Horal, P. (1999). Core promoter mutations and genotypes in relation to viral replication and liver damage in East Asian hepatitis B virus carriers, *J Infect Dis* 179, 775-82.

Maddrey, W. C. (2000). Hepatitis B: an important public health issue, *J Med Virol* 61, 362-6.

Magdzik, W. W. (2000). Hepatitis B epidemiology in Poland, Central and Eastern Europe and the newly independent states, *Vaccine* 18 Suppl 1, S13-6.

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

Molnar-Kimber, K. L., Summers, J. W., und Mason, W. S. (1984). Mapping of the cohesive overlap of duck hepatitis B virus DNA and of the site of initiation of reverse transcription, *J Virol* 51, 181-91.

Moretti, T., Koons, B., und Budowle, B. (1998). Enhancement of PCR amplification yield and specificity using AmpliTaq Gold DNA polymerase, *Biotechniques* 25, 716-22.

Mullis, K. B., und Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction, *Methods Enzymol* 155, 335-50.

Murakami, S. (1999). [Expression and function of hepatitis B virus (HBV) X protein], *Seikagaku* 71, 1309-26.

Nafa, S., Ahmed, S., Tavan, D., Pichoud, C., Berby, F., Stuyver, L., Johnson, M., Merle, P., Abidi, H., Trepo, C., und Zoulim, F. (2000). Early detection of viral resistance by determination of hepatitis B virus polymerase mutations in patients treated by lamivudine for chronic hepatitis B, *Hepatology* 32, 1078-88.

Naito, H., Hayashi, S., und Abe, K. (2001). Rapid and specific genotyping system for hepatitis B virus corresponding to six major genotypes by PCR using type-specific primers, *J Clin Microbiol* 39, 362-4.

Naumann, H., Schaefer, S., Yoshida, C. F., Gaspar, A. M., Repp, R., und Gerlich, W. H. (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.

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

Norder, H., Hammas, B., Lofdahl, S., Courouce, A. M., und Magnius, L. O. (1992). Comparison of the amino acid sequences of nine different serotypes of hepatitis B

surface antigen and genomic classification of the corresponding hepatitis B virus strains, *J Gen Virol* 73, 1201-8.

Ogata, N., Fujii, K., Takigawa, S., Nomoto, M., Ichida, T., und Asakura, H. (1999). Novel patterns of amino acid mutations in the hepatitis B virus polymerase in association with resistance to lamivudine therapy in Japanese patients with chronic hepatitis B, *J Med Virol* 59, 270-6.

Okamoto, H., Tsuda, F., Sakugawa, H., Sastrosoewignjo, R. I., 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.

Oon, C. J., Chen, W. N., Goo, K. S., und Goh, K. T. (2000). Intra-familial evidence of horizontal transmission of hepatitis B virus surface antigen mutant G145R, *J Infect* 41, 260-4.

Papatheodoridis, G. V., und Hadziyannis, S. J. (2001). Diagnosis and management of pre-core mutant chronic hepatitis B, *J Viral Hepat* 8, 311-21.

Petry, W., Erhardt, A., Heintges, T., und Häussinger, D. (2000). [Neue Entwicklungen in der Therapie der chronischen Hepatitis B. Wann sind Nukleosidanaloga indiziert?], *Z Gastroenterol* 38, 77-87.

Pinol Aguade, J., und Mascaro, J. M. (1971). [2 cases of Gianotti-Crosti syndrome with positive Australian antigen], *Actas Dermosifiliogr* 62, 95-104.

Pult, I., Chouard, T., Wieland, S., Klemenz, R., Yaniv, M., und Blum, H. E. (1997). A hepatitis B virus mutant with a new hepatocyte nuclear factor 1 binding site emerging in transplant-transmitted fulminant hepatitis B, *Hepatology* 25, 1507-15.

Repp, R., Rhiel, S., Heermann, K. H., Schaefer, S., Keller, C., Ndumbe, P., Lampert, F., und Gerlich, W. H. (1993). Genotyping by multiplex polymerase chain reaction for detection of endemic hepatitis B virus transmission, *J Clin Microbiol* 31, 1095-102.

Robertson, J. M., und Walsh-Weller, J. (1998). An introduction to PCR primer design and optimization of amplification reactions, *Methods Mol Biol* 98, 121-54.

