

Aus der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie
an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Prof. Dr. D. Häussinger

**Der Einfluß von X-Gen und X-Promotor des Hepatitis B Virus
auf Klinik und Interferon-Therapie bei chronisch-replikativer
HBe-Antigen negativer Hepatitis B**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von

Ulf Reineke

2006

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. B. Nürnberg
Dekan

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. A. Erhardt

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. med. O. Adams

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
1.1 Bedeutung der Hepatitis B Virus Infektion	1
1.2 Infektion und Infektionsverlauf	1
1.3 Therapie der chronischen HBV-Infektion	2
1.3.1 Wirkung von Interferonen	3
1.3.2 Dauer und Dosierung von Interferon	3
1.3.3 Interferontherapie der chronischen, HBeAg-positiven Hepatitis B	4
1.3.4 Interferontherapie der chronischen, HBeAg-negativen Hepatitis B	4
1.4 Struktur und Genomorganisation des HBV	4
1.4.1 Das Präcore/Core Gen – Organisation und Funktion	7
1.4.2 Das X-Gen – Organisation und Funktion	9
1.4.2.1 Das X-Gen als Transaktivator	9
1.4.2.2 Das X-Gen als Serin Protease Inhibitor	10
1.4.2.3 Das X-Gen und Hepatokarzinogenese	10
1.4.2.4 Das X-Gen und virale Replikation	11
1.4.2.5 Funktionelle Strukturen im X-Gen	13
1.4.3 Der X-Promotor - Organisation und Funktion	15
1.5 Replikation des HBV	16
1.6 HBV-Mutanten	17
1.6.1 S-Gen-Mutanten	17
1.6.2 P-Gen-Mutanten	18
1.6.3 Präcore/Core Mutanten	18
1.6.4.X-Gen-Mutanten	20
1.7 Zielsetzung der Arbeit	22
2. Material und Methoden	23
2.1 Patienten	23
2.2 DNA-Extraktion	24
2.3 Polymerase Ketten Reation	24
2.3.1 PCR-Komponenten	24
2.3.2 PCR-Bedingungen	27
2.4 Sequenzierung	30
2.4.1 Aufreinigung der PCR-Produkte	30
2.4.2 Sequenzierungs-PCR	30
2.4.3 Fällung und Aufreinigung der Sequenzierungs-PCR-Produkte	31
2.4.4 DNA-Sequenzierungsgel	32
2.5 Sequenzanalyse	34
2.5.1 Sequenzierer	34
2.5.2 Hardware/Software	34
2.6 Quantitativer HBsAg-Assay	35
2.7 Statistik	35
3. Ergebnisse	36

3.1 Klinische Parameter	36
3.1.1 Klinische Parameter: Analyse und Korrelationen	37
3.2 Sequenzen von X-Gen und X-Promotor	39
3.2.1 Sequenzen: Rohdaten	39
3.2.1.1 Sequenzen des X-Gens in der Nukleotidansicht	40
3.2.1.2 Sequenzen des X-Gens in der Aminosäureansicht	50
3.2.1.3 Sequenzen des X-Promotors in der Nukleotidansicht	54
3.2.2 Sequenzen: Analyse und Korrelationen	56
3.2.2.1 Genotypen	56
3.2.2.2 X-Gen	56
3.2.2.3 X-Promotor	59
3.2.2.4 G1896A Stopmutation	60
3.3 Interferon-Therapie	60
3.3.1 Interferon-Therapie: Rohdaten	60
3.3.2 Interferon-Therapie: Analyse und Korrelationen	61
4. Diskussion	64
5. Zusammenfassung	71
6. Literaturverzeichnis	72
Verzeichnis der Abkürzungen	90
Danksagung	93
Lebenslauf	94

1. Einleitung

1.1 Bedeutung der Hepatitis B Virus Infektion

Weltweit gibt es circa 350 Millionen chronische Hepatitis B Virus (HBV)-Träger [152], die ein erhöhtes Risiko für die mögliche Entwicklung von chronisch aktiver Hepatitis (CAH), Leberzirrhose und hepatozellulärem Karzinom (HCC) besitzen [7]. Pro Jahr sterben 1.2 Millionen Menschen weltweit an den Folgen einer HBV-Infektion. Diese ist mit ihren Folgeerkrankungen somit eine der häufigsten Todesursachen der Welt [152]. Pro Jahr werden zur Zeit circa 300000 Fälle von HBV-induziertem HCC weltweit diagnostiziert [152]. Das HBV-assoziierte HCC liegt damit unter den zehn häufigsten Karzinomen weltweit. Die Fünf-Jahres-Überlebensrate der HCC-Patienten liegt im Durchschnitt bei etwa 6% [152]. Mit einer jährlichen Inzidenz von 12/100000 (alte Bundesländer) und einer HBs-Antigen-Träger-Rate von 0.5 [50] zählt die Bundesrepublik Deutschland zu den Ländern mit niedriger Durchseuchung mit dem HBV. Wesentlich höhere Prävalenzen für die HBV-Infektion zwischen 8% und 15% finden sich in Afrika und in Teilen Ostasiens [88].

1.2 Infektion und Infektionsverlauf

HBV wird in den Industrienationen in der Regel auf parenteralem oder sexuellem Wege durch Inokulation mit Blut oder Blutprodukten übertragen. Hochrisikogruppen stellen daher i.v.-Drogenabhängige, Homosexuelle, promiskuitiv lebende Heterosexuelle, Hämophile, Dialyse-Patienten und medizinisches Personal dar [52]. In Ländern mit hoher Prävalenz findet häufig eine vertikale Transmission des HBV statt, die annähernd 25% der chronischen HBV-Verläufe verursacht [88]. Perinatale Infektionen sind dabei etwa zehnmal häufiger vorzufinden als intrauterine [6].

Bei der HBV-Infektion lassen sich unterschiedliche Verlaufsformen abgrenzen. Bei Kindern verläuft die HBV-Infektion meist asymptomatisch, geht jedoch in über 90% der Fälle in einen HBV-Trägerstatus bzw. eine chronische Hepatitis über [88]. Beim Erwachsenen heilen 90% der akuten Hepatitiden folgenlos aus, dagegen gehen etwa 10% in chronische Verläufe über [14, 50].

Die typische Klinik der akuten Hepatitis nach Inkubation von ca. 75 (25-160) Tagen mit Ikterus und Erhöhung der Aminotransferasen zeigen nur ca. 20-30% der Patienten. Fulminante Verläufe treten bei 0.1 bis 1% der Fälle auf. Für die Diagnose einer Hepatitis B ist neben der

Aminotransferasenerhöhung und gegebenenfalls dem Bilirubinanstieg der Nachweis von HBsAg und Anti-HBc-IgM im Serum maßgeblich.

Das klinische Bild bei HBV-Persistenz kann stark variieren. In 70-80% der HBV-Infektionen findet sich der HBsAg-Träger-Status, die **nicht-replikative, chronisch-persistierende Hepatitis B** [7, 14]. Diese Patienten zeigen bei Nachweis von HBsAg meistens keine oder nur geringe Symptome und die Aminotransferasen sind in der Regel im Normbereich. Marker der Virusreplikation wie HBeAg oder HBV-DNA fehlen jedoch [50]. Hier ist das Zirrhoterisiko gering, die HCC-Inzidenz jedoch erhöht [7]. An einer **chronisch-replikativen Hepatitis** erkranken etwa 20-25% der chronisch HBV-Infizierten. Ihre Aminotransferasen sind in der Regel deutlich erhöht und die Marker der Virusreplikation (HBeAg und HBV-DNA) sind nachweisbar. Das Lebergewebe dieser Patienten weist in der Regel entzündliche Veränderungen auf. Neben HBsAg lässt sich auch HBcAg in den Hepatozyten aufzeigen. Diese Verlaufsform der Hepatitis B führt in 20-25% der Patienten zu einer Leberzirrhose, wobei ein mit höherem Lebensalter steigendes Risiko zu verzeichnen ist [77]. Das Risiko einer HCC-Entwicklung dieser Patienten ist etwa 200fach erhöht [7].

Ein Übergang von chronisch-replikativer Hepatitis in eine chronisch-nicht-replikative Hepatitis findet bei etwa 5% der Patienten pro Jahr statt [50]. Ein Verlust des HBsAg lässt sich nur bei ca. 1% der chronischen HBV-Infizierten pro Jahr beobachten.

1.3 Therapie der chronischen HBV-Infektion

Die Indikation der Behandlung der chronischen Hepatitis ergibt sich aus dem Risiko der Entwicklung von Folgeerkrankungen der HBV-Infektion wie Aszites, der hepatischen Enzephalopathie, Leberzirrhose, Ösophagusvarizen und dem hepatozellulären Karzinom (HCC) sowie aus dem Infektionsrisiko weiterer Personen.

Zur Therapie der chronischen Verlaufsformen wurden viele Konzepte entwickelt. Für die klinische Praxis hat sich vor allem der Einsatz von Interferonen (IFN) insbesondere des IFN- α bewährt. Aufgrund der relativ niedrigen Ansprechraten der Standardtherapie von ca. 30-40% und den zum Teil erheblichen Nebenwirkungen von IFN gibt es daher Bemühungen andere Medikamente als Mono-, aber auch als Kombinationstherapeutika zusammen mit Interferon, anzuwenden. Unter diesen befinden sich unter anderem Immunsuppressiva, Immunstimulatoren und direkt antivirale Agenzien. Vor allem die Nukleosidanaloga gelten hier als Alternative.

1.3.1 Wirkung von Interferon

Das Interferon gehört zur Gruppe der Glykoproteine, die den Zytokinen zuzuordnen sind. Es wird von virusinfizierten Körperzellen produziert und sezerniert. Seine Wirkung läuft rezeptorvermittelt ab. Das sezernierte Interferon bildet nach Bindung am Rezeptor einen Interferon-Rezeptor-Komplex, der in die Zelle aufgenommen wird und dort über verschiedene Mechanismen die Interferon-Wirkung vermittelt. Diese sind im wesentlichen:

1. antiviral durch Bildung eines Effektorproteins (2',5'-Oligoadenylatsynthetase) bzw. eines translationsinhibierenden Proteins, das die Translation viraler mRNA behindert, was zu einer Nukleaseninduktion führt.
2. immunmodulatorisch durch Steigerung der HLA Klasse I Expression auf infizierten Hepatozyten, was zu gesteigerter zytotoxischer T-Zell-Reaktion führt.
3. immunstimulatorisch durch Anregung der Zytokinproduktion antigenstimulierter T-Zellen sowie durch gesteigerte Aktivität von Makrophagen und natürlichen Killerzellen [26, 31, 39, 42, 43, 86] .

Interferon vereinigt also einen antiviralen Effekt mit einer Modulation und Stimulation des Immunsystems.

1.3.2 Dauer und Dosierung von Interferon

Empfohlenes Therapieschema für IFN- α bei durchschnittlichem Körpergewicht (70kg) ist die dreimalige, subkutane Applikation von mindestens 5 bis 6 Millionen Einheiten (MU) pro Woche über die Dauer von sechs Monaten [54] . Falls vorher eine HBeAg-Serokonversion eintritt, sollte die IFN-Therapie mindestens zwei Monate über die Serokonversion hinaus fortgeführt werden [54] .

Günstige Voraussetzungen (sogenannte positiv prädiktive Faktoren) für das Ansprechen auf eine IFN-Therapie stellen hohe Aminotransferasen (>200 U/l), niedrige HBV-DNA Titer (<200 pg/ml) [15, 108] , eine Infektionsdauer von weniger als fünf Jahren und eine hohe entzündliche Aktivität in der Leberhistologie dar [54] . Ein weiterer Indikator für den Therapieerfolg ist eine Erstinfektion im Erwachsenenalter [15] .

1.3.3 Interferontherapie der chronischen HBeAg-positiven Hepatitis B

Bei HBeAg-positiven Patienten führt Interferon in ca. 30-40% der Fälle zur Elimination von HBeAg im Gegensatz zu 5 bis 10%, die ohne Therapie konvertieren [53, 102, 108, 139] . Ungefähr 10% der somit erfolgreich behandelten Patienten verlieren nach Therapieende auch das HBsAg und andere Marker der HBV-Infektion [15] .

1.3.4 Interferontherapie der chronischen HBeAg-negativen Hepatitis B

Bei HBeAg-negativen Patienten wurden dauerhafte Ansprechraten auf eine IFN-Therapie zwischen weniger als 10% [16] bis zu 50% [35] beschrieben.

Allgemein gilt, dass die IFN-Therapie der HBe-Ag-negativen Hepatitis mit hohen initialen Ansprechraten gekennzeichnet ist. Jedoch machen hohe Rückfallraten den primären Therapieerfolg zunichte [41] .

Weitere Daten führen zur Empfehlung, diese HBeAg-Minusmutanten nicht nach dem herkömmlichen Therapieschema zu behandeln, sondern mit einer längeren und höher dosierten Gabe von mindestens 5-6 MU IFN- α subkutan dreimal pro Woche über ein Intervall von einem Jahr [54] .

1.4 Struktur und Genomorganisation des HBV

Das Hepatitis B Virus (HBV) wurde mit einer Reihe anderer Viren, die als Charakteristika einen ausgeprägten Hepatotropismus und ein ähnlich organisiertes DNA-Genom aufweisen, zur Familie der Hepadnaviridae (hepatitis associated DNA-viruses) zusammengefasst. Zum Genus der Säugetier-Hepadnaviren gehört das Woodchuck Hepatitis Virus (WHV) des nordamerikanischen Waldmurmeltieres (*Marmota monax*) [133] sowie das Ground Squirrel Hepatitis Virus (GSHV) des Erdhörnchens der nordamerikanischen Westküste (*Spermophilus beecheyi*) [89] . Dagegen werden das Duck Hepatitis B Virus (DHBV) der Pekingerente (*Anas domesticus*) [90] und das Heron Hepatitis B Virus (HHBV) des Graureihers (*Adrea cinerea*) [129] zum Genus der aviären Hepadnaviren gerechnet.

Beim Hepatitis B Virus unterscheidet man sechs Genotypen A bis F. Hierbei handelt es sich um zusammengefasste ähnliche Genome, deren Gruppen über einen Unterschied von mehr als 8% in der Proteinsequenz definiert sind. Ursprünglich wurde die Subtypisierung des HBV

serologisch über unterschiedliche Antigen-Varianten des S-Genes durchgeführt und ergab vier Subtypen. Aus den Genom-Sequenzen lassen sich epidemiologische und phylogenetische Aussagen z.B. über Verbreitung und Infektionsort machen [84, 103]. Genotyp A findet sich dabei vor allem im nord- und mitteleuropäischen Raum, die Genotypen B und C im fernen Osten und Genotyp D vor allem bei Patienten im mediterranen Raum [84]. Die Genotypen E und F scheinen sich dagegen auf Ureinwohner Afrikas und der Neuen Welt zurückführen zu lassen [84].

Das HBV hat eine sphäroidische Gestalt von circa 42 nm Durchmesser ("Dane-Partikel") [30]. Die äußere Proteinhülle wird durch das Hepatitis B Surface Antigen (HBsAg) gebildet. Die innere, ikosaedrische Hülle, als Core-Partikel oder Nukleokapsid (27 nm) bezeichnet, wird dagegen durch das Hepatitis B core Antigen (HBcAg) gebildet [2]. Dieses Nukleokapsid umschließt das virale Genom, das, je nach Genotyp, eine Länge von 3182 bis 3221 Nukleotiden aufweist [140]. Die Zählung der Basen beginnt dabei an der Schnittstelle von EcoRI als Position Null.

Das HBV-Genom liegt in Form einer zirkulären, partiell doppelsträngigen DNA vor [113, 132] und beinhaltet einen kompletten, codierenden Minusstrang und einen unvollständigen, 1000 bis 2500 Basen langen, komplementären Plusstrang [56, 71]. Abbildung 1.4 zeigt die HBV-Genomorganisation.

Im Gegensatz zu Leserastern anderer Viren oder Organismen, die ihre genetische Information in der Regel in linearer Formation und von langen nicht codierenden Abschnitten (Introns) unterbrochen organisieren, überlappen die HBV-Leseraster untereinander. Dies führt dazu, dass das komplette HBV-Genom nicht viel länger ist als sein längstes Leseraster.

Das HBV-Genom besitzt mindestens vier offene Leseraster (open reading frame, ORF, Gene), je eines für die Polymerase (P), das Surface Antigen (S), das Core Antigen (C) und das X-Antigen.

Das Polymerase Gen (ORF P), bestehend aus 832 AA, codiert für die DNA-Polymerase und seine akzessorischen Funktionen, wie Primase, Reverse Transkriptase und RNase H [150]. Das Surface Gen (ORF S) mit den upstream des eigentlichen S-Genes gelegenen Regionen PräS1 und PräS2 enthält die Sequenzen der drei Oberflächenproteine [49], wobei je nach Position des Translationsbeginns unterschiedlich große Produkte gebildet werden können: Large (226 AA), Middle (281 AA) und Small HBsAg (389 AA). Das Präcore/Core Gen (ORF C) beinhaltet die genetische Information für das HBcAg (186 AA) und dessen trunkierte Form, das Hepatitis B e Antigen (HBeAg) (159 AA) [107], dessen Namensherkunft unklar ist [59].

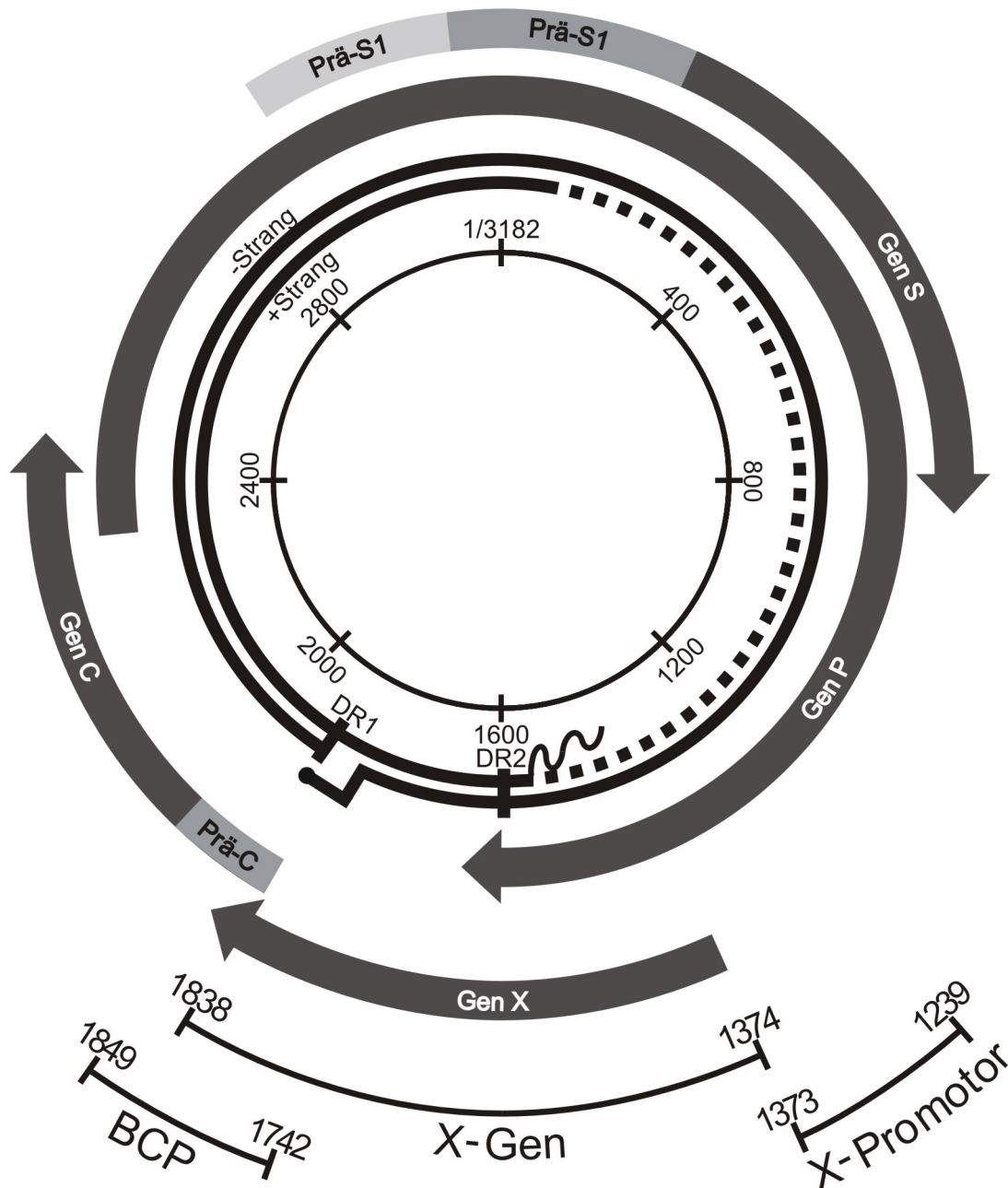


Abbildung 1.4. Die zirkuläre HBV-Genomorganisation und die Position von Basalem Core Promotor (BCP) und X-Promotor im Gesamt-Genom. (Gene=offene Leseraster, P=Polymerase, C=Core, S=Surface, DR1= Direct Repeat 1, DR2=Direct Repeat 2)

Das vierte HBV-Gen, das X-Gen (154 AA), ist noch nicht ausreichend verstanden, was auch sein Name suggerieren soll [59] . Es codiert für das HBxAg und scheint an der Hepatokarzinogenese [51, 122] und der Virusreplikation beteiligt zu sein [24, 158] .