Robertson, J. S. (1998). International standardization of gene amplification technology, *Biologicals* 26, 111-3.

Sattler, F., und Robinson, W. S. (1979). Hepatitis B viral DNA molecules have cohesive ends, *J Virol* 32, 226-33.

Schaefer, S. (2001). Hepatitis B Virus in Experimental Carcinogenesis. In *Viruses, cell transformation and cancer.*, R. J. A. Grand, ed. (Greenwich, Elsevier, Amsterdam), pp. 193- 228.

Schories, M., Peters, T., und Rasenack, J. (2000). Isolation, characterization and biological significance of hepatitis B virus mutants from serum of a patient with immunologically negative HBV infection, *J Hepatol* 33, 799-811.

Schuster, R., Gerlich, W. H., 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.

Schüttler, C. G., Caspari, G., Jursch, C. A., Willems, W. R., Gerlich, W. H., und Schaefer, S. (2000). Hepatitis C virus transmission by a blood donation negative in nucleic acid amplification tests for viral RNA, *Lancet* 355, 41-2.

Seeger, C., Ganem, D., und Varmus, H. E. (1986). Biochemical and genetic evidence for the hepatitis B virus replication strategy, *Science* 232, 477-84.

Shih, J. W., Cheung, L. C., Alter, H. J., Lee, L. M., und Gu, J. R. (1991). Strain analysis of hepatitis B virus on the basis of restriction endonuclease analysis of polymerase chain reaction products, *J Clin Microbiol* 29, 1640-4.

Shuber, A. P., Grondin, V. J., und Klinger, K. W. (1995). A simplified procedure for developing multiplex PCRs, *Genome Res* 5, 488-93.

Sninsky, J. J., Siddiqui, A., Robinson, W. S., und Cohen, S. N. (1979). Cloning and endonuclease mapping of the hepatitis B viral genome, *Nature* 279, 346-8.

Stuyver, L., De Gendt, S., Van Geyt, C., Zoulim, F., Fried, M., Schinazi, R. F., und Rossau, R. (2000). A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness, *J Gen Virol* 81 Pt 1, 67-74.

Tanaka, J. (2000). Hepatitis B epidemiology in Latin America, *Vaccine 18 Suppl 1*, S17-9.

Tiollais, P., Charnay, P., und Vyas, G. N. (1981). Biology of hepatitis B virus, *Science 213*, 406-11.

Toda, G. (1999). [Gianotti-Crosti syndrome and Gianotti disease], *Ryoikibetsu Shokogun Shirizu (24)*, 137-40.

Uchida, T., Gotoh, K., und Shikata, T. (1995). Complete nucleotide sequences and the characteristics of two hepatitis B virus mutants causing serologically negative acute or chronic hepatitis B, *J Med Virol 45*, 247-52.

Usuda, S., Okamoto, H., Iwanari, H., Baba, K., Tsuda, F., Miyakawa, Y., und Mayumi, M. (1999). Serological detection of hepatitis B virus genotypes by ELISA with monoclonal antibodies to type-specific epitopes in the preS2-region product, *J Virol Methods 80*, 97-112.

Usuda, S., Okamoto, H., Tanaka, T., Kidd-Ljunggren, K., Holland, P. V., Miyakawa, Y., und Mayumi, M. (2000). Differentiation of hepatitis B virus genotypes D and E by ELISA using monoclonal antibodies to epitopes on the preS2-region product, *J Virol Methods 87*, 81-9.

Verschoor, E. J., Warren, K. S., Langenhuijzen, S., Heriyanto, Swan, R. A., und Heeney, J. L. (2001). Analysis of two genomic variants of orang-utan hepadnavirus and their relationship to other primate hepatitis B-like viruses, *J Gen Virol 82*, 893-7.

Wittwer, C. T., und Garling, D. J. (1991). Rapid cycle DNA amplification: time and temperature optimization, *Biotechniques 10*, 76-83.

Wu, D. Y., Ugozzoli, L., Pal, B. K., Qian, J., und Wallace, R. B. (1991). The effect of temperature and oligonucleotide primer length on the specificity and efficiency of amplification by the polymerase chain reaction, *DNA Cell Biol 10*, 233-8.