1.4.1 Das Präcore/Core Gen – Organisation und Funktion

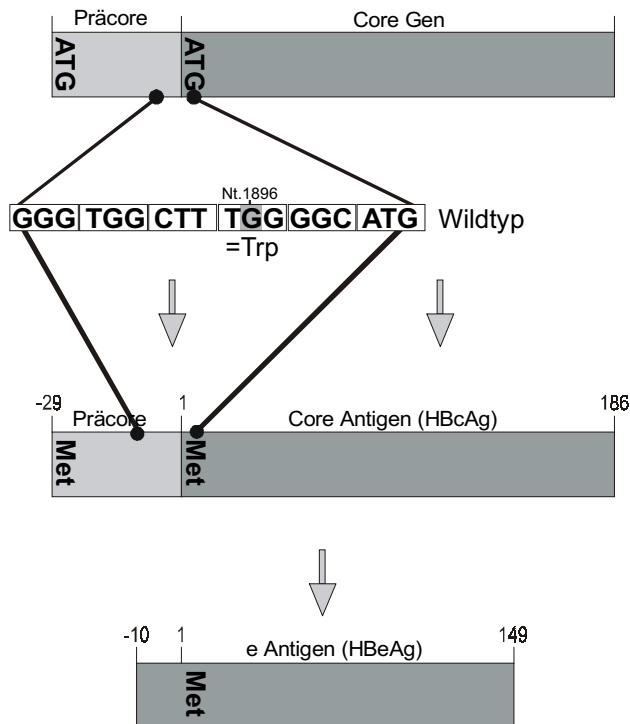
Das essentielle Produkt des Präcore/Core Gens (ORF C) ist das **HBcAg**, das aus 183 bis 185 AA je nach Genotyp des Virus besteht. ORF C selbst besitzt 212 bis 214 Codons, seine Translation beginnt jedoch erst am 29 Codons weiter downstream gelegenen AUG-Startcodon (Nt 1902-4). Der upstream gelegene Bereich des ORF C wird aus historischen Gründen Präcore Region (Nt. 1814-1901) genannt, obwohl es keine Vorläuferfunktion von HBcAg erfüllt [140] .

HBcAg wird zusammen mit eigener mRNA, einer Protein Kinase und nach Bildung eines Komplexes mit viraler Polymerase verpackt, was essentiell für den viralen Lebenszyklus ist. Danach erfolgt die Umkapselung (Enkapsidation) und die Umschließung der Core Partikel durch die HBs Proteine und die Bildung des Virions.

HBcAg wird nicht sezerniert und hat daher keine diagnostische Bedeutung. Als universeller Marker für eine Infektion gelten Anti-HBc Antikörper. Anti-HBc-IgG Antikörper persistieren länger als alle anderen Antikörper und können daher als immunologisches Gedächtnis einer HBV-Infektion interpretiert werden.

Hepadnaviridae besitzen die Fähigkeit eine sekretorische Form ihres Core Proteins zu exprimieren, das **HBeAg**. Erreicht wird dies durch die Präcore-Region (Nt. 1814-1901), dem 5'-terminalen Ende von ORF C, die das Sekretionssignal für HBeAg beinhaltet und die Translokation von HBeAg in das Lumen des ER ermöglicht [17, 130] . Durch posttranslationelle Modifikation werden 19 der 29 Präcore Aminosäuren enzymatisch entfernt. Die verbliebenen zehn Aminosäuren verhindern die Verpackung des HBe Proteins in die Core Partikel durch Interaktionen mit der HBcAg Sequenz [149] . HBeAg wird dann exzessiv in das Serum sezerniert und zirkuliert.

Abbildung 1.4.1 verdeutlicht die Synthese von HBeAg in Bezug auf ORF C.



Das beim Wildtyp-Genom vorhandene Guanin an Nt. 1896 codiert für Trp und ermöglicht somit die weitere HBeAg-Synthese.

Durch posttranslationelle Modifikation werden 19 Aminosäuren enzymatisch entfernt.

Abbildung 1.4.1 Schema der Hepatitis e Antigen (HBeAg) Synthese aus Core und Präcore Gen.

HBeAg ist für den viralen Lebenszyklus nicht essentiell erforderlich. Oft treten Mutanten ohne funktionsfähige Präcore Sequenz unter akuter oder chronischer HBV-Infektion auf, insbesondere während einer Therapie mit Interferon.

Hohe Spiegel an sezerniertem HBe Protein werden vor allem in wenig symptomatischen, hoch virämischen Virusträgern beobachtet. Elimination des HBeAg ist in der Regel von einer sinkenden Virämie begleitet. D.h. eine HBe-Serokonversion als Phase des natürlichen Verlaufs der HBV-Infektion geht in der Regel mit stark abfallender bzw. verschwindender HBV-DNA einher. HBeAg gilt daher als Marker für hohe virale Replikationsraten. Die Korrelation von HBeAg und Infektiosität wird mit der Koregulation von Präcore RNA und prägenomischer RNA begründet. Zusätzlich nimmt man eine wichtige, virale Funktion des HBe Proteins gegenüber dem Immunsystem des Patienten an. HBeAg wird dabei als Induktor für Immuntoleranz angesehen [93, 94] . Die intakte Präcore Region als sein Precursor Protein dagegen soll eine negativ regulatorische Rolle bei der viralen Replikation spielen [46, 70] .

1.4.2 Das X-Gen - Organisation und Funktion

Das X-Gen besteht aus 154 AA, die je nach Genotyp die Nukleotide 1374-1838 umfassen (Zählung nach EcoRI=0), und stellt damit das kleinste der vier HBV-Leseraster dar.

Alle Säugetierhepadnaviren besitzen ein X-Gen im Gegensatz zu den aviären Hepadnaviren. Die Funktion des X-Genes und die dabei verwandten Mechanismen sind indes noch nicht ausreichend verstanden, so dass es zahlreiche Ansätze und Ideen hierzu gibt. Das X-Gen erfüllt seine Aufgabe dabei offensichtlich über verschiedene Mechanismen: Eine Beeinflussung verschiedener Zielstrukturen durch Aktivierung in trans, aber auch Interaktionen durch Cis-Aktivierung mit einer Reihe von Faktoren sind belegt.

Nachfolgend seien vier der möglicherweise wesentlichen Funktionen von HBx benannt und kurz charakterisiert.

1.4.2.1 Das X-Gen als Transaktivator

Durch Aktivierung der Ras-Raf-Mitogen aktivierten Protein Kinase (**MAPK**) Kaskade und der Proteinkinase C (**PKC**) und damit von Transkriptionsfaktoren der **AP-1** (activating protein d.h. Jun und Fos) und **AP-2** Familie greift HBx in die Regulation der Transkription ein [9, 29, 36, 61, 101] . Der PKC-Aktivator **1,2-Diacylglycerol** (DAG) übernimmt dabei wahrscheinlich die notwendige Mediatorfunktion zwischen HBx und PKC [36, 61] .

HBx kann darüberhinaus den Transkriptionsfaktor **NF- κ B** aktivieren [34, 142] . Am ehesten geschieht dies durch Modulation der inhibitorischen Untereinheit I κ B- α durch HBx und unabhängig von der Raf-Ras-MAPK-Kaskade [27] . NF- κ B verhindert Apoptose [147] und ist erforderlich für Wachstum und Lebensfähigkeit während der Embryogenese [8] . Die HBxAg vermittelte Stimulierung von NF- κ B [61, 83] untermauert, dass HBxAg das Überleben infizierter und mutierter Zellen fördert [36] .

Andere zelluläre Strukturen, mit denen HBx interagiert, sind die Transkriptionsfaktoren **CREB** (cAMP-responsives Element bindendes Protein) und **ATF-2** (activating transcription factor 2), beides Mitglieder der Basic Region-Leucine Zipper (**bZIP**) Familie. HBx geht mit CREB und ATF-2 Protein-Protein-Komplexe ein und kann ihre Fähigkeit DNA zu binden verstärken [85] . Obwohl CREB und ATF-2 allein nicht an den HBV Enhancer I binden, tun sie dies jeweils als Komplex mit HBx [85] . In vitro verstärkt HBx die Bindung von CREB und ATF-2 an den HBV Enhancer I [85] .

HBx beeinflusst somit die virale Transkription des HBV auf unterschiedlichste Art und Weise.

1.4.2.2 Das X-Gen als Serin Protease Inhibitor

Serin Protease Inhibitoren vom Kunitz-Typ besitzen eine charakteristische Domäne, Kunitz-Domäne genannt, in der zwei hochkonservierte Bereiche von Aminosäuren liegen. Das X-Gen zeigt Sequenzähnlichkeiten mit diesen beiden Teilen der Kunitz-Domäne an den Nukleotiden 1542-90 und 1761-94 [67] .

Das X-Gen als Serin Protease Inhibitor interagiert dabei direkt mit hepatischen Serin Proteasen und hemmt diese [67] . Der experimentelle Nachweis für HBx gelang am Beispiel von Tryptase TL₂ aus humanen Hepatozyten [134] .

1.4.2.3 Das X-Gen und Hepatokarzinogenese

Einer der signifikanten Effekte des HBx Proteins ist seine tumorigene Aktivität in prämaligen Maus Hepatozyten Kulturen [120] und transgenen Mäusen [63] .

Die meisten HBV-induzierten Tumoren und Tumor verwandten Zellreihen haben ORF X ganz oder teilweise integriert [91] . Das X-Gen stellt dabei die am häufigsten integrierte Struktur des HBV dar [36] .

Funktionelle Domänen im HBx induzieren die Apoptose am Beispiel von Ratten Embryoblasten [119] .

Darüberhinaus führt die Induktion durch HBx bei transgenen Mäusen zum Eintreten ruhender Hepatozyten in die S-Phase des Zellzyklus, was eine Zellzyklusderegulation und mitogene Aktivität von HBx in vivo und in vitro suggeriert [64] .

Unter den zellulären Genen, mit denen Interaktionen von HBx aufgezeigt werden konnten, befindet sich auch das Tumorsuppressorgen p53.

P53 kann unterschiedliche Funktionen wie die Bindung von DNA, die Modulation der Transkription, die Zellzyklusregulation und die Kontrolle über den Zugang zu zellulären Apoptosewegen erfüllen [74] . Co-Immunopräzipitate aus p53 und HBx finden sich im Lebergewebe von Patienten mit HCC [37] .

Daneben könnte HBx ein funktioneller Antagonist der p53 vermittelten Down-Regulation des prägenomischen/Core Promotors sein [73] . HBx-Interaktionen mit p53 unterdrücken wahrscheinlich dessen Funktion als eine Kontrollinstanz für das Anhalten des G1-S-Zellzyklus

oder für die Apoptose von Hepatocyten als Folge von DNA Schaden [109] . HBxAg inhibiert p53-vermittelte Apoptose [109, 148] . Zusätzlich können hohe Spiegel an HBx-Transkripten in Lebertumoren und transgenen Mäusen p53 in seiner Funktion stören [37, 63, 65] .

HBx kann also auf verschiedenen Wegen wesentlichen Anteil am Prozeß der Hepatokarzinogenese haben.

1.4.2.4 Das X-Gen und virale Replikation

Mutationsanalysen ergaben, dass das HBx Protein für die Virus Produktion nicht essentiell notwendig ist [13] . Im Woodchuck Modell des WHV jedoch führten Mutanten ohne funktionsfähiges ORF X zu keiner persistierenden Infektion, was unterstreicht, dass das WHVx Protein für die Replikation des WHV in vivo essentiell ist [24, 158] .

Über die Aktivierung verschiedener Strukturen des HBV kann HBx die virale Replikation regulieren. Eine Auswahl über virale Zielstrukturen gibt Tabelle 1.4.

Das X-Gen könnte über die Transaktivierung von Enhancern und Promotoren das Transkriptionsniveau von HBV beeinflussen. Die Ergebnisse sind jedoch widersprüchlich, was an den verwendeten Zellen, bei gleichen Zellen jedoch auch an verschiedenen Untersuchungsbedingungen liegt. Dies impliziert aber ebenso, dass die jeweilige Umgebung eine für die Funktion des X-Gens entscheidenden Einfluss besitzt [114] .

Zielstruktur	Transaktivierung		Keine Transaktivierung	
	Referenz	Zellen	Referenz	Zellen
HBV Core Promotor/ Enhancer II	Siddiqui et al., 1989 [126] Colgrove et al., 1989 [28]	HepG2 HuH7	Spandau et Lee, 1988 [128]	PLC/ PRF/5
HBV Core Promotor/ Enhancer	Spandau et Lee, 1988 [128] Colgrove et al., 1989 [28] Koike et al., 1989 [66] Siddiqui et al., 1989 [126]	PLC/ PRF/5 HuH7 HepG2 HepG2	Spandau et Lee, 1988 [128] Koike et al., 1989 [66] Jameel et Siddiqui, 1986 [58]	CV1 HuH7 HepG2
HBV präS2/S Promotor/ Enhancer	Colgrove et al., 1989 [28] Rossner et al., 1990 [115] Koike et al., 1989 [66] Rossner et al., 1990 [115]	HuH7 HuH7 HepG2 HepG2	Koike et al., 1989 [66] Zhou et Yen, 1990 [157]	HuH7 HuH7
HBV präS1 Promotor/ Enhancer	Koike et al., 1989 [66] Rossner et al., 1990 [115] Raney et al., 1990 [111]	HepG2 HepG2 Hep3B	Koike et al., 1989 [66] Zhou et Yen, 1990 [157]	HuH7 HuH7
HBV X Promotor/ Enhancer I	Wollersheim et al., 1988 [151] Siddiqui et al., 1989 [126] Faktor et al., 1990 [33] Levrero et al., 1990 [4, 75] Unger et Shaul, 1990 [146] Balsano et al., 1991 [4] Faktor et al., 1990 [33] Faktor et al., 1990 [33] Balsano et al., 1991 [4]	CC113 HepG2 HepG2 HepG2 HepG2 HepG2 PLC/ PRF5 Sk-Hep1 HeLa	Twu et Schloemer, 1987 [143]	Vero

Tabelle 1.4. Virale Zielstrukturen der Transaktivierung durch HBxAg nach Rossner [114].

HBxAg kann darüberhinaus die Expression von **HBsAg** modulieren. Mutationen, die durch Insertionen zu einer Verschiebung des Leserasters im X-Gen führen, können hierbei zu einer Reduktion von S mRNA und HBsAg führen [115]

1.4.2.5 Funktionelle Strukturen im X-Gen

Innerhalb des ORF X liegen verschiedene funktionelle Strukturen des HBV-Genoms positioniert. Im folgenden soll ein Überblick über diese gegeben werden und ihre Funktion kurz erläutert werden.

Unter den im ORF X gelegenen Strukturen befindet sich der **Enhancer II** (Nt. 1685-1773) des HBV [124] . Er reguliert die weiter upstream gelegenen Surface- und X-Promotoren, aber auch den Basalen Core Promotor (BCP).

Der **Basale Core Promotor** (BCP, Nt. 1742-1849) steuert die Transkription der Präcore/Core RNA und darüber die prägenomische RNA [125] . Für die Funktionen des Core Promotors essentielle Nukleotide umfassen den Bereich, in dem die Startposition der prägenomischen RNA liegt [25] .

Die **Core Upstream Regulatory Sequenz** (CURS, Nt. 1643-1742) bewirkt einen stark stimulierenden Effekt auf den BCP [25] . Eine Aktivitätssteigerung des BCP um den Faktor 100 wird dabei durch die am 5' Ende von CURS gelegene Box α (Nt. 1652-1674) und die weiter downstream gelegene Box $\gamma\delta$ (Nt. 1677-1709) erreicht [25] .

Auch die beiden **Direct Repeat** Regionen DR1 (Nt. 1824-1834) und DR2 (1590-1600) sind im ORF X enthalten. Sie sind für die Bindung von Primern während des komplexen Prozesses der Replikation bedeutsam [40] . Während der Virus-Replikation liegt der Ursprung der neu zu synthetisierenden Minus-Strang-DNA in den Direct Repeats.

Ebenfalls enthalten ist das sogenannte **Negative Regulatory Element** (NRE, Nt. 1611-1634). Es wirkt der stimulierenden Aktivität ausgehend von CURS und BCP entgegen und kann deren Wirkung aufheben. Allein besitzt das NRE nur geringen hemmenden Effekt, einen stärkeren jedoch in Anwesenheit eines funktionsfähigen Enhancers II, da der hemmende Effekt nur indirekt über die Reprimierung der Enhancer II-Aktivität eintritt. Für diesen Effekt sind vor allem die Nukleotide 1616 bis 1621 verantwortlich [80] .

Unter der **Kunitz-Domäne** des HBV versteht man eine zweigeteilte hochkonservierte Region im HBV-Genom, die Sequenzähnlichkeiten mit Serin Protease Inhibitoren vom Kunitz-Typ

aufweist. Ihr amino-terminaler Abschnitt beinhaltet die Nt. 1542-1590, der carboxy-terminale die Nt. 1761-1794 [134, 137]. Ihre gesplittete Organisation und letztendliche Funktion sind aber noch weiter zu beleuchten.

Zu den verschiedenen funktionellen Strukturen innerhalb des ORF X zählen auch sogenannte **Hormone Response Elements** (HRE) (Nt.1621-30, Nt.1731-1740, Nt.1743-1752, Nt.1678-1689, Nt.1713-1724, Nt.1660-1672, Nt.1755-1767). An sie können Mitglieder der Familie der nukleären Rezeptoren binden [87, 150]. Die Aktivität der HBV-Promotoren scheint dabei zumindest teilweise mittels HRE durch die Bindung unterschiedlicher nukleärer Rezeptoren an HRE moduliert zu werden [154]. Im ORF X finden sich folgende Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren, wie für Mitglieder der Familie der Hepatocyte Nuclear Factors (HNF4) und Chicken Ovalbumin Upstream Promotor Transcription Factors (COUP-TF) sowie Bindungsstellen für den SV40 Promotor (SP1): Sp1: Nt.1621-30, Nt.1731-1740, Nt.1743-1752, HNF3: Nt.1678-1689, Nt.1713-1724, HNF4: Nt.1660-1672, Nt.1755-1767 [48, 110].

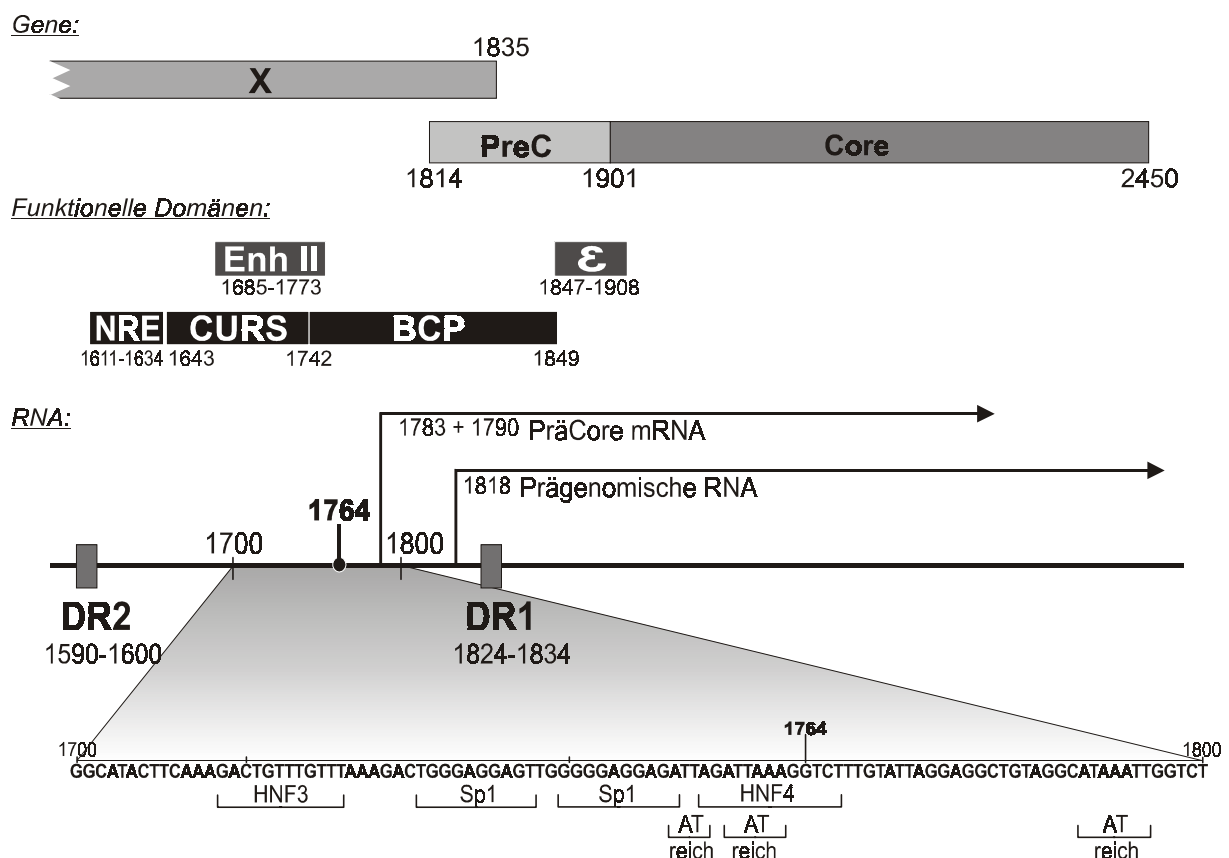


Abbildung 1.2.4. Funktionelle Strukturen des X-Gens. Übersicht über die Position funktioneller Domänen in X-Gen, PräCore- und Core-Region. (X=X-Gen, PräC=PräCore-Region, Core=Core-Region, Enh II=Enhancer II, NRE=negativ regulatorisches Element, CURS=Core Upstream Regulatory Structure, BCP=Basaler Core Promotor, DR1/2=Direct Repeat 1 bzw. 2, HNF=Hepatocyte Nuclear Factor, Sp=SV40-Promotor)

Sequenzvergleiche unter verschiedenen Species ergaben im X-Gen zwei besonders ähnliche Bereiche (AA 1-20 und AA 132-140), was hochkonservierte Funktionen suggeriert [114]. Die Identifizierung essentieller Regionen des HBx gelang zumeist durch Deletionsanalysen [34, 75, 112, 135, 146]. Entfernung der AA 148-154, der AA 144-154 bzw. der AA 143-154 beeinflussen die Funktion des HBxAg nicht [75, 112, 146]. Untersuchungen von Levrero und Kollegen [75] ergaben, dass ein carboxy-terminal trunkiertes HBxAg, das aus den AA 1-117 besteht, seine Transaktivierungsfähigkeit einer Reihe von Transkriptionskontroll-Regionen durchaus noch besitzt [4, 75]. Im Gegensatz dazu geht die Fähigkeit des X-Gens durch Deletion der AA 133-154 verloren den SV40 early promotor/enhancer Komplex zu aktivieren [135]. Deletion der AA 118-154 führen zu einem nicht mehr transaktivierenden HBxAg [23, 66].

Ähnlich Widersprüchliches gilt für Deletionen am amino-terminalen Ende des ORF X: Trunkierung des HBxAg um die AA 2-33 führt auf der einen Seite zu einem Transaktivierungsverlust des HBV-Enhancers I [34] auf der anderen Seite findet eine Aktivierung von SV 40 Enhancer und RSV LTR trotzdem noch statt [112].

Verlust von 35 AA aus dem Inneren des ORF X (Positionen 32-66) führen zu einem funktionsuntüchtigen Produkt [112], ebenso Mutationen der in HBV, WHV und GSHV identischen AA 67-69, deren Sequenz Ähnlichkeit mit Serin Protease Inhibitoren hat [136].

Für die Transaktivierung essentielle Bereiche stellen die AA 46-52, die AA 61-69 und 132-139 dar [3].

Hauptproblem bei der Bewertung dieser Resultate scheinen die unterschiedlichen Zielstrukturen der Transaktivierung des X-Gens zu sein. Bestimmte Regionen des HBx könnten also nur für bestimmte Interaktionen mit bestimmten Zielstrukturen verantwortlich sein [114].

1.4.3 Der X-Promotor – Organisation und Funktion

Der X-Promotor (Nt. 1239-1373) ist einer der vier identifizierten Promotoren des HBV. Er besitzt eine Länge von etwa 140 Nukleotiden, die upstream des X-Gens liegen [127, 141]. Seine Aktivität konnte in allen Säugetierzellreihen nachgewiesen werden [121].

Er interagiert mit den verschiedensten Transkriptionsfaktoren und gilt als positiv autoreguliert durch das HBx Protein. Desweiteren wird seine Transkriptionsaktivität durch den direkt upstream anschließenden Enhancer I (Nt. 1071-1238) um den Faktor 30 verstärkt [155].

Interessanterweise enthält der X-Promotor jedoch keine TATA oder GC-Box Sequenzen. Nakamura und Kollegen [100] konnten eine spezielle Proteinbindungsstelle am Enhancer I/X-Promotor Übergang und ein entsprechendes Protein (X-PBP, x promotor binding protein) nachweisen. Das X-PBP ist dabei essentiell für die Regulation der Transkription des X-Gens. Die beschriebene Bindungsstelle umfaßt ein 16 Basenpaare langes Fragment der Nukleotide 1228 bis 1243 und beinhaltet somit sowohl Teile des Enhancers I, als auch des X-Promotors. Mutationen in diesem Bereich führten zum Verlust der Proteinbindung und der Promotor Aktivität [100] .

1.5 Replikation des HBV

Anders als herkömmliche DNA-Viren repliziert das HBV über eine reverse Transkription [131, 150] . Im Zellkern eines infizierten Hepatozyten wird der inkomplette Plusstrang aufgefüllt und die zirkuläre DNA kovalent geschlossen [95] . Die zelluläre RNA-Polymerase II bewirkt dann die Transkription der DNA in eine mehr als genomlange Plusstrang-RNA [131] . Außerhalb dient diese supergenomische RNA als Vorlage zur Translation von Polymerase- und Core-Protein, welche zusammen mit der prägenomischen RNA in Core-Partikeln zusammengefasst werden. Durch reverse Transkription der prägenomischen RNA wird in diesen Kapsiden Minusstrang-DNA synthetisiert. Die Primase-Domäne der Polymerase (ein aminoterminalen Tyrosin) fungiert dabei als Primer und bleibt kovalent am 5'-Ende der wachsenden Minusstrang-DNA gebunden. Wenige Basen vor dem 5'-Ende des Prägenoms endet die reverse Transkription. Ein DNA-Minusstrang mit terminaler Redundanz von ca. 8 Basen wird somit erzeugt. Die RNase H-Aktivität der Polymerase entfernt dabei die bereits transkribierten RNA-Abschnitte und läßt ein 18b langes RNA-Fragment an ihrem 5'-Ende verbleiben. Dieses Fragment weist Homologien zu den Direct Repeat Regionen DR1 und DR2 auf, was Verschiebungen des Fragmentes von DR1 zu DR2 erlaubt, um dort als Primer für die Elongation des DNA-Plusstrangs zu fungieren, dessen Synthese in der Regel nach 1000 bis 2500 Basen abbricht [56, 71] .

Diese Ähnlichkeit der HBV-Replikation mit retroviraler Replikationsstrategie führte zur Bezeichnung des HBV als Pararetrovirus.

1.6 HBV Mutanten

Für das HBV wurde eine Mutationsrate von etwa 1 Nukleotid pro 10000 Basen und Jahr errechnet [45]. Damit liegt sie 10-1000mal niedriger als bei RNA-Viren, jedoch etwa 100mal höher als bei herkömmlichen DNA-Viren, was auf die besondere HBV-Replikationsstrategie zurückzuführen ist. Innerhalb des HBV-Genoms differieren die Mutationsraten der einzelnen Regionen. Das X-Gen scheint dabei das häufigst veränderte Leseraster zu sein [106]. Tabelle 1.6 enthält eine Zusammenfassung der Mutationsraten der einzelnen HBV-Regionen.

Nach jahrelangem Verlauf können sich Mutationen im Virus-Genom akkumulieren und klinisch signifikant werden. Neben dem Zeitfaktor und der Replikationsaktivität spielen aber auch die Selektion von Mutanten durch Immunmechanismen gegenüber antiviralen Mechanismen oder Medikamenten eine Rolle [14].

Region	Anzahl der Codons/Aminosäuren	Substitutionen pro Nukleotid und Jahr
P	843	4.57×10^{-5}
PräS	163	7.62×10^{-5}
S	259	5.75×10^{-5}
C	212	5.54×10^{-5}
X	154	7.9×10^{-5}

Tabelle 1.6. Mutationsraten der HBV-Regionen [106].

1.6.1 S-Gen-Mutanten

Unter den S-Gen-Mutanten befindet sich die sogenannte Vaccine Escape Mutante, deren klassische Form an der AA-Position 145 einen Aminosäureaustausch von Glycin nach Arginin besitzt. Dies resultiert im Verlust der antigenen Determinante a, gegen die hauptsächlich die Impfantwort gerichtet ist. Eine Impfung dieser Patienten erzielt so keine Immunität gegen diese HBV-Mutante. Sie entkommt der Vakzine und kann trotz vorhandener Anti-HBs-Antikörper zu einer HBV-Infektion führen [22]. Auch andere dieser sogenannten Vaccine-Escape-Mutanten mit Veränderungen im S-Gen und gleichen Konsequenzen sind entdeckt worden [38, 60, 92, 104, 153]. Da HBV in der Regel primär über das Vorhandensein von HBsAg mittels Anti-HBs-Antikörpern diagnostiziert wird, werden bestimmte HBs-Mutanten

bei der Diagnosestellung nicht entdeckt: Diese sogenannten Diagnosis Escape Mutanten stellen in der Praxis jedoch eine große Seltenheit dar [68, 153] .

Mutationen der PräS-Regionen finden sich im Gegensatz dazu relativ häufig. Die klinische Bedeutung dieser ist jedoch unklar.

1.6.2 P-Gen-Mutanten

Replikationsdefekte **Polymerase**-Gen Mutanten können im Patienten persistieren und durch die Infektion mit Wildtypviren reaktiviert werden [12] .

Bei HBV-infizierten Patienten unter Lamivudine- bzw. Famciclovir-Therapie konnten Mutationen im P-Gen identifiziert werden, die zur Lamivudine- bzw. Famciclovir Resistenz führten [5, 96] . Hierbei scheint insbesondere die Mutation im sogenannten YMDD-Motif des Polymerase-Gens für die Therapieresistenz verantwortlich zu sein [1, 123] .

1.6.3 PräCore/Core-Mutanten

Die häufigste Mutation der **PräCore/Core**-Region liegt an ihrem 3'-Ende an Nukleotid 1896. Sie beinhaltet den Austausch eines Guanins in ein Adenin an dieser Position, wodurch ein Tryptophan (codiert durch TGG) in ein Stopcodon (TAG) konvertiert wird.

Dies verdeutlichen die Abbildungen 1.6a und b.

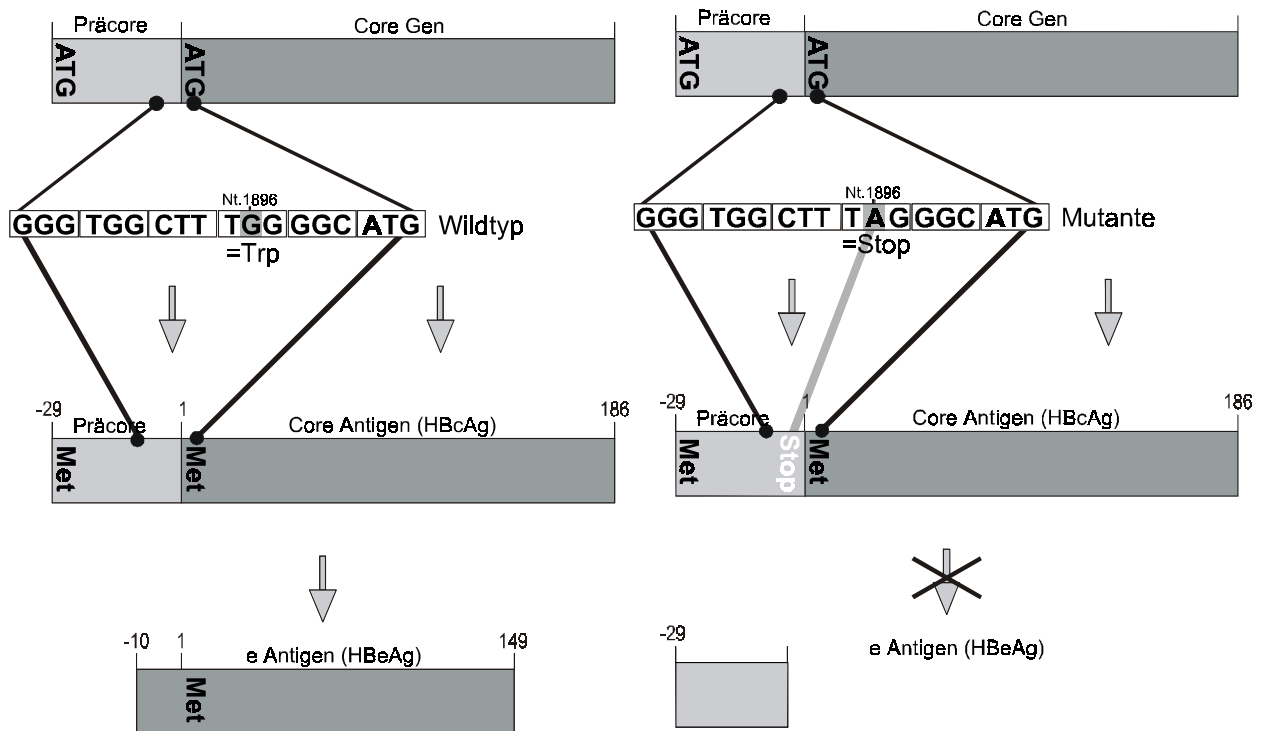


Abbildung 1.6a. HBeAg-Synthese beim Wildtyp

Abbildung 1.6b. Struktur der Präcore Stopcodon Mutante: Durch Vorhandensein eines Adenins an Nt. 1896 entsteht ein TAG-Stopcodon und die e Antigen Synthese bricht ab.

Ein Translationsabbruch bei der HBeAg Synthese durch das Stopcodon des PräCore/Core-Vorläuferproteins ist die Folge. Diese Präcore Stopcodon Mutante mit der Mutation G1896A wird auch als sogenannte HBeAg-Minusmutante bezeichnet.

Klinisch wurde die Präcore Stopcodon Mutante in den Zusammenhang mit fulminanten Verlaufsformen der Hepatitis B gebracht. Es wurde präsentiert, dass diese Präcore Mutanten Stämme von Trägern auf andere Patienten übertragen werden konnten, die daraufhin eine fulminante Hepatitis B entwickelten [76, 105] . Im Gegensatz dazu zeigten andere Studien jedoch fulminante Verläufe ohne die Präcore Mutante [19] .

Daneben gibt es vielfach Startcodonveränderungen (Nt 1814-1816) und Leserasterverschiebungen, die eine völlige Einstellung der HBeAg-Synthese bewirken.

Bei der HBeAg-negativen HBV Infektion können trotz der fehlenden Bildung von HBeAg und unter Vorhandensein von Anti-HBe-Antikörpern andauernd hohe virale Replikationsraten und fortbestehender Leberschaden beobachtet werden [20] .

Mutationen der AA 18-27 und hier besonders der AA 27 im **Core** führen wegen der damit geringeren T-Zell Immunogenität zu reduzierter Immunantwort [10, 11] .

1.6.4 X-Gen-Mutanten

Verschiebungen des Leserasters des ORF X allgemein führen zu einer Verringerung aller viralen mRNAs [28] .

Mutationen der AA 28-62 (Nt. 1455-1559) oder AA 28-87 (Nt. 1455-1634) bzw der AA 118-154 (Nt. 1725-1835) vermindern die Transktivierungsfunktion von HBx [3] . Andere Regionen für diese verminderte Funktion sind in den AA um Nukleotid 1568 (AA 65-67) und zwischen den AA 110 und 139 (Nt. 1701-1790) lokalisiert [116] .

Bereiche, in denen Mutationen besonders häufig auftreten, stellen die AA 5 (Nt. 1386-88), die AA 12 (Nt. 1407-09), die AA 30 bis 47 (Nt. 1461 bis 1514), sowie die AA 130 und 131 (Nt. 1761-1766) [145] dar.

Die häufigsten Veränderungen werden dabei in einer Punktmutation des Direct Repeat 2 (DR2) (T1590C) und einer 8bp Deletion zwischen den Nukleotiden 1770 und 1777 festgehalten. Die erste konvertiert ein Phenylalanin in ein Leucin, letztere trunziert das carboxy-terminale Ende des X Proteins um 20 AA. Die deletierten AA stellen wichtige funktionelle Domänen des X-Genes dar und sind unter Säugetier Hepadnaviren normalerweise hochkonserviert [114, 116] . Darüberhinaus beinhalten diese Regionen Bindungsstellen für Core Promotor und Enhancer II [81, 82] .

Grundsätzlich scheinen Deletionen kurzer Segmente im X-Gen besonders bei chronischen und HBeAg-negativen Verläufen häufig nachweisbar zu sein [55, 72, 102] . Eine besondere Rolle scheinen bestimmte Mutationen im X-Gen zu spielen. Hierzu gehören vor allem die der Nukleotide 1653, 1762 und 1764. Ihre endgültige Bedeutung ist noch nicht geklärt. Sie könnten jedoch die Synthese des HBeAg und der RNAs beeinflussen [62] . Will et al. konnte für Patienten mit Mutationen an allen drei Positionen (1653, 1762, 1764) eine Präcore RNA Reduktion um mehr als 50% nachweisen. Kein Effekt dieser Mutanten fand sich auf die prägenomische RNA [47] .

Patienten mit Doppelmutation sowohl des Nukleotids 1762 als auch 1764 demonstrieren eine reduzierte Transkription der Präcore RNA bei gleichzeitig unveränderter prägenomischer RNA. Dies führt zu erhöhter Produktion von Viruspartikeln. Die Bindung eines Transkriptionsfaktors (COUP-TF) war jedoch vermindert [18] . Genome mit solitärer Mutation

der Position 1762 ergeben keine RNA-Titer-Veränderungen im Vergleich zu Doppelmutanten mit Veränderungen an Nt. 1762 und 1764. Dagegen offenbaren Patienten mit Einzelmutation an Nukleotid 1764 eine zur Doppelmutation nahezu umgekehrte Situation mit unveränderter Präcore RNA Transkription, einer verminderten Virionen Produktion und unveränderter Bindung des Transkriptionsfaktors COUP-TF [18] .

Klinische Untersuchung von Patienten mit Mutation ergibt eine Korrelation von Vorliegen der 1762T-Mutante mit signifikant erhöhtem Auftreten von Leberentzündung und Fibrose [78] .

Im Zusammenhang mit dem HBeAg-Status der Patienten erwiesen sich Patienten mit Wildtyp an den Nt. 1762 und 1764 als HBeAg-positiv, die Doppelmutanten dagegen als HBeAg-negativ. Auch hier zeigten die Mutanten gehäuft Leberfibrose bzw. -zirrhose [62] . Deletionen von Bereichen um diese Nukleotide (1753-1772 bzw. 1763-1770) erzielten eine Reduktion an produziertem HBcAg bei fraglich gleicher Replikation des Virus [98] .

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Bisher ist in Studien gezeigt worden, dass niedrige Aminotransferasen, hohe Virus Titer bzw. hohe HBV-DNA-Werte, lange Krankheitsdauer und geringe Entzündungszeichen im Lebergewebe mit einer niedrigen Therapieansprechrate auf Interferon assoziiert sind. Darüberhinaus werden eine Superinfektion mit dem Hepatitis D Virus oder HI-Virus des Patienten als den Therapieerfolg negativ beeinflussende Faktoren angesehen [14, 102, 108]. Virale, genetische Faktoren wurden dies betreffend auf ihre Wirkung für das Ansprechen auf eine Interferon-Therapie bisher nur unzureichend untersucht. Bis jetzt wurden vor allem die Präcore und Core Region untersucht. Insbesondere die Rolle von Mutationen im X-Gen und X-Promotor im Zusammenhang mit einer Interferon Therapie ist unbekannt.

Die Funktionen der Proteine des Hepatitis B Virus sind mit der Ausnahme des X-Gens im allgemeinen gut charakterisiert. Das X-Gen jedoch scheint in seiner Funktion nur unvollständig verstanden. Bisher beschriebene Ergebnisse gehen meist auf Interaktionen des X-Proteins mit anderen Strukturen ein. HBxAg spielt eine Rolle in der Replikation des Virus und hat als Transaktivator Anteil an der HBV-induzierten Hepatokarzinogenese [24, 114]. Das X-Protein und der X-Promotor erfüllen über die Produktion von HBeAg, HBcAg und prägenomischer RNA wichtige virale Funktionen, die eine Rolle unter anderem bei der Interferon Therapie vermuten lassen.

Ziel der Arbeit war die Evaluierung virusgenetischer Faktoren sowohl hinsichtlich klinischer Parameter als auch der Prädiktoren für das Ansprechen auf eine Interferon Therapie bei Patienten mit chronisch-replikativer HBeAg-negativer Hepatitis B.

Es wurden dafür virale und klinische Parameter der Patienten analysiert. Der Fokus lag dabei auf einer molekularen Charakterisierung des X-Gens und des X-Promotors und der möglichen Korrelation mit dem klinischen Krankheitsverlauf insbesondere unter einer Interferon Therapie.

2. Material und Methoden

2.1 Patienten

Von März 1988 bis Dezember 1998 wurden 248 Patienten mit chronisch replikativer Hepatitis B in unserer Klinik untersucht. 37 dieser 248 (14.9%) waren dabei HBeAg-negativ.

Chronisch replikative Hepatitis B wurde definiert über den Nachweis von Hepatitis B surface Antigen (HBsAg) und HBV DNA durch Hybridisierungsassays mindestens zweimal in einem Intervall von sechs Monaten. HBeAg durfte in zwei verschiedenen Serumproben nicht nachweisbar sein, zwischen deren Gewinnung sechs Monate oder mehr lagen.

Keiner der Patienten hatte Marker des Hepatitis C Virus, des Hepatitis D Virus oder des human immunodeficiency virus (HIV).

Möglicherweise vorhandene Marker von HBV (HBsAg, Anti-HBs, HBeAg, Anti-HBe) und HDV (Anti-HDV) wurden durch kommerzielle Immunoassays (Abbott Laboratories, North Chicago, IL, USA) überprüft.

Für den möglichen Nachweis von Anti-HCV Antikörpern standen kommerzielle Immunoassays (HCV 2nd generation ELISA, Ortho Diagnostics, Raritan, NJ, USA) zur Verfügung. Anti-HIV wurde durch kommerzielle Enzymimmunoassays (Abbott Laboratories, North Chicago, IL, USA) ausgeschlossen. Serum HBV-DNA wurde mittels Standard Blot Hybridisierung (Murex Diagnostika, Burgwedel) bzw. durch kommerzielle Radioimmunoassays bestimmt.

In der Gruppe der therapierten Patienten wurden Patienten mit einer abgeschlossenen IFN-Therapie von 5/6 MU dreimal wöchentlich subkutan über 6 Monate berücksichtigt. Drei HBeAg-negative Patienten (8.1%) wurden initial mit 2 MU IFN- α dreimal wöchentlich und einer Kurzzeit-Kortison-Therapie behandelt.

Um ein verspätetes Therapieversagen nach primärem Therapieerfolg auszuschließen, wurde darüberhinaus eine der Therapie nachfolgende Kontrollperiode (follow-up) von sechs Monaten durchgeführt.