Zöllner, B., Petersen, J., Schroter, M., Laufs, R., Schoder, V., und Feucht, H. H. (2001). 20-fold increase in risk of lamivudine resistance in hepatitis B virus subtype adw, *Lancet 357*, 934-5.

## 8 Lebenslauf

Oliver Kirschberg, Dipl.-Biol.

geb. am 17.03.1973 in Herten i. Westf.

Vater: Gerhard Kirschberg, Dipl.-Ing.

Mutter: Gerda Kirschberg, geb. Pessarra

1979-1992 Schulausbildung Grundschule am Wilhelmsplatz Herten  
Städtisches Gymnasium Herten

1992 Abitur

1992-1993 Grundwehrdienst beim Wachbataillon des Bundesministeriums für  
Verteidigung in Siegburg

Okt. 1993 Studium der Biologie, Justus-Liebig Universität, Gießen

April 1995 Studium der Humanmedizin, Justus-Liebig Universität, Gießen

April 1996 Diplom-Vorprüfung in Biologie

April 1997 Ärztliche Vorprüfung

April 1998 Erstes Medizinisches Staatsexamen

Dez. 1998 Diplom-Hauptprüfung in Biologie

Dez. 1998-April 2000 Anfertigung der Biologie-Diplomarbeit am Institut für  
Medizinische Virologie der JLU

April 2000 Zweites Medizinisches Staatsexamen

Mai 2000 Medizinisches Praktisches Jahr am Universitätsklinikum der JLU, sowie  
am Klinikum Wetzlar-Braunfels  
(Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin, Zentrum für Innere  
Medizin, Allgemein- und Unfallchirurgie)

Mai 2001 Drittes Medizinisches Staatsexamen

Okt. 2001 AiP an der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf, Klinik für  
Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie

## **Akademische Arbeiten**

Biologische Diplomarbeit (April 2000), angefertigt am Institut für Medizinische Virologie des Fachbereichs Humanmedizin und am Institut für Genetik des Fachbereichs Biologie der Justus-Liebig Universität, Gießen, unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. W. H. Gerlich. Titel: „Untersuchungen zur Wirkung des Hepatitis B Virus auf Leukozytenlinien in vitro“.

Publikationen in Vorbereitung:

An easy method to identify the recent seven genotypes of HBV – The Multiplex-PCR. (Kirschberg O., Schaefer S.) Experimente abgeschlossen.

The appearance of an Multiplex-PCR in the daily diagnostic of genotyping hepatitis B viruses – is it sensitive enough? (Kirschberg O., Schaefer S., Erhardt A., Gerlich W.H., Häussinger D.), Experimente abgeschlossen, Autorenliste vorläufig.

## 9 Danksagung

Herrn Prof. Dr. W. H. Gerlich danke ich für die Unterstützung dieser Arbeit.

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. S. Schaefer danke ich besonders für die stetige und vertrauensvolle Unterstützung der praktischen und theoretischen Arbeit, seiner kontinuierlichen Hilfsbereitschaft, der wissenschaftlichen und nicht-wissenschaftlichen Gesprächsbereitschaft in weiten Bereichen der Virologie, sowie auch im Leben. Durch seine hilfreichen Aufmunterungen bin ich den Weg - eine optimale Genotypisierungsmethode für das Hepatitis B Virus zu finden - bis zum Schluß gegangen.

Gedankt sei an dieser Stelle auch dem wundervollen Team, in dem ich arbeiten durfte. Dabei möchte ich mich vor allem bei Frau Dr. T. Tolle, Herrn Dr. R. Schuster, Frau Dr. N. Fiedler, Herrn Dr. C. Schüttler, Frau Dipl.-Biol. K. Schmidt, sowie allen anderen hier nicht namentlich erwähnten Mitarbeitern bedanken.

Vielen Dank an alle Freunde, die mich während meines Studiums in Gießen begleitet, mich unterstützt und in der Zeit meiner Arbeit ertragen haben.

Zum Schluss möchte ich meinen ganz besonderen Dank meinen Eltern G. und G. Kirschberg aussprechen, die mich über alle Bereiche hinweg, sei es beruflich, wissenschaftlich oder privat, vollkommen unterstützt und mich gefördert haben. Dies war sicherlich nicht immer einfach. Danke.