Untersuchungsgut aller Patienten war Serum.

Die Quantifizierung des HBs Antigens wurde ebenfalls aus Seren der Patienten durchgeführt.

2.2 DNA-Extraktion

Die Extraktion der DNA aus Blutseren wurde nach einem Protokoll der Fa.Qiagen, Hilden bei Raumtemperatur (25° C) durchgeführt:

200 µl Blutserum, 25 µl Qiagen Protease (Qiagen, Hilden) und 200 µl Lysis-Puffer (AL-Puffer, Qiagen, Hilden) wurden in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß gegeben, mittels Vortexer sofort vermischt und in einem 70° C heißen Wasserbad für die Dauer von 10 min inkubiert.

Dazu wurden 210 µl absoluter Ethanol gegeben und erneut vermischt.

Nach Applikation dieser Lösung in eine Filtriersäule (QIAamp spin column, Qiagen, Hilden) wurde dann bei 8000 U/min eine Minute in einer Mikrozentrifuge (Zentrifuge 5146, Eppendorf, Hamburg) zentrifugiert.

Danach wurde mit 500 µl Wasch-Puffer (AW-Puffer, Qiagen, Hilden) gewaschen und erneut bei 8000 U/min eine Minute zentrifugiert. Dieser Schritt wurde wiederholt und zusätzlich anschließend zehn Sekunden bei maximaler Umdrehungszahl (15000 U/min) zentrifugiert. Die spin column wurde in ein steriles Reaktionsröhrchen gesteckt und die DNA mit 200 µl Aqua ad iniectabilia (Braun, Melsungen) eluiert.

Die extrahierte DNA wurde bis zur Verwendung bei der PCR bei –30° C gelagert.

2.3 Polymerase Ketten Reaktion

Die Polymerase Ketten Reaktion (PCR) ist eine Methode zur Vervielfältigung von Nukleinsäuren: Spezifische DNA-Sequenzen können in vitro in einer einzigen Reaktion mit hoher Ausbeute amplifiziert werden [69, 99, 118] .

2.3.1 PCR-Komponenten

Für die PCR wurden folgende Substanzen verwendet. Eine Übersicht darüber gibt Tabelle 2.5.

-Taq-Polymerase

Diese DNA-abhängige DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* wurde in einer Konzentration von 5 U/100 µl in der PCR bzw. 4.5 U/100 µl in der seminested PCR verarbeitet.

Die verwendete Taq-Polymerase wurde von der Firma Sigma Chemical Company, St.Louis, MO, USA bezogen.

-Ionen

Optimale Konzentrationen an Magnesiumchlorid liegen zwischen 0.5 und 2.5 mM [57] bzw. zwischen 1.2 und 2.5 mM [69]. Sowohl in der Erstrunden-PCR, als auch in der seminested PCR wurden eine MgCl_2 -Konzentration von 1.5 mM eingestellt.

Der für die PCR ideale pH-Wert liegt zwischen 8.3 und 8.8 [57]. Zugabe von Kaliumchlorid bis zu einer Konzentration von 50mM fördert das Annealing der Primer.

Die Konzentrationen in den Reaktionen betrugen für MgCl_2 1.5 mM (1.5mM in der snPCR), für Tris-HCl 10 mM (9.09 mM) und für KCl 50 mM (45.45mM).

Verwendet wurden dazu eine 25 mM Magnesiumstammlösung (MgCl_2 , Perkin Elmer, Weiterstadt) sowie ein Puffersystem mit dem pH-Wert 8.3 aus 100 mM Tris-HCl und 500 mM KCl (10X PCR Buffer II, Perkin Elmer, Weiterstadt)

-Deoxynukleotid Triphosphate

Die Deoxynukleotid Triphosphate (Boehringer Mannheim, Mannheim) wurden in einer Stammlösung zu 10 μM verdünnt. In der PCR-Mischung betrug die Endkonzentration 0,2 μM .

-Primer

Eine Übersicht über die verwendeten Primer gibt Tabelle 2.4.

Für die Amplifikation des X-Gens wurden die Primer HBV-S-M13-1229-1245 und HBV-AS-M13-1756-1783 benutzt. Das 3'-Ende des X-Gens wurde mithilfe der Primer HBV-S-103-M13-1640-1663 und HBV-AS-104-M13-2466-2489 bzw. HBV-AS-1868-1881 amplifiziert.

Die Amplifikation der X-Promotor-Region wurde mit den Primern HBV-S-754-773 und HBV-AS-M13-1424-1408 durchgeführt.

Für die seminested PCR des X-Gens wurde der Primer HBV-S-1256-1273, für die seminested PCR der Enhancer-und Promotor-Region der Primer HBV-S-997-1013 verwendet.

Bei der Auswahl der Primer wurde darauf geachtet Palindrome zu vermeiden, eine Oligonukleotid-Länge von 20 bis 40 Nukleotiden und ein nahezu ausgeglichenes Verhältnis von A und T zu G und C zu erzielen. Für die Schmelztemperatur der Primer wurden nach [138] für jedes Nukleotid A und T jeweils 2° C, für jedes G und C je 4° C berücksichtigt.

Abk.	Name	Sequenz (in 5'-3'Richtung)
UR1	HBV-S-M13-1229-1245	TGTAACGACGGCCAGTAGCGCATGCGTGGAA ACC
UR2	HBV-AS-M13-1783-1765	CAGGAAACAGCTATGACCAGCCTCCTAGTACA AAGA
UR3	HBV-S-1256-1273	CTCTGCCGATCCATACTG
UR4	HBV-S-103-M13-1640-63	TGTAACGACGGCCAGT GCCCAAGGTCTTACATAAGAGGAC
UR5	HBV-AS-104-M13-2466- 2489	CAGGAAACAGCTATGACA AGTTTCCCACCTTATGAGTCCA
UR6	HBV-AS-1868-1881	CACAGCTTGGAGGC
UR7	HBV-S-754-773	TTGGGGGCCAAAAGTGTACA
UR8	HBV-AS-M13-1424-1408	CAGGAAACAGCTATGACA CAAAGGACGTCCCGCG
UR9	HBV-S-997-1013	ATTGTGGGTCTTTTGGG

Tabelle 2.4. Verwendete Primer und ihre Sequenzen.

Annealing wurde bei 5° C unterhalb der errechneten Schmelztemperatur der Primer durchgeführt.

Die Primer wurden auf 10 µM verdünnt und aliquotiert eingesetzt. Die Primer-Endkonzentration betrug 0.20 µM bzw. 0.18 µM in der seminested PCR.

Alle Primer wurden von der Fa.Birsner&Grob Biotech GmbH, Denzlingen geliefert.

-Wasser

Es wurde Aqua ad inectabilia (Braun, Melsungen) verwendet.

Sämtliche angegebenen Konzentrationen wurden durch Serienversuche in aufsteigender Konzentration etabliert und dann optimiert. Erst diese Konzentrationen fanden Verwendung in der Datenauswertung.

Um Kontaminationen der Reaktionen zu vermeiden, wurde auf strikte räumliche Trennung der einzelnen Schritte geachtet. Dabei wurden Serien bzw. extrahierte DNA und PCR-Produkte in

getrennten Tiefkühlschränken aufbewahrt. Zubereitungen der PCR- und seminested PCR-Reaktionsmischungen wurden räumlich voneinander getrennt durchgeführt. Zur weiteren Reduktion des Kontaminationsrisikos wurden innerhalb der Räume die Reaktionansätze in eigens für diese Reaktionschritte reservierten Glaskästen angesetzt.

Zur Aufdeckung etwaiger Kontaminationen wurden Positiv- und Negativkontrollen durchgeführt.

PCR			Seminested PCR		
Komponenten	Volumen	Konzentration	Komponenten	Volumen	Konzentration
H ₂ O	56 µl	entfällt	H ₂ O	38 µl	entfällt
Uracil-DNA Glycosylase	1 µl	1 U/100 µl	Uracil-DNA Glycosylase	entfällt	entfällt
MgCl ₂	6 µl	1.5 mM	MgCl ₂	3.3 µl	1.5 mM
10xPuffer mit Tris-HCL KCl	10 µl	10 mM 50 mM	10xPuffer mit Tris-HCL KCl	5 µl	9.09 mM 45.45 mM
Primer 1	2 µl	0.20 µM	Primer A	1 µl	0.18 µM
Primer 2	2 µl	0.20 µM	Primer B	1 µl	0.18 µM
Deoxynukleotide	2 µl	0.20 µM	Deoxynukleotide	1.2 µl	0.21 µM
Taq-Polymerase	1 µl	5 U/100 µl	Taq-Polymerase	0.5 µl	4.5 U/100 µl
extrahierte DNA	20 µl		PCR-Produkt	5 µl	
Gesamt	100 µl		Gesamt	55 µl	

Tabelle 2.5. PCR-Komponenten und ihre Konzentrationen.

2.3.2 PCR-Bedingungen

Das Reaktionsvolumen der PCR-Mischung betrug insgesamt 100 µl. Sämtliche Reaktionsschritte wurden dabei auf Eis durchgeführt. Um die Reaktion möglichst spät zu starten, wurde die Taq-Polymerase zum Reaktionsgemisch zuletzt hinzugefügt.

Zur gleichmäßigen Verteilung der einzelnen Komponenten des Reaktionsgemisches wurde zunächst eine Master-Mischung erstellt und diese dann auf die Reaktionsgefäße (Safe-Lock 0.5

ml, Eppendorf, Hamburg) verteilt. Nach Zugabe von je 20 µl Serumauflösung und Abdecken des PCR-Gemisches mit zwei Tropfen Mineralöl (Sigma Aldrich, Deisenhofen) zum Schutz vor Verdunstung wurden 40 Zyklen in einem Thermal Cycler (MasterCycler 5330, Eppendorf, Hamburg) durchgeführt.

Die seminested PCR wurde mit einem Gesamtvolumen von 55 µl durchgeführt.

Sowohl die Erstrunden-PCR, als auch die seminested wurden unter gleichen Reaktionsbedingungen mit Ausnahme der Zyklenzahl durchgeführt:

Reaktionsbedingungen für die Amplifikation des X-Gens:

Schritt 1: 95° C, 5 min

Schritt 2: 95° C, 1 min (Denaturation)

Schritt 3: 51° C, 1 min (Annealing)

Schritt 4: 72° C, 1 min (Elongation)

Schritt 5: 72° C, 10 min

} Zyklen: 40 (bzw. 20 für die seminested PCR)

Reaktionsbedingungen für die Promotor-Amplifikation:

Schritt 1: 95° C, 5 min

Schritt 2: 95° C, 1 min (Denaturation)

Schritt 3: 54° C, 1 min (Annealing)

Schritt 4: 72° C, 1 min (Elongation)

Schritt 5: 72° C, 10 min

} Zyklen: 40 (bzw. 20 für die seminested PCR)

Der Erfolg der Polymerase Ketten Reaktion wurde durch Elektrophorese mittels 2%igen Agarose Gels (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) kontrolliert. Die Färbung der Gele erfolgte durch Zugabe von 2.5 µl Ethidiumbromid während des Abkühlens der Agarosemischung. Abbildung 2.3 zeigt das Sofortbild (Polaroid, Cambridge, USA) eines Agarosegels nach erfolgreicher Amplifikation unter ultraviolettem Beleuchtung. Zur Kontrolle der Amplifikatlängen wurden die DNA-Marker VI und VIII der Firma Boehringer-Mannheim, Mannheim verwendet. Die Längenstandards dieser Marker zeigt Abbildung 2.4.

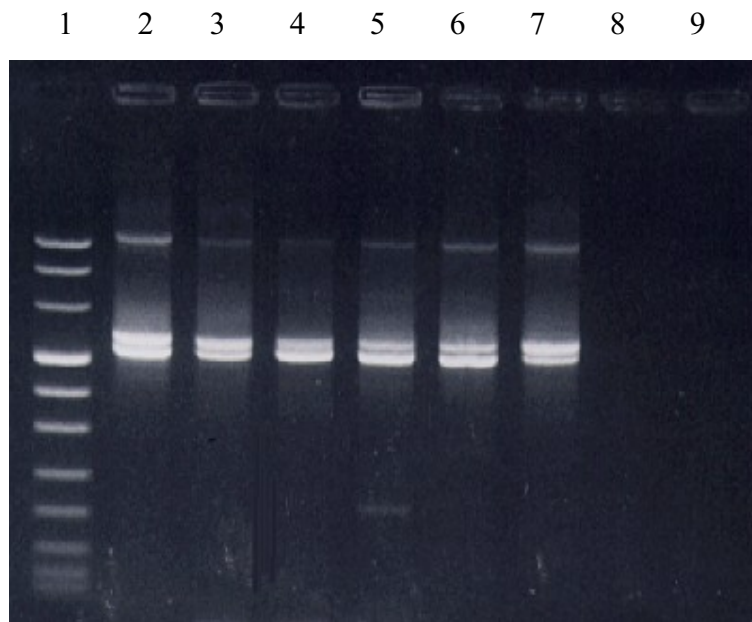
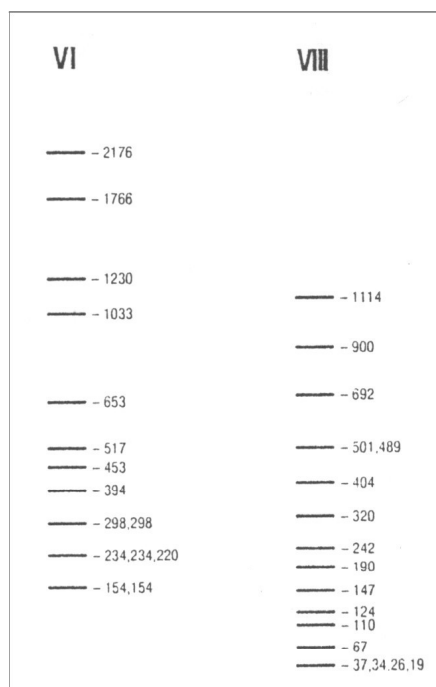


Abbildung 2.3. Agarosegel mit DNA-Marker VIII (Bahn 1), PCR-Produkte von DNA-Aufschlüssen aus sechs Patienten (Bahn 2-7) sowie Negativkontrollen mit Serum und Wasser (Bahn 8 u.9).



Marker: **DNA-Fragmente:**

VI 154, 234, 298, 394, 453, 517, 653, 1230, 1766, 2176

VIII 19, 26, 34, 37, 67, 110, 124, 147, 190, 242, 320, 404, 489, 501, 692, 900, 1114

Abbildung 2.4. Längenstandards der DNA-Marker VI und VIII.

2.4 Sequenzierung

2.4.1 Aufreinigung der PCR-Produkte

PCR- bzw. seminested PCR-Produkte wurden mittels Zentrifugation durch Filtereinheiten mit 100000 bzw. 30000 Massengewichtslimit (NMWL) aufgereinigt (Ultrafree®-MC Centrifugal Filter Units, Millipore, Eschborn). Störende PCR-Komponenten sollen bei der Zentrifugation die Filtermembran passieren. Die amplifizierten HBV-Fragmente werden vom Filter aufgefangen und in Wasser gelöst gewonnen.

Dabei wurden zunächst 30 µl des PCR-Produktes und 350 µl H₂O ad iniectionabilia auf die Membran der Filtereinheit aufgetragen und 10 min bei 5000 U/min zentrifugiert (Zentrifuge 5146, Eppendorf, Hamburg).

Das filtrierte Zentrifugat wurde danach verworfen. Nach Zugabe von 200 µl H₂O ad iniectionabilia wurde 5 min bei 5000 U/min zentrifugiert und das Zentrifugat erneut verworfen.

Auf die Filtermembran ist daran anschließend 20 µl H₂O ad iniectionabilia aufgetragen worden und 10 min bei 25° C inkubiert worden. Nach Aufnahme dieses Volumens wurde dieser Schritt nach Inkubation für 5 min wiederholt.

Bei der Aufreinigung entstanden so insgesamt 40 µl DNA-Amplifikat.

2.4.2 Sequenzierungs-PCR

Zur Sequenzanalyse wurde eine weitere PCR mit einem Anteil an fluoreszenzmarkierten Dideoxynukleotiden neben den normalen Deoxynukleotiden durchgeführt. Diese wird im folgenden Sequenzierungs-PCR genannt.

Für diese Sequenzierungs-PCR wurde eine Lösung mit den vier Deoxynukleotiden, sowie einem Anteil an farbmarkierten Dideoxynukleotiden verwendet (Terminator Ready Reaction Mix, Perkin Elmer, Weiterstadt). Dieser Ready Mix enthielt im Einzelnen A-Dye-, C-Dye-, G-Dye- und T-Dye Terminator Nukleotide, Deoxynukleotid Triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), AmpliTaq DNA Polymerase, Magnesiumchlorid, Tris-HCl Puffer (pH 9,0).

Es wurde dazu ein M13 forward Primer (Perkin Elmer, Weiterstadt mit der Sequenz: GTAAAACGACGGCCAGT, Konzentration: 3.2 pmol) und ein M13 reverse Primer (CAGGAAACAGCTATGAC) für die Amplifikation der DNA-Fragmente verwendet.

Für jeden Reaktionsansatz der Sequenzierungs-PCR wurden je 8 µl Terminator Ready Mix, je 1 µl M13 Sequence Primer (bzw. M13 Reverse Sequence Primer), je 7 µl H₂O ad iniectionabilia

und je 4 µl des aufgereinigten PCR-Produktes verwendet, so dass das Gesamtreaktionsvolumen dieser PCR 20µl betrug.

25 Zyklen der Sequenzierungs-PCR wurden unter folgenden Reaktionsbedingungen durchgeführt:

96° C für 10 Sekunden

50° C für 5 Sekunden

60° C für 4 Minuten

Nach Beendigung der 25 Zyklen wurden die Proben auf 4° C herabgekühlt und bei dieser Temperatur bis zum weiteren Vorgehen aufbewahrt.

Für die Sequenzierungs-PCR wurde der Thermozykler GeneAmp 9600 (Perkin-Elmer, Weiterstadt) verwendet. Die Sequenzierungs-PCR wurde von allen anderen Reaktionen räumlich getrennt durchgeführt.

2.4.3 Fällung und Aufreinigung der Sequenzierungs-PCR-Produkte

Die folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Zentrifugiert wurde bei 4° C in einem Kühlraum.

Für jede Reaktion wurde je ein 1.5 ml Reaktionsgefäß mit jeweils 2.0 µl 3M Natrium-Acetat Lösung (pH 5.2) und 50 µl 95%iger Ethanol auf Eis vorbereitet.

Zu dieser Ethanol Lösung wurde das gesamte Reaktionsvolumen der Sequenzierungs-PCR (20 µl) hinzugegeben, vermischt und in einer Mikrozentrifuge 30 Minuten bei 13000 U/min bei 4°C zentrifugiert, um Pellets zu bilden. Anschließend wurde die Ethanol Lösung mit einer Mikropipette vorsichtig aspiriert. Dabei wurde beachtet, die Lösung möglichst vollständig und das entstandene Pellet nicht aufzunehmen.

Zum Pellet wurden 250 µl 70%iger Ethanol gegeben und bei 13000 U/min 5 min lang zentrifugiert. Danach wurde die Ethanol Lösung weitestgehend aufgenommen und die Pellets in einer Vakuum-Zentrifuge getrocknet.

Das getrocknete Pellet wurde in 5 µl einer 5:1 Lösung aus deionisiertem Formamid und Äthylendiamintetraessigsäure (EDTA) aufgelöst und bei -20° C bis zur Sequenzierung aufbewahrt.

2.4.4 DNA-Sequenzierungsgel

-Herstellung der 40%igen Polyacrylamidlösung:

Eine 19:1 Mischung aus Acrylamid und Bisacrylamid wurde in bidestilliertem Wasser bis zur Lösung der Acryle verrührt. Nach Zugabe von 8 g Ionenabsorber (Serdolit MB-2, Serva, Heidelberg) und weiterem Verrühren für die Dauer von 30 min wurde die Lösung durch einen 0.2 µm Filter abfiltriert und in einer lichtgeschützten Flasche im Kühlschrank aufbewahrt.

-Herstellung des 10fach konzentrierten TBE-Puffers:

In einem Liter Aqua bidestillata wurden unter ständigem Rühren 108 g Tris, 55 g Borsäure und 9.3 g EDTA bzw. Titriplex gelöst.

Der pH-Wert des Puffers wurde mittels eines pH-Meters und gegebenenfalls durch Zugabe von geeigneten Mengen an NaOH oder HCl auf pH 8.3 titriert.

-Herstellung des Polyacrylamid-Sequenzierungsgels:

In einem 200 ml Erlenmeyer-Kolben wurden 30 g Harnstoff in 23.5 ml bidestilliertem Wasser bei ca. 50° C verrührt, bis dass der Harnstoff sich löste. Nach Zugabe von 9 ml Polyacrylamidlösung und 8 g Ionenabsorber (Serdolit MB-2, Serva, Heidelberg) wurde die Lösung bei gleicher Temperatur 30 min vermischt. Danach wurde sie durch einen 0.2 µm Filter filtriert und mittels einer Wasserstrahlpumpe entgast. Zu dieser Lösung wurden dann 6.0 ml zehnfach konzentrierter Tris-Borsäure-EDTA-Puffer (TBE), 24 µl Tetramethylethylendiamin (TEMED) und 180 µl 10%ige Ammoniumpersulfatlösung addiert. Eine Übersicht hierzu gibt Tabelle 2.4.

Nach erneutem Vermischen wurde die Lösung mit einer 50 ml Spritze aufgenommen und von der Stirnseite aus sofort zwischen die vorbereiteten Glasplatten gegossen. Nach umgekehrten Einsetzen des Sequenzierungskammes als Platzhalter für eine gerade Geloberkante polymerisierte das Gel in horizontaler Lage 2 Stunden bei 25° C Raumtemperatur.

Nach abgeschlossener Polymerisation wurden die Klammern entfernt und das Gel in den Sequenzierer eingesetzt.

30	g	Harnstoff
23.5	ml	Aqua bidestillata
9.0	ml	40%ige Polyacrylamidlösung
6.0	ml	10fach konzentrierter TBE-Puffer, pH 8.3
24	µl	Tetramethylethyldiamin (TEMED)
180	µl	10%ige Ammoniumpersulfatlösung

Tabelle 2.4. Inhaltsstoffe des 6%igen DNA-Sequenzierungsgels

-Probenbeladung und Vorlauf des Polyacrylamidgels:

Die Dichtungen der Elektrophorese-Kammern wurden mit Vaseline bestrichen und daraufhin die Kammern im Sequenzierer horizontal plaziert. Dann wurden sie mit einfach konzentriertem TBE-Puffer gefüllt und für eine halbe Stunde ein Vorlauf ohne Probenbeladung durchgeführt.

Danach wurde der umgekehrt eingesetzte Kamm entnommen. Um die 24 Probenaschen zu erzeugen, wurde er mit den Zacken voran ca. 2 mm in die Oberkante des Gels hineingedrückt. Aus der oberen Gelkante diffundierter Harnstoff wurde durch vorsichtiges Spülen der Taschen mit TBE-Puffer beseitigt.

Die in Formamid und EDTA gelösten Amplifikate wurden bei 95° C eine Minute denaturiert und bis zur Beladung des Sequenzierers bei 4° C aufbewahrt.

Um Störung durch Vermischung der Proben zu vermeiden, wurden bei der Probenbeladung zunächst alle Amplifikate mit ungerader Taschennummer aufgetragen und ein weiterer Vorlauf von 20 min durchgeführt. Danach wurden die restlichen Proben mit gerader Taschennummer in den Sequenzierer eingefüllt.

-Sequenzierungsvorgang:

Sequenziert wurde über eine Dauer von 14 Stunden bei einer Leistung von 30 Watt.

Bei jeder Sequenzierung wurde zusätzlich eine Kontrollsequenz (pGEM-3Zf+, Perkin-Elmer, Weiterstadt) mitgeführt und sequenziert.

2.5 Sequenzanalyse

2.5.1 Sequenzierer

Bei dem verwendeten Sequenzierer handelt es um einen Laser Sequenz Analysierer (373 DNA Sequencer, Applied Biosystems, Weiterstadt) in Kombination mit einem handelsüblichen Macintosh Computer. Abbildung 2.5 verdeutlicht das Funktionsprinzip des Sequenzierers.

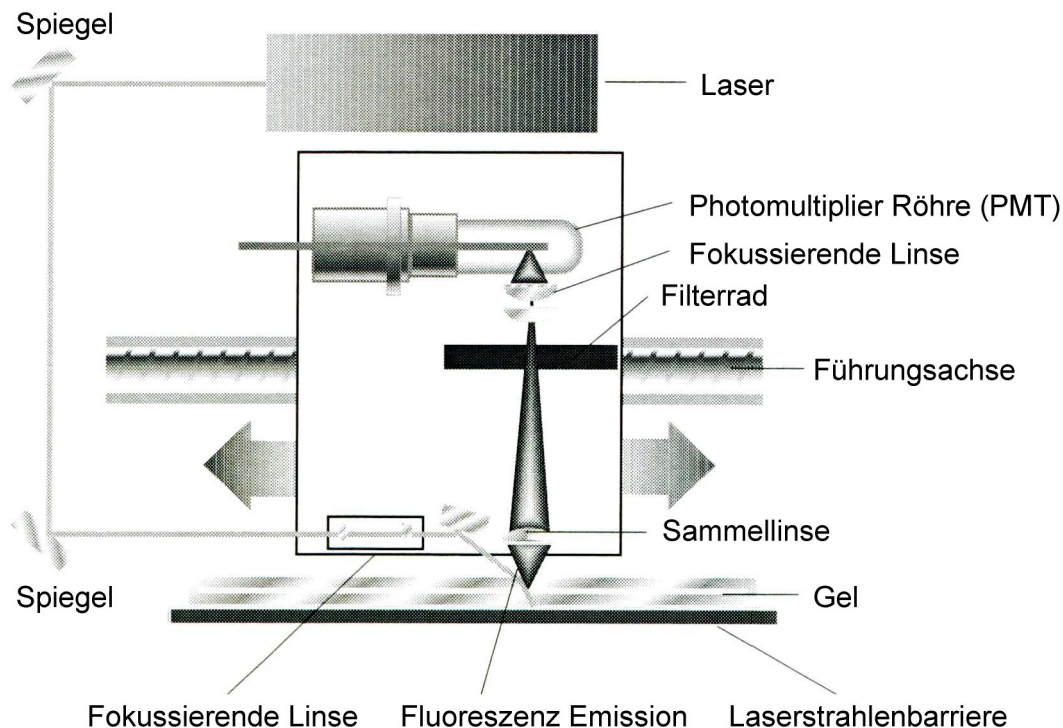


Abbildung 2.5. Schema der Funktionsweise des ABI 373 DNA Sequencer. Die durch den Laser beleuchteten farbmarkierten DNA-Amplifikate im Sequenzierungsgel emittieren Fluoreszenzsignale, die über ein Linsen- und Verstärkungssystem aufgenommen und an einen PC (nicht in Abb.) zur Wiedergabe weitergegeben werden.

Der Ausdruck der Sequenzen erfolgte durch einen handelsüblichen Farbtintenstrahldrucker HP 560C (Hewlett Packard, Boise, USA).

2.5.2 Hardware/Software

Die erhaltenen Sequenzen wurden auf einem Personal Computer weiterverarbeitet. Dazu wurde das Computerprogramm Lasergene (DNASTar Inc, Madison, USA) mit seinen Modulen EditSeq und MegAlign verwendet.

2.6 Quantitativer HBsAg-Assay

Die HBsAg-Quantifizierung wurde mittels Laurell Elektrophorese durchgeführt [44] . Hierzu wurden Glasschieber mit 6 ml 0.6% Agarose, die 10000 U/ml polyvalente Anti-HBs Antikörper in Laurell-Puffer enthält, überzogen. Pro Probe wurden 10 µl Serum aufgetragen und bei 5 mA für 12 Stunden elektrophoriert. Mittels Kalibrierungskurven von Referenzseren konnten die Präzipitationsbögen in Gewicht pro Volumen (µg HBsAg/ml) konvertiert werden. Für stärker konzentrierte Proben wurden verdünnte Testreihen durchgeführt. Eine WHO-Einheit entspricht dabei ca. 0.5 ng HBsAg.

2.7 Statistik

Die statistischen Daten wurden mit SPSS für Windows (SPSS, München) errechnet. Dabei wurden Vergleiche zwischen zwei Charakteristika mit dem zweiseitigen, exakten Test nach Fischer ausgewertet. Der t-Test nach Student wurde angewandt für kontinuierliche Variablen, wohingegen nicht-parametrische Daten mittels des Mann-Whitney-Tests auf Signifikanz überprüft wurden. Weiterhin wurden logistische Regressionsanalysen durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Klinische Parameter

Von den Patienten mit chronischer Hepatitis B, die sich zwischen 1988 und 1998 in unserer Klinik vorstellten, wurden 37 mit chronisch-replikativer, HBeAg-negativer HBV Infektion zur Untersuchung zugelassen.

Eine Übersicht über ihre klinischen Parameter gibt Tab. 3.1.

Klinischer Parameter	Werte absolut	Werte Prozent	Mittel- wert m	Stand.- abwchg SD	Stand.- fehler SEM	Spann- weite RG
Geschlecht (männl/weibl)	30/7	81/19	-	-	-	-
Herkunft (hohe/niedrige Prävalenz)	17/20	46/54	-	-	-	-
Leberzirrhose ¹	12	32	-	-	-	-
Alter [Jahre]	-	-	43.5	12.3	2.0	20-73
Erkrankungsdauer [Monate]	-	-	140.4	151.0	27.6	12-636
ALT [U/l]	-	-	114.7	78.7	12.9	14-265
AST [U/l]	-	-	63.3	45.0	7.7	12-207
HBsAg [Log µg/ml]	-	-	0.71	0.76	0.13	-1-2.29
DNA [Log pg/ml]	-	-	2.2	1.1	0.17	1-3.9

Tabelle 3.1. Klinische Parameter

¹ Bei 8 Patienten wurden sonographisch keine Leberveränderungen festgestellt, so dass nur 29 der 37 Patienten leberpunktiert und histologisch untersucht wurden.

3.1.1 Klinische Parameter: Analyse und Korrelationen

Korrelationen des **Geschlechts** der Patienten mit anderen Charakteristika ergaben keine signifikanten Ergebnisse.

Unter den 12 Patienten mit diagnostizierter Leberzirrhose befinden sich 9 (75%) aus Gebieten mit niedriger **Prävalenz** versus 3 (25%) aus Gebieten mit hoher Prävalenz. Demgegenüber stammen 8 der 17 Patienten ohne Zirrhose (47.1%) aus niedrigprävalenten und 9 (52.9%) aus hochprävalenten Gebieten ($p < 0.14$).

Das Patientenalter, die Höhe der Aminotransferasen, die Dauer der Erkrankung und die HBV-DNA-Menge unterscheiden sich dabei nicht zwischen Hoch- und Niedrig-Prävalenz-Gebieten.

Patienten mit **Leberzirrhose** sind im Mittel signifikant älter ($m_Z = 55.5$ Jahre, $SD_Z = 8.2$, $SEM_Z = 2.4$) als Patienten ohne Zirrhose ($m_{NZ} = 35.1$ Jahren, $SD_{NZ} = 9.5$, $SEM_{NZ} = 2.3$) ($p < 0.0001$). Dies illustriert die Abb. 3.1.

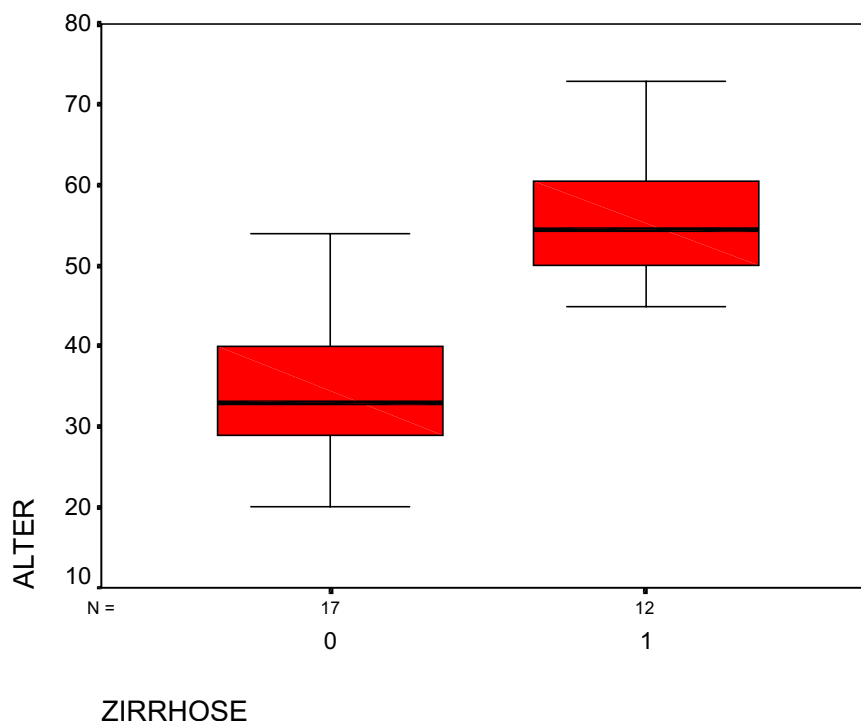


Abbildung 3.1. Verteilung des Alters bei Patienten ohne (0) und mit (1) Leberzirrhose. Patientenalter in Jahren. N=Anzahl der Patienten.

Darüberhinaus präsentieren Zirrhotiker niedrigere HBsAg-Titer ($m_Z = \text{Log } \mu\text{g/ml}$, $SD_Z = 8.2$, $SEM_Z = 2.4$) als Patienten ohne Zirrhose ($m_{NZ} = 35.1$ Jahren, $SD_{NZ} = 9.5$, $SEM_{NZ} = 2.3$) ($p < 0.0001$). Korrelationen von Zirrhose und anderen Charakteristika ergaben keine Signifikanz.

Patienten mit und ohne Leberzirrhose unterscheiden sich in ihrer **Erkrankungsdauer** nicht signifikant voneinander.

Zwischen der Erkrankungsdauer und anderen Patientencharakteristika ergaben sich keine signifikanten Ergebnisse.

Hohe ALT-Titer ($hALT > 75 \text{ U/l}$) gehen mit hohen HBV-DNA-Titern einher und niedrige ALT-Titer ($nALT < 75 \text{ U/l}$) mit niedrigen HBV-DNA-Werten ($m_{hALT} = 2.46 \text{ Log pg/ml}$, $SD_{hALT} = 0.95$, $SEM_{hALT} = 0.21$ versus $m_{nALT} = 1.86 \text{ Log pg/ml}$, $SD_{nALT} = 1.13$, $SEM_{nALT} = 0.28$, $p < 0.09$).

Da die Werte von Alanin-**Aminotransferase** und Aspartat-Aminotransferase signifikant miteinander korrelieren ($p < 0.001$), gilt auch für AST-Titer und HBV-DNA eine signifikante Korrelation ($p < 0.036$).

Patienten mit hohem **HBsAg**-Titer ($hHBsAg > m = 0.71 \text{ Log } \mu\text{g/ml}$) haben signifikant seltener Leberzirrhose als Patienten mit niedrigem HBsAg-Spiegel ($nHBsAg$) ($m_{hHBsAg} = 0.21$, $SD_{hHBsAg} = 0.43$, $SEM_{hHBsAg} = 0.11$ versus $m_{nHBsAg} = 0.64$, $SD_{nHBsAg} = 0.50$, $SEM_{nHBsAg} = 0.15$, $p < 0.033$).

Darüberhinaus sind Patienten mit hohem **HBsAg**-Titer ($> m = 0.71 \text{ Log } \mu\text{g/ml}$) statistisch signifikant jünger als HBsAg-niedrigtitrige Patienten ($m_{hHBsAg} = 39.4 \text{ J}$, $SD_{hHBsAg} = 12.2$, $SEM_{hHBsAg} = 2.7$ versus $m_{nHBsAg} = 50.2 \text{ J}$, $SD_{nHBsAg} = 10.2$, $SEM_{nHBsAg} = 3.0$, $p < 0.015$).

Der HBV-**DNA**-Titer im Zusammenhang mit weiteren Parametern ergab keine statistische Signifikanz.

3.2 Sequenzen von X-Gen und X-Promotor

3.2.1 Sequenzen: Rohdaten

In den folgenden Abschnitten sind die Sequenzen ihren genotypspezifischen Consensussequenzen und einander gegenübergestellt. Ein Punkt (.) bedeutet dabei Übereinstimmung mit der Consensussequenz des zugehörigen Genotyps. Abweichungen hiervon werden mit dem entsprechenden Nukleotid bzw. der Aminosäure im Ein-Buchstaben-Code angegeben. Unterschiede zwischen den Genotypen im Consensus sind grau unterlegt.

Darüberhinaus wurde auf die Aminosäureansicht des X-Promotors verzichtet, da dieser kein Protein darstellt.

3.2.1.1 Sequenzen des X-Gens in der Nukleotidansicht

Nukleotid	1374	1380	1390	1400	1410	1420
						
Genotyp A	ATGGCTGCTAGGCTGT	ACTGCCAACTGGATCCT	TCGCGGGACGTCCT			
Genotyp B	ATGGCTGCTAGGCTGT	GCTGCCAACTGGATCCT	GCGCGGGACGTCCT			
Genotyp C	ATGGCTGCT	CGGGTGTGCTGCCAACTGGATCCT	GCGCGGGACGTCCT			
Genotyp D	ATGGCTGCTAGGCTGT	GCTGCCAACTGGATCCT	GCGCGGGACGTCCT			

Therapierte Patienten

mit dauerhaftem Therapieerfolg (Sustained response)

Nukleotid	1374	1380	1390	1400	1410	1420
Patient: Genotyp:						
1 A			G.....		G.....	
2 A						
3 A			G.....		G.....	
4 A					G.....	
5 A		A.....	G.....			
6 A						
7 A						
8 D						
9 D						
10 D						
11 D						

ohne Therapieerfolg (Nonresponse)

Nukleotid	1374	1380	1390	1400	1410	1420
Patient: Genotyp:						
12 A					G.....	
13 A						
14 A						
15 A						
16 A			G.....			
17 D						
18 D						
19 D						
20 D					A.....	
21 D						
22 D						
23 D		C.....				
24 D						
25 D						
26 D						
27 D						
28 D						A.....
29 D				T.....		

Nicht therapierte Patienten

Nukleotid	1374	1380	1390	1400	1410	1420
Patient: Genotyp:						
30 A			G.....			
31 A			A.....			
32 A					G.....	
33 A			G.....		G.....	
34 C		A.....	A.....			
35 D						
36 D						
37 D			T.....			

3. Ergebnisse

Nukleotid	1421	1430	1440	1450	1460	1470
						
Genotyp A	TTGTTTACGTCCCGTCGGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCCTCTCGGGGC					
Genotyp B	TTGTTTACGTCCCGTCGGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCCTCCCGGGGC					
Genotyp C	TTGTCACGTCCCGTCGGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCGTCTCGGGGC					
Genotyp D	TTGTTTACGTCCCGTCGGCGCTGAATCCCGCGGACACCCCTCTCGGGGT					

Therapierte Patienten

mit dauerhaftem Therapieerfolg (Sustained response)

Nukleotid		1421	1430	1440	1450	1460	1470
Patient: Genotyp:							
1	A					T.....	T.....
2	A						
3	A					A.....	
4	A						
5	A						
6	A						
7	A						
8	D						C.....
9	D				T.....		
10	D						
11	D						C.....

ohne Therapieerfolg (Nonresponse)

Nukleotid		1421	1430	1440	1450	1460	1470
Patient: Genotyp:							
12	A						
13	A						
14	A						
15	A						
16	A						
17	D					G.....	C.....
18	D					A.....G.....	C.....
19	D						C.....
20	D					A.....	
21	D						C.....
22	D						
23	D						C.....
24	D						C.....
25	D					G.....	C.....
26	D				T.....		
27	D						
28	D						C.....
29	D					AG.....	C.....

Nicht therapierte Patienten

Nukleotid		1421	1430	1440	1450	1460	1470
Patient: Genotyp:							
30	A						
31	A						
32	A						
33	A				T.....	A.....G.....	T.....
34	C	T.....					
35	D		A.....			G.....	
36	D				T.....		
37	D						

3. Ergebnisse

Nukleotid	1471	1480	1490	1500	1510	1520
						
Genotyp A	CGCTTGGGACTCTCTCGTCCCCTTCTCCGTCTGCCGTTCCAGCCGACCAC					
Genotyp B	CGCTTGGGGCTCTACCGCCCGCTTCTCCGTCTGCCGTACCGACCGACCAC					
Genotyp C	CGTTTGGGCCTCTACCGTCCCCTTCTTCATCTGCCGTTCCGGCCGACCAC					
Genotyp D	CGCTTGGGACTCTCTCGTCCCCTTCTCCGTCTGCCGTTCCGACCGACCAC					

Therapierte Patienten

mit dauerhaftem Therapieerfolg (Sustained response)

Nukleotid		1471	1480	1490	1500	1510	1520
Patient: Genotyp:							
1	A					G.....	
2	A	C.....				G.....	
3	A		A.....A.....				
4	A		A.....		T.....		
5	A						
6	A						
7	A						
8	D		GG...T.....		T.....	T.....T.....	
9	D		T.....			T.....	
10	D					A.....	
11	D		G.....			T.....	

ohne Therapieerfolg (Nonresponse)

Nukleotid		1471	1480	1490	1500	1510	1520
Patient: Genotyp:							
12	A						
13	A		A.....				
14	A						
15	A					A.....	
16	A		A.....				
17	D					T.....	
18	D		CA.....			T.....	
19	D					T.....	
20	D		GG...T.....			T.....T.....	
21	D					T.....	
22	D						
23	D					T.....A.....	
24	D		GA...T.....			T.....T.....	
25	D			T.....		T.....	
26	D						
27	D				T.C.....		
28	D		G.C..G.....				
29	D					T.....	

Nicht therapierte Patienten

Nukleotid		1471	1480	1490	1500	1510	1520
Patient: Genotyp:							
30	A						
31	A						
32	A						
33	A					GA..A.....	
34	C				C.G.....	A.....	
35	D					T.....	
36	D						
37	D						

3. Ergebnisse

Nukleotid	1521	1530	1540	1550	1560	1570
						
Genotyp A	GGGGCGCACCTCTCTTTACGCGG	TCTCCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGC				
Genotyp B	GGGGCGCACCTCTCTTTACGCGG	ACTCCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGC				
Genotyp C	GGGGCGCACCTCTCTTTACGCGG	TCTCCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGC				
Genotyp D	GGGGCGCACCTCTCTTTACGCGG	ACTCCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGC				

Therapierte Patienten

mit dauerhaftem Therapieerfolg (Sustained response)

Nukleotid		1521	1530	1540	1550	1560	1570
Patient: Genotyp:							
1	A	A.....					
2	A						
3	A						
4	A						
5	A						
6	A						
7	A						
8	D						
9	D						
10	D						
11	D						

ohne Therapieerfolg (Nonresponse)

Nukleotid		1521	1530	1540	1550	1560	1570
Patient: Genotyp:							
12	A						
13	A						
14	A						
15	A						
16	A						
17	D						
18	D						
19	D						
20	D						
21	D						
22	D						
23	D						
24	D	G.....					
25	D						
26	D						
27	D						
28	D						
29	D						

Nicht therapierte Patienten

Nukleotid		1521	1530	1540	1550	1560	1570
Patient: Genotyp:							
30	A	C.....					
31	A						
32	A						
33	A	A.....C.....					
34	C	A.....A.....					
35	D						
36	D	C.....					
37	D						

3. Ergebnisse

Nukleotid	1571	1580	1590	1600	1610	1620
						
Genotyp A	CGG	CCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGT			TGCATGGAGACCACCG	
Genotyp B	CGG	ACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGT			CGCATGGAGACCACCG	
Genotyp C	CGG	ACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGT			CGCATGGAGACCACCG	
Genotyp D	CGG	ACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGT			CGCATGGAGACCACCG	

Therapierte Patienten

mit dauerhaftem Therapieerfolg (Sustained response)

Nukleotid	1571	1580	1590	1600	1610	1620
Patient: Genotyp:						
1	A	...A.....			C.....	
2	A				A.	
3	A					
4	A				A.....	
5	A					
6	A					
7	A				G.....	
8	D					
9	D					
10	D					
11	D					

ohne Therapieerfolg (Nonresponse)

Nukleotid	1571	1580	1590	1600	1610	1620
Patient: Genotyp:						
12	A					
13	A					
14	A					
15	A					
16	A	Insertion zw 1606 u 1607			TCGCATGGG	
	...	A.....			C.....	
17	D					
18	D					
19	D					
20	D				A.....	
21	D					
22	D		A.....			
23	D				T.....	
24	D	T.....				
25	D					
26	D					
27	D					
28	D					
29	D					

Nicht therapierte Patienten

Nukleotid	1571	1580	1590	1600	1610	1620
Patient: Genotyp:						
30	A					
31	A					
32	A					
33	A	...A.....				
34	C					
35	D					
36	D					
37	D					

3. Ergebnisse

Nukleotid	1621	1630	1640	1650	1660	1670
						
Genotyp A	TGAACGCCC	T	CAGATC	CTGCCCAAGGTCTTACATAAGAGGACTCTTGGA		
Genotyp B	TGAACGCCCACCG	G	AAC	TGCCCAAGGTCTT	G	CATAAGAGGACTCTTGGA
Genotyp C	TGAACGCCCACCA	G	CT	TGCCCAAGGTCTTACATAAGAGGACTCTTGGA		
Genotyp D	TGAACGCCCACCA	A	ATCT	TGCCCAAGGTCTTACATAAGAGGACTCTTGGA		

Therapierte Patienten

mit dauerhaftem Therapieerfolg (Sustained response)

Nukleotid	1621	1630	1640	1650	1660	1670
Patient: Genotyp:						
1	A					
2	A					
3	A					
4	A				T	
5	A					
6	A					
7	A					
8	D		T		T	
9	D					
10	D		A			
11	D	T	T			

ohne Therapieerfolg (Nonresponse)

Nukleotid	1621	1630	1640	1650	1660	1670
Patient: Genotyp:						
12	A					
13	A					
14	A					
15	A					
16	A	C	A	AT		
17	D	T	C	G	A	
18	D		G	T		G
19	D	T		T		
20	D	A		T	A	
21	D		T			G
22	D		C	A		T
23	D		T			
24	D		T			
25	D		T			
26	D		A			
27	D		A			T
28	D					
29	D		T			A

Nicht therapierte Patienten

Nukleotid	1621	1630	1640	1650	1660	1670
Patient: Genotyp:						
30	A					
31	A					
32	A					
33	A			G		
34	C		T			
35	D		CT		G	
36	D		A			
37	D		GT			

3. Ergebnisse

Nukleotid	1671	1680	1690	1700	1710	1720
						
Genotyp A	CTC	CAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGC			TACTTCAAAGACTGT	GT
Genotyp B	CTT	CAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTGT				GT
Genotyp C	CTCTCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTGTTT					
Genotyp D	CTCTC	TGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTGTTT				

Therapierte Patienten

mit dauerhaftem Therapieerfolg (Sustained response)

Nukleotid		1671	1680	1690	1700	1710	1720
Patient: Genotyp:							
1	A	...T.T.					
2	A						
3	A						
4	A						
5	A	...T.T.T.			A.		T.
6	A						
7	A						
8	D						
9	D	T.					
10	D						
11	D	T.C.					

ohne Therapieerfolg (Nonresponse)

Nukleotid		1671	1680	1690	1700	1710	1720
Patient: Genotyp:							
12	A	A.					
13	A						
14	A						
15	A						
16	A	...T.T.			A.		
17	D	T.					
18	D	T.					
19	D	T.					
20	D	T.					
21	D	T.					
22	D	T.					
23	D	T.					
24	D	T.					
25	D	T.					
26	D	...C...T.					
27	D	...A.					
28	D	...A.					
29	D	T.					

Nicht therapierte Patienten

Nukleotid		1671	1680	1690	1700	1710	1720
Patient: Genotyp:							
30	A						T.
31	A	T.					
32	A						
33	A						
34	C	AT.					
35	D	TG.		A.			
36	D						
37	D	T.					

3. Ergebnisse

Nukleotid	1721	1730	1740	1750	1760	1770
						
Genotyp A	GTTTAA	GACTGGGAGGAG	CTGGGGGAGGAGATTAGGTTAAAGGTCTTTG			
Genotyp B	GTTTAATGAC	TGGGAGGAGCTGGGGGAGGAGATTAGGTTAAAGGTCTTTG				
Genotyp C	GTTTAAAGACTGGGAGGAGCTGGGGGAGGAGATTAGGTTAAAGGTCTTTG					
Genotyp D	GTTTAAAGACTGGGAGGAGCTGGGGGAGGAGATTAGATTAAAGGTCTTTG					

Therapierte Patienten

mit dauerhaftem Therapieerfolg (Sustained response)

Nukleotid		1721	1730	1740	1750	1760	1770
Patient: Genotyp:							
1	A					A.....	
2	A				A.....	T.A...	A...
3	A				A.....		
4	A		A.....			A.....	
5	A		A.....	T.....	C.....	A.....	
6	A			G.....			
7	A					T.A.....	
8	D				C.....		
9	D				C.....	T.A.....	
10	D		A.....	A.....		G.....	
11	D				C.....		

ohne Therapieerfolg (Nonresponse)

Nukleotid		1721	1730	1740	1750	1760	1770
Patient: Genotyp:							
12	A	..G..T.....	A.....		A.....		
13	A					//////////	
14	A				C.....	TTA.....	
15	A					A...G.T.G....	
16	A				C.....	T.A.....	
17	D					T.G.....	
18	D					CA.....	
19	D						
20	D				C.....		
21	D		G..T.....		A...G....	T.A.....	
22	D				C.....	T.A.....	
23	D		G.....		A...G....	T.A.....	
24	D		G.....		A.....	T.A.....	
25	D		G.....		C.....	T.A.....	
26	D					CG.T.G....	
27	D			A.....	C.....	T.A.....	
28	D			C.....	C.....	T.A.....	
29	D		T.....		C..TG....	T.A.....	

Nicht therapierte Patienten

Nukleotid		1721	1730	1740	1750	1760	1770
Patient: Genotyp:							
30	A					A.T.....	
31	A					A.....	
32	A				C.....	T.A.....	
33	A					A.....	
34	C					T.A.....	
35	D						
36	D				C.....	A.....	
37	D	Ins zw. 1755 u.56: AAGTAATGGAACGATTTGGGGGAGGAGATT			T.....		

3. Ergebnisse

Nukleotid	1771	1780	1790	1800	1810	1820
						
Genotyp A	TAT	TAGGAGGCTGTAGGCATAAAATTGGTCTG	CG	CACCAGCACCATGCAAC		
Genotyp B	TACTAGGAGGCTGTAGGCATAAAATTGGTCTG	TT	CACCAGCACCATGCAAC			
Genotyp C	TACTAGGAGGCTGTAGGCATAAAATTGGTCTG	TT	CACCAGCACCATGCAAC			
Genotyp D	TACTAGGAGGCTGTAGGCATAAAATTGGTCTG	CG	CACCAGCACCATGCAAC			

Therapierte Patienten

mit dauerhaftem Therapieerfolg (Sustained response)

Nukleotid	1771	1780	1790	1800	1810	1820
Patient: Genotyp:						
1	A					
2	A					
3	A					
4	A					
5	A	..C.....				
6	A					
7	A				C.....	
8	D					
9	D				T.....	
10	D					
11	D					

ohne Therapieerfolg (Nonresponse)

Nukleotid	1771	1780	1790	1800	1810	1820
Patient: Genotyp:						
12	A					
13	A	.T.....G...T..GG.....//.....				
14	A	.G..G.....T..G.....C.....				
		Insertion zw Nt 1771 u 1772: GT				
15	A					
16	A					
17	D	..T.....G.....				
18	D	.GT..A.....G...T..G.....C.....				
19	D	..T.....G..GG.....				
20	D					
21	D	..T.....				
22	D	C.....				
23	D	..T.....				
24	D					
25	D					
26	D					
27	D					
28	D					
29	D	..T.....				

Nicht therapierte Patienten

Nukleotid	1771	1780	1790	1800	1810	1820
Patient: Genotyp:						
30	A					
31	A					
32	A					
33	A					
34	C					
35	D	..T.....				
36	D					
37	D	..T.....G.....				

Nukleotid	1821	1830	1840	1850
				
Genotyp A	TTTTTCACCTCTGCCTAA			
Genotyp B	TTTTTCACCTCTGCCTAA			
Genotyp C	TTTTTCACCTCTGCCTAA			
Genotyp D	TTTTTCACCTCTGCCTAA			

Therapierte Patienten

mit dauerhaftem Therapieerfolg (Sustained response)

Nukleotid		1821	1830	1840	1850
Patient: Genotyp:					
1	A				
2	A				
3	A				
4	A				
5	A				
6	A				
7	A				
8	D				
9	D				
10	D				
11	D				

ohne Therapieerfolg (Nonresponse)

Nukleotid		1821	1830	1840	1850
Patient: Genotyp:					
12	A				
13	A				
14	A			C.....	
15	A				
16	A				
17	D				
18	D				
19	D				
20	D				
21	D				
22	D				
23	D				
24	D				
25	D				
26	D				
27	D				
28	D				
29	D				

Nicht therapierte Patienten

Nukleotid		1821	1830	1840	1850
Patient: Genotyp:					
30	A				
31	A				
32	A				
33	A				
34	C				
35	D				
36	D				
37	D				

Abbildung 3.2.1. Sequenzen des X-Gens in der Nukleotidansicht. Gegenüberstellung der Sequenzen der Patienten-HBV-DNA und der genotypspezifischen Consensus. Ein Punkt (.) bedeutet dabei Übereinstimmung mit der Consensussequenz des zugehörigen Genotyps. Abweichungen hiervon werden mit dem entsprechenden Nukleotid angegeben. Unterschiede zwischen den Genotypen im Consensus sind grau unterlegt.

3.2.1.2 Sequenzen des X-Gens in der Aminosäurenansicht

Aminosäure	1	10	20	30	40	50
Genotyp A	MAARLYCQLDPS	SRDVLCLRPVGAESRGRPLSGPLGTL	SSPSPSAVP	ADHG		
Genotyp B	MAARLCCQLDP	ARDVLCLRPVGAESRGRPL	FGPLGALPPAS	PSAVPT	DHG	
Genotyp C	MAARVCCQLDP	ARDVLCLRPVGAESRGRPVSGP	FGPLPSPSS	SAVP	ADHG	
Genotyp D	MAARLCCQLDP	ARDVLCLRPVGAESRGRPF	SGSLGTL	SSPSPSAVP	PT	DHG

Therapierte Patienten

mit dauerhaftem Therapieerfolg (Sustained response)

Aminosäure	1	10	20	30	40	50
Patient: Genotyp:						
1	A	C.....A.....	F..S.....			
2	A		P.....			
3	A	C.....W.....	Q.....N.....			
4	A	A.....	T.....			
5	A	MC.....				
6	A					
7	A					
8	D		P..G.....P..SS...			
9	D		C.....F.....SP...			
10	D			Q.....		
11	D	I.....	P..A.....LP.....			
12	D		P..A.....S.....			

ohne Therapieerfolg (Nonresponse)

Aminosäure	1	10	20	30	40	50
Patient: Genotyp:						
13	A	A.....				
14	A					
15	A					
16	A					T.....
17	A	C.....				
18	D		V..P.....S.....			
19	D		Q.V..P..P.....S.....			
20	D		P.....S.....			
21	D	A.....	I.....G.....SS...			
22	D		P.....S.....			
23	D					
24	D		P.....S.....			
25	D		P..D.....SS...			
26	D		V..P.....S.....S.....			
27	D					
28	D		C.....			
29	D		V..P.....S.....			

Nicht therapierte Patienten

Aminosäure	1	10	20	30	40	50
Patient: Genotyp:						
30	A	C.....				
31	A	*				
32	A	A.....				
33	A	C.....A.....	C.Q.V..S.....	TN..		
34	C	M.....			A.....	
35	D		S.....V.....S.....			
36	D		C.....			
37	D					

3. Ergebnisse

Aminosäure	51	60	70	80	90	100
						
Genotyp A	AHLSLRGLPVCAFSSAGPCALRFTSAR	C	METTVNAHQILPKVLHKRTLGL			
Genotyp B	AHLSLRGLPVCAFSSAGPCALRFTSARR	METTVNAH	RNLPKVLHKRTLGL			
Genotyp C	AHLSLRGLPVCAFSSAGPCALRFTSARR	METTVNAHQVLPKVLHKRTLGL				
Genotyp D	AHLSLRGLPVCAFSSAGPCALRFTSARR	METTVNAHQILPKVLHKRTLGL				

Therapierte Patienten

mit dauerhaftem Therapieerfolg (Sustained response)

Aminosäure	51	60	70	80	90	100
Patient: Genotyp:						
1	A			R		
2	A					
3	A					
4	A					Y
5	A					
6	A					
7	A			V		H
8	D				F	
9	D				F	
10	D					
11	D					
12	D				F	

ohne Therapieerfolg (Nonresponse)

Aminosäure	51	60	70	80	90	100
Patient: Genotyp:						
13	A					
14	A					
15	A					
16	A					
	Insertion von RMG nach AS 78					
17	A			R		
18	D				PV	
19	D				RF	
20	D				F	
21	D				Q	F
22	D				F	
23	D		I		L	Y
24	D			C	F	
25	D				F	
26	D				F	
27	D					
28	D					Y
29	D				F	

Nicht therapierte Patienten

Aminosäure	51	60	70	80	90	100
Patient: Genotyp:						
30	A		P			
31	A					F
32	A					
33	A	N			S	
34	C	N	S			
35	D				HF	
36	D		P			
37	D				S	

3. Ergebnisse

Aminosäure	101	110	120	130	140	150
						
Genotyp A	P	A	M	S	T	D
Genotyp B	S	A	M	S	T	D
Genotyp C	S	A	M	S	T	D
Genotyp D	S	A	M	S	T	D

Therapierte Patienten

mit dauerhaftem Therapieerfolg (Sustained response)

Aminosäure		101	110	120	130	140	150
Patient: Genotyp:							
1	A	S					
2	A				N	MI	
3	A						
4	A						
5	A	SV		L		T	
6	A			R			
7	A				MI		R
8	D				L		
9	D	V			T	MI	
10	D			E			
11	D			S	T	MI	
12	D	VL			T		

ohne Therapieerfolg (Nonresponse)

Aminosäure		101	110	120	130	140	150
Patient: Genotyp:							
13	A			CN			
14	A				///	WG*	TSTMQL
15	A				T	II	MR
16	A				RL	Y*EAVGINWS	HQHHAT
17	A	S			T	MI	
18	D	V			L		
19	D	V			NI	R	GMR
20	D	V				GG	
21	D	V			T		
22	D	V			N	MI	
23	D				T	MI	R
24	D	V			N	MI	
25	D	V			N	MI	
26	D	V			T	MI	
27	D	P			RL		
28	D				L	MI	
29	D	V			TM	MI	

Nicht therapierte Patienten

Aminosäure		101	110	120	130	140	150
Patient: Genotyp:							
30	A			L		V	
31	A						
32	A				T	MI	
33	A						
34	C		S			MI	
35	D	V	E				
36	D				T	I	
37	D	Insert. v10AS zw AS127 u 128: K*WNDLGEEI			D		

Aminosäure 151

	
Genotyp A	FTSA*
Genotyp B	FTSA*
Genotyp C	FTSA*
Genotyp D	FTSA*

Therapierte Patienten

mit dauerhaftem Therapieerfolg (Sustained response)

Aminosäure 151

Patient: Genotyp: |....

1	A	
2	A	
3	A	
4	A	
5	A	
6	A	
7	A	
8	D	
9	D	
10	D	
11	D	
12	D	

ohne Therapieerfolg (Nonresponse)

Aminosäure 151

Patient: Genotyp: |....

13	A	
14	A	HLCLN
15	A	S
16	A	.SPLP
17	A	
18	D	
19	D	
20	D	
21	D	
22	D	
23	D	
24	D	
25	D	
26	D	
27	D	
28	D	
29	D	

Nicht therapierte Patienten

Aminosäure 151

Patient: Genotyp: |....

30	A	
31	A	
32	A	
33	A	
34	C	
35	D	
36	D	
37	D	

Abbildung 3.2.2. Sequenzen des X-Gens in der Aminosäureansicht. Gegenüberstellung der Sequenzen der Patienten-HBV-DNA und der genotypspezifischen Consensus. Ein Punkt (.) bedeutet dabei Übereinstimmung mit der Consensussequenz des zugehörigen Genotyps. Abweichungen hiervon werden mit der entsprechenden Aminosäure im Ein-Buchstaben-Code angegeben. Unterschiede zwischen den Genotypen im Consensus sind grau unterlegt.

3.2.1.3 Sequenzen des X-Promotors in der Nukleotidansicht

Nukleotid	1240	1250	1260	1270	1280	1290
						
Genotyp A	TGGAACCTTTGTGGCTCCTCTGCCGATCCATACTGCGGAACTCCTAGCCGCT					
Genotyp B	TGGAACCTTTGTGTCCTCTGCCGATCCATACTGCGGAACTCCTAGCCGCT					
Genotyp C	TGGAACCTTTGTGGCTCCTCTGCCGATCCATACTGCGGAACTCCTAGCAGCT					
Genotyp D	TGGAACCTTTCGGCTCCTCTGCCGATCCATACTGCGGAACTCCTAGCCGCT					

Therapierte Patienten

mit dauerhaftem Therapieerfolg (Sustained response)

Nukleotid	1240	1250	1260	1270	1280	1290
Patient: Genotyp:						
1	A					
2	A					
3	A					
4	A					
5	A					
6	A					
7	A					
8	D					
9	D	TC.....				
10	D	G.....				
11	D					

ohne Therapieerfolg (Nonresponse)

Nukleotid	1240	1250	1260	1270	1280	1290
Patient: Genotyp:						
12	A					
13	A					
14	A					
15	A				G.....GA	
16	A					
17	D					
18	D	G.....				
19	D	A.....				
20	D					
21	D					
22	D	T.....				
23	D	C.....A.....				
24	D	T.....				
25	D	G.....				
26	D	TC.....				
27	D	T.....				
28	D	A.....				
29	D	A.....				

Nicht therapierte Patienten

Nukleotid	1240	1250	1260	1270	1280	1290
Patient: Genotyp:						
30	A					
31	A					
32	A					
33	A					
34	C					
35	D					
36	D					
37	D	A.....				

Nukleotid	1291	1300	1310	1320	1330	1340
						
Genotyp A	TGTTTGTCTCGCAGCC	GGTCTGGAGCAAAGCT	CATCGGA	ACTGACAATTC		
Genotyp B	TGTTTGTCTCGCAGCAGGTCTGGAGCAAACT	CATCGGGACTGACAATTC				
Genotyp C	TGTTTGTCTCGCAGCCGGTCTGGAGCGAAACTT	ATCGGGACTGACAATTC				
Genotyp D	TGTTTGTCTCGCAGCAGGTCTGGAGCAAACATTC	TCGGGACGATAACTC				

Therapierte Patienten**mit dauerhaftem Therapieerfolg (Sustained response)**

Nukleotid	1291	1300	1310	1320	1330	1340
Patient: Genotyp:						
1	A	A.....				
2	A	A.....				
3	A	A.....				
4	A					
5	A					
6	A					
7	A	T.....A.....C.....				
8	D					
9	D					
10	D	G.....A.....T.....				
11	D					

ohne Therapieerfolg (Nonresponse)

Nukleotid	1291	1300	1310	1320	1330	1340
Patient: Genotyp:						
12	A	G.....				
13	A	..C.....				
14	A	G.....				
15	A					
16	A					
17	D					
18	D					
19	D					
20	D					
21	D	G..G.....				
22	D	CA.....T.....				
23	D					
24	D					
25	D	C.....				
26	D	G.....G.....T.....				
27	D	A.....T.....				
28	D					
29	D					

Nicht therapierte Patienten

Nukleotid	1291	1300	1310	1320	1330	1340
Patient: Genotyp:						
30	A					
31	A	G.....				
32	A					
33	A	G.....				
34	C	C.....				
35	D					
36	D					
37	D	A.....A.....				

Abbildung 3.2.3. Sequenzen des X-Promotors in der Nukleotidansicht. Gegenüberstellung der Sequenzen der Patienten-HBV-DNA und der genotypspezifischen Consensus. Ein Punkt (.) bedeutet dabei Übereinstimmung mit der Consensussequenz des zugehörigen Genotyps. Abweichungen hiervon werden mit dem entsprechenden Nukleotid angegeben. Unterschiede zwischen den Genotypen im Consensus sind grau unterlegt.

3.2.2 Sequenzen: Analyse und Korrelationen

3.2.2.1 Genotypen

16 der 37 Patienten (43.2%) wiesen den Genotyp A auf, ein Patient (2.7%) Genotyp C. 20 der 37 HBeAg-negativen (54.0%) konnten Genotyp D zugeordnet werden. Kein Patient entsprach den Genotypen B, E oder F.

Genotyp A korrelierte dabei mit deutscher Herkunft der Patienten ($p < 0.001$), Genotyp D befand sich signifikant häufiger unter Patienten nicht-deutscher Abstammung ($p < 0.001$) (Tab. 3.2).

Genotyp	A	C	D	Gesamt
Patientenzahl gesamt	16	1	20	37
Patienten deutscher Herkunft	15	-	6	21
Patienten mediterraner Herkunft	1	-	14	15
Patienten asiatischer Herkunft	-	1	-	1

Tabelle 3.2. Verteilung von Genotypen und Herkunft der Patienten

3.2.2.2 X-Gen

Die Anzahl der Mutationen im 465 Nukleotide langen X-Gen betrug im Mittel $m=10.6$ ($SD=7.0$, $SEM=1.1$). Dabei zeigten sich 20 Positionen, die besonders häufig (bei mindestens 5 Prozent der Patienten) verändert waren. Besonders häufig zum Consensus veränderte Nukleotide illustriert die Abb 3.2.

Veränderungen zwischen unterschiedlichen Genotypen liegen an den Nukleotiden 1382, 1392, 1407, 1425, 1461, 1464, 1470, 1473, 1479, 1484, 1485, 1488, 1491, 1497, 1499, 1508, 1511, 1512, 1544, 1574, 1605, 1631, 1633-36, 1638, 1652, 1673, 1674, 1676, 1703, 1719, 1727, 1730, 1740, 1757, 1773, 1801-02 und werden per definitionem nicht als Mutation bezeichnet. In der Übersicht der Rohdaten (Abschn. 3.2.1.1 und 3.2.1.2) sind diese Genotypspezifitäten in der Consensussequenz grau untermalt.

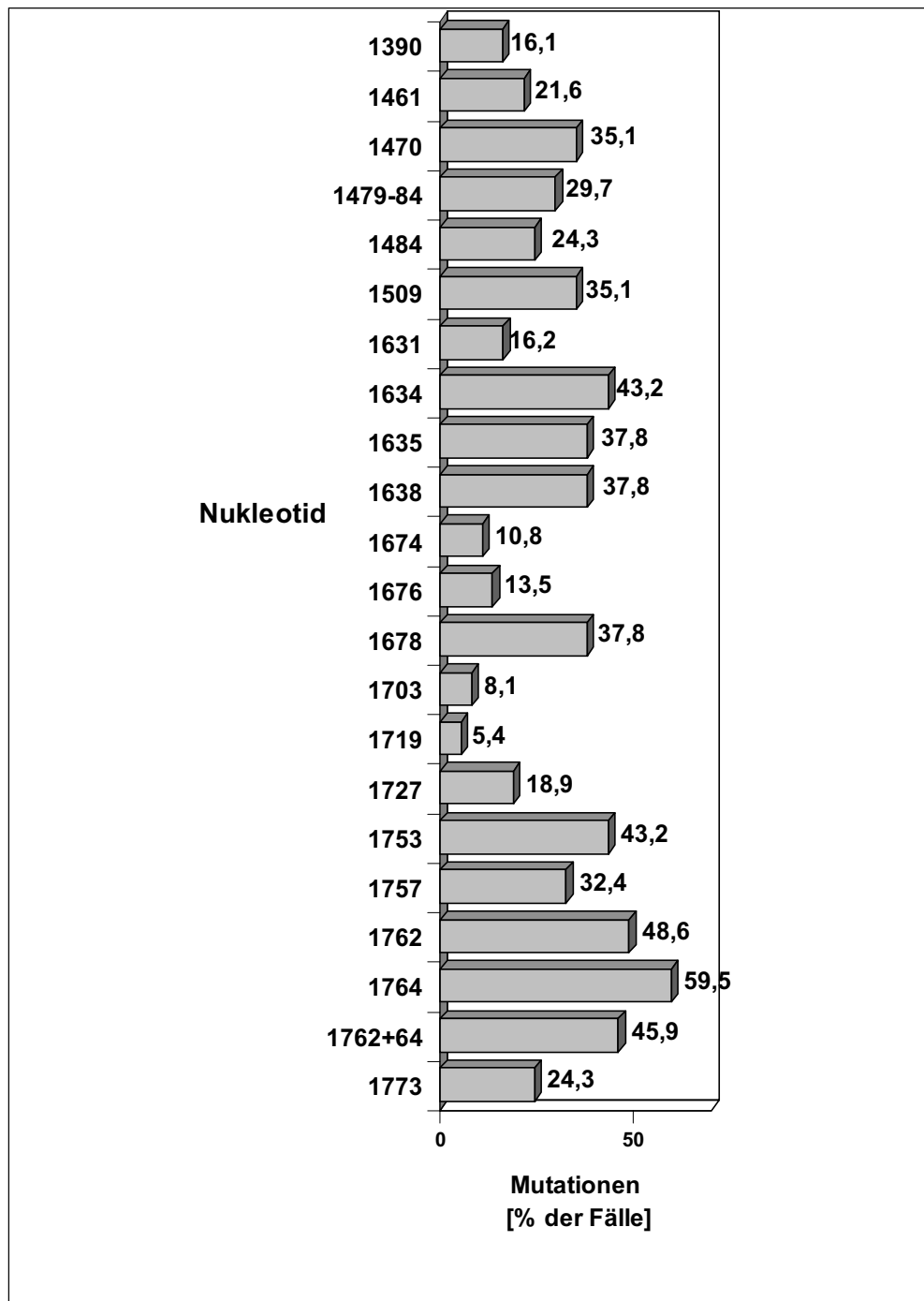


Abbildung 3.2. Mutational hotspots: Nukleotide und ihre Mutationshäufigkeiten.

Im Bereich des **Enhancers II** (Nt.1685-1773) entdeckt man insgesamt nur wenige Nt-Austausche, jedoch liegen in den Nt. 1727, 1753, 1757, 1762/64 und 1773 „mutational hotspots“.

Das **NRE** (Nt. 1611-1634) war bei allen Virussträngen gut konserviert mit nur 3 Nukleotidveränderungen bis Position Nt. 1630. Häufig veränderte Nukleotide waren Nt.1631 und 1634.

Die **CURS** (Nt. 1643-1742) zeigte sich mit nur 55 Mutationen bei 3700 Nukleotiden ebenfalls gut konserviert. Mutationen fanden sich vermehrt an den Positionen 1652 und 1653, 1674, 1676, 1678 und 1727.

Die Nukleotide des **Basalen Core Promotors** (Nt. 1742-1849) beinhalten unter anderem einen Teil der **Kunitz-Domäne** (Nt. 1761-1794), den **Direct Repeat 1** (DR1, Nt.1824-1834), die **Initiationssignale der Präcore mRNA** (Nt. 1790±1 und 1783/1784) und der **prägenomischen RNA** (Nt.1818) und drei AT-reiche Regionen (Nt. 1789-95, 1752-55, 1757-62).

Die im BCP enthaltenen Nukleotide der **Kunitz-Domäne** (Nt. 1761-1794) zeigten vor allem an den Positionen 1762 und 64 sowie an 1773 eine signifikante Austauschhäufigkeit. Die übrigen an den Nt.1542-1590 ergaben nur vereinzelte Veränderungen.

Der **Direct Repeat 1** (Nt.1824-1834) zeigte keine einzige Mutation, der **Direct Repeat 2** (Nt. 1590-1600) lediglich eine T1590A Mutation.

Die **Initiationssignale der Präcore mRNA** (Nt. 1790±1 und 1783/1784) und der **prägenomischen RNA** (Nt.1818) waren hochkonserviert und in allen Patienten mutationsfrei.

Im Bereich der **AT-reichen Regionen** (Nt. 1789-95, 1752-55, 1757-62), die zur Transkriptionsinitiation an die RNA-Polymerase binden sollen, offenbarten sich jedoch unterschiedliche Mutationshäufigkeiten. An Position 1753 fand sich in 16 Patienten ein T1753C/A Austausch. Das Nukleotid 1789 war viermal im Sinne einer C1789G Mutation verändert.

Am **Nukleotid 1762** wiesen 18 der 37 untersuchten Patienten (48.6%) eine Mutation auf. Insgesamt verteilten sich diese auf 15 Patienten (40.5%) mit Thymin, zwei Patienten (5.4%) mit Guanin und einen Patienten (2.7%) mit einer Deletion dieses Nukleotids. 19 der 37 Patienten (51.4%) entsprachen dem Adenin des Consensus aller Genotypen.

An der Position **Nt.1764** zeigten 22 der 37 Patienten (59.5%) eine Mutation. Bei 18 aller Patienten (48.6%) konnte ein Adenin nachgewiesen werden, bei drei Patienten (8.1%) ein Thymin. Ein Patient zeigte eine Deletion. Der Wildtyp (Guanin) fand sich bei 15 (40.5%) der Patienten.

Eine **Doppelmutation** der Nukleotide 1762 und 1764 wurde bei 18 Patienten (49%) signifikant aufgezeigt und war in 11 Fällen (30%) mit der 1896 Stopmutation assoziiert.

Weitere im ORF X gelegene Bindungsstellen für **Transkriptionsfaktoren**, wie für Mitglieder der Familie der Hepatocyte Nuclear Factors (HNF3 und 4) oder für den SV40 Promotor (SP1), zeigten für HNF3 bei Nukleotid 1678 in 38% eine C1678T Mutation, in der zweiten HNF3 Bindungsstelle der Nt.1713-1724 keine Mutation. Im Bereich der ersten HNF4-Bindungsstelle ließen sich lediglich eine Mutation an Nt.1671 nachweisen, an der zweiten HNF4-Bindungsstelle die mutational hotspots Nt.1757 (32,4% Mutationen), 1762 (49%), 1764 (60%). Die Sp1-Bindungsstellen waren mit 4 Mutationen an den Nt.1731-1740 und ohne Mutation an den Nt.1621-30 und 1743-1752 hochkonserviert.

In Bezug auf die **HBeAg-Negativität** wurde bei 24 (64.9%) Patienten die klassische G1896A Mutation vorgefunden. Zwei von den 13 Patienten ohne diese Veränderung besaßen eine Punkt Mutation am Präcore Startcodon, die zur Konversion von Methionin nach Leucin bzw. Threonin führte und so die Präcore Transkription verhinderte. Zwei weitere Patienten (Nr.18 und 19) hatten Insertionen von einer bzw. zwei zusätzlichen Adeninen am Nukleotid 1840, was zur Leserasterverschiebung führte. Patient 23 zeigte eine acht Nukleotid lange Deletion im Präcore Bereich. Dazu präsentierten zwei Patienten auf Aminosäure-Ebene einen Austausch eines essentiellen Cysteins durch Phenylalanin (Codon 23) nahe der signal peptidase cleavage site. Insgesamt zeigten also 31 Patienten (84%) Mutationen auf der Nukleotid- oder Aminosäure-Ebene, die die HBeAg-Negativität erklären konnten.

3.2.2.3 X-Promotor

Die Anzahl der Mutationen im 135 Nukleotide langen X-Promotor betrug im Mittel $m=1.9$ ($SD=1.8$, $SEM=0.3$). Dabei zeigten sich elf besonders häufig (bei mindestens 8 Prozent der Patienten) zum Consensus veränderte Positionen, die an den Nukleotiden 1249, 1250, 1314, 1320, 1324, 1329, 1332, 1347, 1368, 1369 und 1371 vorlagen. Insbesondere das Nt.1250 zeigte sich bei 21,6% der Patienten zum Consensus verändert. Eine statistische Signifikanz zum klinischen Verlauf ließ sich jedoch nicht aufzeigen.

Veränderungen zwischen unterschiedlichen Genotypen ergaben sich an den Nukleotiden 1249, 1252, 1306, 1317, 1320, 1321, 1323, 1324, 1329, 1332, 1335, 1338, 1344, 1347, 1353, 1356, 1359, 1362 und 1365 (s. a. grau untermalte Consensussequenzen in den Abschnitten 3.2.1.3 und 3.2.1.4)

Die Bindungsstelle für das **X-Promotor Binding Protein** (X-PBP, Nukleotide 1228-1243) war ohne Mutation.

3.2.2.4 G1896A Stopmutation

Im vorliegenden Patientenkollektiv liegt bei 24 Patienten die klassische G1896A-Stopmutation vor. Unter ihnen befinden sich 17 Männer (70.8%) und 7 Frauen (29.2%). Eine signifikante Korrelation mit anderen Charakteristika lag nicht vor.

3.3 Interferon-Therapie

29 der untersuchten 37 Patienten erfüllten die Einschlußkriterien einer IFN-Therapie mit entsprechender Nachbeobachtungsperiode und konnten in Hinsicht des Verlaufs und des Erfolges einer IFN-Therapie evaluiert werden.

3.3.1 Interferon-Therapie: Rohdaten

Von diesen 29 therapierten Patienten sprachen 11 (37.9%) dauerhaft auf die Therapie an (Response). Dagegen erzielte IFN bei 18 der 29 therapierten Patienten (62.1%) keinen Erfolg. Nach primärem Ansprechen wurden 8 der 29 Patienten (27.6%) bzw. der 18 Nonresponder (44.4%) während oder nach der Therapie rückfällig (Relapse). 10 der 29 Patienten (34,4%) wiesen initial keinen Therapieerfolg auf. Diese Verhältnisse veranschaulicht Abb.3.3.

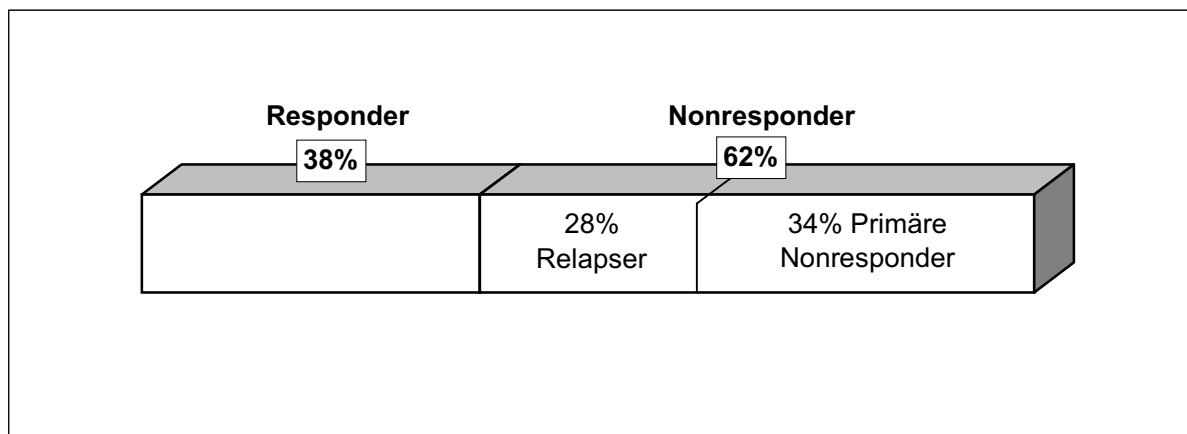


Abbildung 3.3. Erfolg der IFN-Therapie im Patientenkollektiv.

3.3.2 Interferon-Therapie: Analyse und Korrelationen

Von den 11 Therapierespondern sind 9 (81.8%) männlich und 2 (18.2%) weiblich. Bei den 18 Nonrespondern finden sich 17 Männer (94.4%) und 1 Frau (5.6%) ($p < 0.028$).

Die Auswertung der Patientenherkunft in Bezug auf den Therapieerfolg zeigt, dass von den 11 Respondern 9 (81.8%) aus Niedrig- und 2 (18.2%) aus Hoch-Prävalenz-Gebieten stammen. Dagegen entstammen 6 der 18 Therapieversager (33.3%) niedrigprävalenten Gebieten und 12 (66.6%) hochprävalenten Gebieten ($p < 0.04$).

Der HBV-DNA-Titer der Patienten ist in Hinblick auf einen Therapieerfolg nicht signifikant erhöht: Der mittlere logarithmierte HBV-DNA-Spiegel der Nonresponder liegt bei $m = 2.4$ Log pg/ml (SD=0.7, SEM=0.2), der der Responder bei $m = 1.9$ Log pg/ml (SD=1.4, SEM=0.4). Dieses Ergebnis ist statistisch nicht signifikant.

Patienten mit hohen HBV-DNA Spiegel ($> m = 2.2$ Log pg/ml) wurden jedoch signifikant häufiger rückfällig (Relapse) ($p < 0.027$).

Für die Höhe der Aminotransferasen gilt: Der mittlere AST-(=GOT-)Spiegel der Nonresponder liegt bei $m = 64$ U/l (SD=40, SEM=10), der der Responder bei $m = 78$ U/l (SD=60, SEM=19). Der Mittelwert der ALT (=GPT) der Nonresponder beträgt $m = 119$ U/l (SD=75, SEM=18) versus $m = 148$ U/l (SD=90, SEM= 27) bei den Respondern. Auch hier liegt keine statistische Signifikanz vor.

Korrelationen des Therapieerfolges mit dem Patientenalter, der Erkrankungsdauer oder dem Vorliegen einer Zirrhose ergeben keine Signifikanz.

Der HBsAg-Titer zeigt bei Respondern und Non-Respondern keine signifikanten Unterschiede.

Die mittlere Mutationsanzahl beträgt im X-Gen $m_x = 10.6$, im X-Promotor $m_{x-p} = 1.9$. Dabei besteht keine statistische Signifikanz von gesamter Mutationszahl und klinischem Verlauf bzw. dem IFN-Therapieerfolg.

Die Anzahl an Mutationen im BCP jedoch zeigt eine umgekehrte Korrelation zum IFN-Therapieerfolg. Weniger Mutationen im BCP ($m_{wm} = 2.0$) sind mit dauerhaftem Therapieerfolg verbunden, mehr Mutationen ($m_{mm} = 4.5$) mit Therapieversagen ($p < 0.04$).

Dies gilt besonders für die Nukleotide 1753 bis 1766: Patienten mit mutationsarmen Genomen ($m_{wm} = 1.0$) gehören zu den Respondern, wohingegen Patienten mit vermehrten Austauschen ($m_{mm} = 3.0$) der Nt.1753-66 nicht erfolgreich auf IFN ansprechen ($p < 0.02$).

Für die G1896A Stopmutation kann keine statistische Signifikanz mit dem IFN-Therapieerfolg aufgezeigt werden.

Am Nukleotid 1764 weisen Responder in 73% (8/11) den Wildtypconsensus auf, bei den Nonrespondern 22% (4/18). Umgekehrt liegt bei 26% der Responder versus 78% der Nonresponder eine Mutation vor ($p<0.003$).

Das Nt.1762 ist in 27% der Responder mutiert, jedoch in 67% der Therapierversager ($p<0.03$).

Parameter	Response (n=11)	Non-Response (n=18)	Signifikanz
Herkunft [Hohe/Niedrige Prävalenz]	2/9 (18%/82%)	6/12 (33%/67%)	$p<0.04$
AST [U/l]	78±19	64±10	n.s.
ALT [U/l]	148±27	119±18	n.s.
HBV-DNA [Log pg/ml]	1.9±0.4	2.4±0.2	n.s.
HBsAg quantitativ [Log µg/ml]	0.58±1.5	0.65±1.9	n.s.
Genotyp A¹ [%]	24	17	n.s.
Genotyp D¹ [%]	13	45	n.s.
1762 Mutation	27% (3/11)	73% (8/11)	$p<0.03$
1764 Mutation	27% (3/11)	78% (14/18)	$p<0.003$
Mutationen im X-Gen	7.4	12.1	n.s.
Mutationen im X-Promotor	1.5	2.3	n.s.
Mutationen im BCP	2.0±0.3	4.5±1.0	$p<0.04$
Mutationen in Nt.1753-66	1.0±0.4	3.0±0.4	$p<0.02$

Tabelle 3.3. Klinische und virale Parameter bei IFN-Respondern und Non-Respondern.

¹ Bei den therapierten Patienten kamen nur die Genotypen A und D vor.

Aus diesen Daten lassen sich prädiktive Werte für das IFN-Therapieansprechen mittels logistischer Regression errechnen. Bei mehr als vier Mutationen im BCP konnte mit über

80%iger Sicherheit ein Therapieversagen vorhergesagt werden. Gleiches lässt sich für die Nukleotide 1753-66 errechnen. Diesen Sachverhalt verdeutlicht die Abb. 3.3.

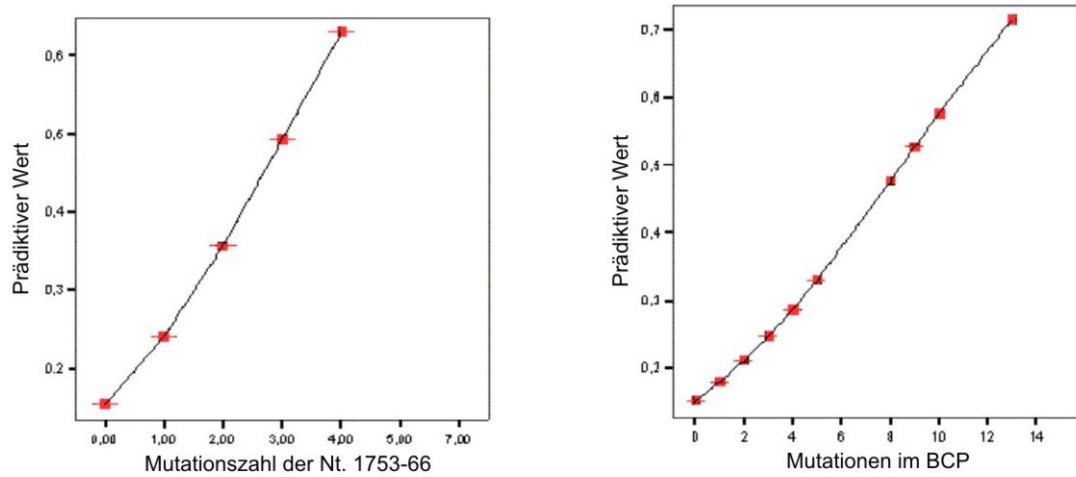


Abbildung 3.3. Logistische Regressionsanalyse für das IFN-Ansprechen. Links: Zusammenhang der Anzahl der Mutationen innerhalb der Nukleotide 1753-1766 mit einem IFN-Therapieerfolg. Rechts: Zusammenhang von Anzahl der Mutationen im BCP mit einem IFN-Therapieerfolg. Ein prädiktiver Wert von 1,0 entspricht dabei einer statistischen Wahrscheinlichkeit von 100%.

Alle übrigen oben aufgeführten Mutationen in Enhancer II, NRE, CURS, BCP, der Kunitz Domäne, den DR 1 und 2 sowie anderen untersuchten funktionellen Regionen erlaubten keine prädiktive Aussage zum Erfolg einer IFN-Therapie.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde das X-Gen und der X-Promotor bei chronisch-replikativer HBeAg-negativer Hepatitis B in Hinsicht auf Klinik und Erfolg einer IFN-Therapie untersucht. Bisher sind verschiedene prädiktive Faktoren für den Erfolg einer IFN-Therapie beschrieben worden. Der Einfluß von HBV-DNA-Titer, Aminotransferasen, Leberhistologie, Dauer der HBV-Infektion und Superinfektionen mit dem Human Immunodeficiency Virus oder dem Hepatitis Delta Virus auf eine IFN-Therapie wurden in diversen Studien beschrieben. Der Einfluß von Virusmutationen und deren Bedeutung für die Klinik und das Ansprechen auf IFN sind jedoch bislang nur unzureichend untersucht.

Daher wurde hier die Relevanz von Mutationen im X-Gen und X-Promotor inklusive der enthaltenen funktionellen Elemente mittels direkter Sequenzierung der Virusgenome und klinischer Charakterisierung von Patienten mit chronisch-replikativer HBeAg-negativer Hepatitis B beleuchtet.

Die Verteilung der **Genotypen** der untersuchten Patienten spiegelt die bisher beschriebene geographische Verteilung von HBV-Genotypen wieder [84]. Genotyp A fand sich signifikant häufiger bei den deutschstämmigen Patienten (bei 43% aller untersuchten Patienten und bei 71% der deutschstämmigen Patienten), Genotyp D bei den Patienten aus dem mediterranen Raum (54% aller untersuchten Patienten entspricht 93% der mediterranen Patienten) und Genotyp C bei einem asiatischen Patient (3% aller untersuchten Patienten entspricht 100% der asiatischen Patienten). Dieses stimmt mit Publikationen überein, in denen Genotyp A im nord- und mitteleuropäischen Raum, D in der Mittelmeerregion und Genotyp C in Asien gehäuft anzutreffen ist [84]. Das Fehlen der Genotypen E und F ist für Mitteleuropa nicht außergewöhnlich [84].

Innerhalb des **X-Gens** fanden sich an bestimmten Lokalisationen auffallend häufig Mutationen. Diese oft veränderten Regionen sind vor allem die Nukleotide 1634, 1753, 1762 und 1764 mit Abweichungen von der Consensussequenz in über 40% der Patienten. In den Positionen 1470, 1509, 1635, 1638, 1678 und 1757 ist das HBV-Genom mindestens jedes dritten untersuchten Patienten mutiert.

Zwei Erklärungen hierfür scheinen mir möglich: Erstens, das X Protein stellt ein immunologisches Ziel der Lymphozyten der Patienten dar, um das Virus zu eliminieren. Bei Mutationen im Core-Gen korrespondieren die Positionen häufiger Mutationen mit T-Zell Epitopen [144].

Der zweite Erklärungsansatz liegt in der Selektion der mutierten Viren begründet und geht von zufälligen und durch die für DNA-Viren einzigartige Replikationsstrategie des HBV begünstigten Mutationen des gesamten HBV aus. Mutationen entstehen unter Selektionsdruck sowohl in für das Fortbestehen des Virus essentiellen, als auch in dafür nicht essentiellen Regionen des HBV-Genoms. HBV-Stämme mit Veränderungen in für den viralen Lebenszyklus funktionell lebenswichtigen Regionen (z.B. zur Replikation) können sich jedoch nicht vermehren und verschwinden. Somit steigt die Zahl an Viren mit Mutationen in nicht wichtigen Bereichen. Hiernach lägen vorhandene Mutationen also in Bereichen, die eher weniger essentiell für das Virus sind [145] .

Demgegenüber scheint die relativ geringe Mutationszahl im **X-Promotor** im Gegensatz zur hohen Anzahl an Mutationen im X-Gen auf den ersten Blick überraschend. Als cis-aktivierende Region könnte ein Nutzen in der hochkonservierten Form des X-Promotors bestehen, da dieser essentiell in der viralen Replikation involviert ist [21] . Hieraus ergibt sich, dass Mutationen in diesem Bereich Störungen in der Replikation zur Folge hätten, was X-promotormutierten Genomen durch mangelhafte bzw. verminderte Replikation die Vermehrung erschwert.

Die Bindungsstelle für das **X-Promotor Binding Protein** (X-PBP, Nukleotide 1228-1243) war bei allen Patienten ohne Mutation. Ein Zusammenhang mit seiner für die Regulation der Transkription des X-Gens essentiellen Rolle scheint daher naheliegend [100] .

Der **basale Core Promotor** (BCP) des Hepatitis B Virus umfaßt die Nukleotide 1742 bis 1849. Prävalenz der Mutationen und klinische Charakteristika der Patienten in Bezug auf den BCP ergaben, dass zwischen Respondern und Nonrespondern signifikante Unterschiede bezüglich der Mutationsanzahl im BCP bestanden. Der BCP reguliert die Transkription der prägenomischen RNA und der Präcore RNA, die für das HBc Antigen und das HBe Antigen codieren, und damit auch die Replikation. Bei HBeAg-positiven Patienten könnte daher der Effekt des gehäuft mutierten BCP in einer Reduktion von zirkulierendem HBeAg liegen. Dieses vermindert die Immuntoleranz, führt somit zu erhöhter immunologischer Virusbekämpfung und konsekutiv zu einem besseren Ansprechen auf IFN [62, 79] . Bei der HBeAg-negativen Hepatitis B dieser Untersuchung mag dieser Mechanismus der Immuntoleranz aufgrund des fehlenden HBeAg keine oder nur eine geringe Rolle spielen.

Gleichzeitig mit einer Reduktion von zirkulierenden HBeAg und Präcore RNA wurde eine dem Wildtyplevel entsprechende, d.h. normal hohe prägenomische RNA beobachtet [47] . Moriyama et al. zeigten eine erhöhte Virus Produktion durch verstärkte Transkription

prägenomischer RNA [97, 98] . Darüberhinaus konnte in Transfektionsstudien eine gesteigerte Virus Enkapsidation (Virusverpackung) bei an Nt. 1762 und 64 mutierten Genomen unterstrichen werden [18] .

Der entscheidende Effekt von Mutationen im BCP könnte also bei der HBeAg-negativen Hepatitis B über eine erhöhte Produktion an prägenomischer RNA, Translation zu Core und Polymerase Proteinen, reverse Transkription zu Minus-Strang DNA und damit in einer zunehmenden HBV-Replikation und folglich einem verschlechterten IFN-Ansprechen liegen. Dieses gibt die Abb. 4.1 wieder.

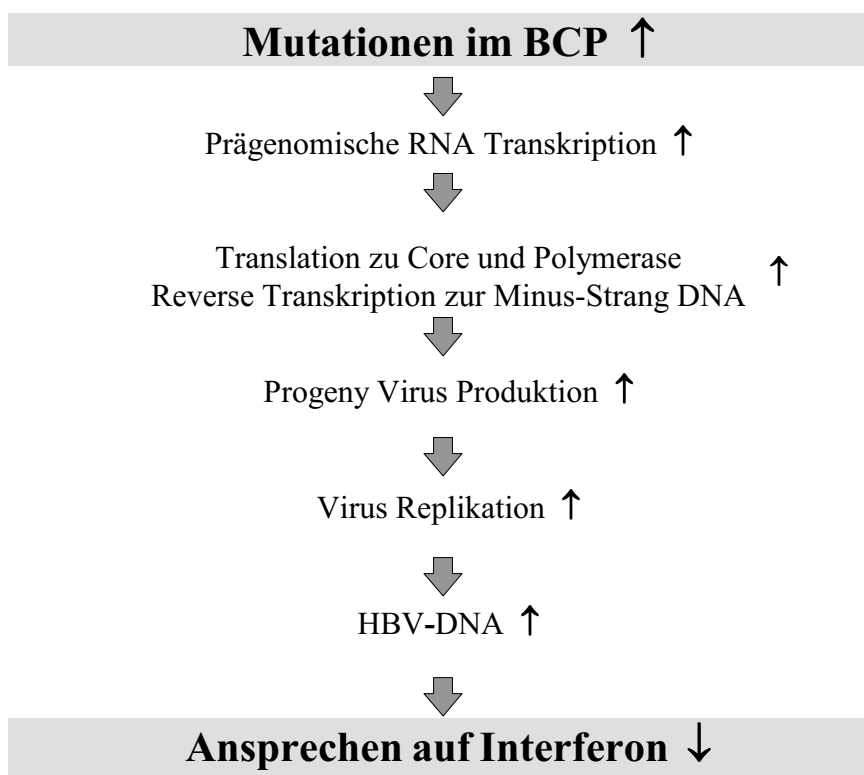


Abbildung 4.1. Modell einer möglichen Effektkette von Mutationen im BCP.

Bekräftigt wird dies durch höhere HBV-DNA Titer bei Patienten mit mutierten Nt. 1762 und 1764. Bei der HBeAg-negativen Hepatitis B könnten daher Mutationen der Nukleotide 1762 und 1764 im Gegensatz zur HBeAg-positiven Hepatitis B den Erfolg einer IFN-Therapie negativ beeinflussen [32] .

Die Mutationsanalyse zur Klärung der reduzierten oder fehlenden HBeAg Bildung ergab, dass von den 38 Patienten 24 (64.9%) die klassische TAG-Mutation in der PräCore Region (G1896A) aufweisen. Mutationen an der Position 1762 bzw. 1764, die ebenfalls zur Reduktion oder dem Verlust der HBeAg Sekretion führen sollen [62], lagen bei 18 von 37 (49%) für Nt. 1762 und bei 22 (60%) der Patienten für Nt. 1764 vor. Beide Mutationen wurden bei 18 Patienten (49%) festgestellt und waren in 11 Fällen (30%) mit der 1896 Stopmutation assoziiert. Insgesamt zeigten also 31 Patienten (84%) Mutationen der untersuchten Regionen im Nukleotid-Niveau, die die HBeAg-Negativität erklären konnten.

Die durchgeführte **IFN-Therapie** zeigte bei 37,9% der Patienten eine dauerhafte Ansprechrate, was im Bereich bisher publizierter Studien liegt [16, 35].

Das Ansprechen auf Interferon korrelierte mit einer geringen Zahl an Mutationen im basalen Core Promotor ($p<0.04$) und der Nukleotide 1753-1766 ($p<0.02$) sowie der Wildtyp Sequenz an Nukleotid 1762 ($p<0.03$) und 1764 ($p<0.003$). Desweiteren zeigte die Herkunft der Patienten Signifikanz in Bezug auf eine IFN-Therapie ($p<0.04$).

Studien aus dem Mittelmeerraum zeigten bei HBeAg-negativen Patienten niedrigere Ansprechraten auf eine IFN-Therapie. Dieses liegt im in mediterranen Regionen gehäuftem Auftreten des Genotyps D begründet, der an sich niedrigere Therapieansprechraten zeigt [156]. Ein Effekt vom Genotyp der Patienten auf den Therapieerfolg konnte mit den vorliegenden Daten jedoch aufgrund der niedrigen Fallzahl nicht festgestellt werden.

Eine Korrelation zum IFN-Therapieerfolg fand sich für bestimmte Mutationen bzw. die Anzahl an Mutationen in bestimmten Regionen des Virusgenoms. Hier konnte eine umgekehrte Korrelation zwischen der Mutationsanzahl im BCP, innerhalb der Nukleotide 1753-66 sowie der Mutation der Nt. 1762 und 1764 mit dem Erfolg einer IFN-Therapie nachgewiesen werden.

Ein niedriger HBV-DNA Titer ist als prognostisch günstiger Faktor vorbeschrieben [14, 102]. Responder und Nonresponder wiesen hier jedoch keine signifikant unterschiedlichen DNA-Titer auf. Eher ließ sich bei den Respondern eine Tendenz zu höheren Werten vermelden (Responder vs Nonresponder: $m_{\text{HBV-DNA}}=444$ vs 231 pg/ml).

Patienten mit hohen HBV-DNA Spiegel ($>m=2.2 \text{ Log pg/ml}$) wurden jedoch häufiger rückfällig (Relapse) ($p<0.027$), was die bisher publizierte Korrelation von hohen HBV-DNA-

Spiegeln mit Therapieversagen widerspiegeln könnte [15, 108]. Hohe Aminotransferasen und eine hohe histologische Leberaktivität gelten als Zeichen für eine Entzündungsreaktion des Immunsystems des Wirts gegenüber dem Virus. Beide gelten als Marker einer reduzierten Immuntoleranz und somit eines erhöhten Ansprechens auf IFN. Daher zählen sie ebenfalls zu den positiv prädiktiven Faktoren. Hier ließen sich diese erhöhten Aminotransferasenwerte der erfolgreich therapierten Patienten (statistisch nicht signifikant) als eine Tendenz vermerken (Responder vs Nonresponder $m_{ALT}=148$ vs 120U/ml , $m_{AST}=78$ vs 64U/ml).

Darüberhinaus waren tendenziell höhere Aminotransferasen ($m>75\text{U/l}$) mit hohen HBV-DNA-Titern assoziiert. In den bisher veröffentlichten Studien wurden für ein erfolgreiches Ansprechen auf IFN gegenläufige Tendenzen für Aminotransferasen ($>200\text{U/l}$) und entsprechende HBV-DNA-Titer ($<200\text{ pg/ml}$) [15, 108] beobachtet. Dieses ließ sich in den vorliegenden Daten nicht signifikant unterstreichen.

In der Nukleotidregion 1753-66 und im BCP liegen verschiedene Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren, unter denen sich unter anderem HNF4- und SP1-Bindungsstellen befinden. Derartige Transkriptionsfaktoren nehmen Einfluss auf Zellmetabolismus, Zellproliferation und Zelldifferenzierung [48]. Für HNF4 als Mitglied der Familie sogenannter „Leber bereichernder“ (liver enriched) Transkriptionsfaktoren zeigte Raney eine Steigerung der Transkription des Nukleocapsid Promotors [110]. Auf diese Weise kann also eine Beeinflussung der IFN-Wirkung durch Transkriptionsfaktoren möglich sein.

Bei HBeAg-negativer, chronisch-replikativer Hepatitis B scheint der Nukleotidstatus an Position 1764 den Erfolg einer Interferontherapie signifikant zu determinieren ($p<0.003$). Der Wildtyp an dieser Position korreliert dabei mit Therapieansprechen, eine Mutation mit Therapieversagen. 73% der erfolgreich therapierten Patienten wiesen an der Position 1764 den Wildtyp G auf, dagegen 27% eine Mutation. Dagegen zeigten hier nur 22% der Therapieversager den Wildtypconsensus, jedoch 78% eine Mutation. Ähnliches gilt für das Nukleotid 1762. Hier war der Wildtyp erneut mit Therapieerfolg und eine Mutation mit Therapieversagen vergesellschaftet ($p<0.03$).

Mit einer Wahrscheinlichkeit von 78% konnte daher über den Nukleotidstatus 1764 das Ansprechen auf eine Interferontherapie vorhergesagt werden. Über die Anzahl der Mutationen des Basalen Core Promotors konnte sogar mit 80%iger Wahrscheinlichkeit eine prädiktive Aussage über den Erfolg einer Interferon Therapie gemacht werden.

Dies war zunächst überraschend, da bisher nur sogenannte indirekte Indikatoren für den Erfolg einer IFN-Therapie wie niedrige HBV-DNA-Titer, hohe entzündliche Aktivität im

Lebergewebe bzw. hohe Aminotransferasen-Titer und eine kurze Erkrankungsdauer beschrieben sind. Der Wildtypstatus an Nukleotid 1764 sowie eine geringe Anzahl von Mutationen im Basalen Core Promotor könnte aufgrund der vorliegenden Daten in Zukunft zur Prädiktion des Ergebnis einer IFN-Therapie verwendet werden.

Die IFN-Therapie beinhaltet darüberhinaus drei wesentliche Probleme:

1. Ihre niedrige dauerhafte Wirksamkeit, die je nach Patientenkollektiv und Studie bei HBeAg-negativen Patienten zwischen weniger als 10% und bis zu 50% [16, 35] beträgt, unseren Daten nach bei 37,9%.
2. Die zum Teil erheblichen Nebenwirkungen des applizierten Interferons beginnend bei allgemeinen Beschwerden, über grippale Symptome bis hin zu schwersten psychischen Veränderungen.
3. Die hohen Kosten einer IFN-Therapie.

Eine der Konsequenzen dieser Arbeit könnte also die weitere Verbesserung der Auswahl der zu therapierenden Patienten sein, d.h. eine mögliche beschränkte Anwendung von Interferon bei HBeAg-negativen Patienten mit bekannter Mutation an Position 1764 bzw. mit mutationsreichem Basalen Core Promotor bzw. Nukleotiden 1753-66 sein. Eine sorgfältige Abwägung der Erfolgchancen dieser Patienten mit Mutation(en) vor Therapiebeginn im Hinblick auf erfolgversprechende Faktoren sollte durchgeführt werden. Aber auch der umgekehrte Fall von Wildtyp-Patienten mit ungünstiger Indikatorenkonstellation ist zu bedenken. Hierbei sollte auch eine entsprechend ausführlichere Aufklärung dieser Patienten erfolgen.

Für die Praxis könnten bei Vorliegen einer chronisch-replikativen, HBeAg-negativen Hepatitis B in Zukunft sowohl die vorhandenen indirekten Indikatoren für den Therapieerfolg, als auch die Genomsequenz des Basalen Core Promotors, der Nukleotide 1753-66, insbesondere aber des Nukleotids 1764 evaluiert werden. Erst dann ist eine gründliche Vorbereitung der Therapie gewährleistet. Die Ermittlung eines Scores, der diese Aspekte beinhaltet, ist denkbar und geplant. Eine Diskussion der ethischen Aspekte dieser Problematik ist jedoch nicht zu vernachlässigen.

Durch eine teilweise schon stattgehabte Verbesserung der Polymerase Ketten Reaktion und der Sequenzierung genetischer Informationen könnten sich diese Techniken arbeitssparend und routinemäßig schneller durchführen lassen.

Vor dem Hintergrund der erheblichen Nebenwirkungen einer IFN-Therapie könnte sich durch eine gezieltere Patienten Vorauswahl die Zahl der erfolgreich therapierten Patienten relativ gesehen erhöhen. Therapieversagern blieben die Nebenwirkungen einer (erfolglosen) Interferontherapie erspart. Die Kostenträger könnten durch weniger Therapieversager zusätzlich entlastet und die vorhandenen finanziellen Mittel effizienter verteilt werden.

Alles in allem ist eine deutlich höhere Effizienz in der IFN-Therapie der chronischen HBeAg-negativen Hepatitis B möglich. Hierzu soll diese Arbeit einen Beitrag leisten.

5. Zusammenfassung

Bei der chronisch-replikativen HBeAg-negativen Hepatitis B ist die Signifikanz von Mutationen im X-Gen und den darin enthaltenen funktionellen Regionen wie basaler Core Promotor (BCP), Core upstream regulatory structure (CURS) und negative regulatory element (NRE) sowie im X-Promotor für das klinische Bild der Patienten und das Ansprechen auf eine Interferon (IFN) Therapie unbekannt. Eine Sequenzanalyse von X-Gen inklusive BCP, CURS, NRE und X-Promotor wurde aus Seren von 37 Patienten mit chronisch-replikativer HBeAg-negativer Hepatitis B durchgeführt. Davon waren 29 mit alfa-Interferon (IFN- α) therapiert.

Die dauerhafte Therapieerfolgsrate betrug 37,9%.

Das Ansprechen auf Interferon korrelierte dabei signifikant mit einer geringen Anzahl an Mutationen im basalen Core Promotor und innerhalb der Nukleotide 1753-1766 sowie der Wildtyp Sequenz an Nukleotid 1762 und 1764, desweiteren mit der Herkunft der Patienten.

Die Prädiktion des Ansprechens auf IFN war in 80% anhand der Zahl an Mutationen im BCP bzw. in 78% der HBeAg-negativen Patienten durch den Nukleotid Status an Nt. 1764 möglich.

Keine signifikanten Zusammenhänge mit dem IFN-Therapieerfolg fanden sich für die Genotypen der Patienten, die Höhe der Aminotransferasen, HBV-DNA Titer oder HBsAg Titer sowie für die Gesamtzahl der Mutationen im X-Gen oder X-Promotor, ebenso wenig wie für die 1896 Mutation, die Anzahl der Mutationen im CURS oder NRE oder die Krankheitsdauer.

Die Daten deuten daraufhin, dass innerhalb von X-Gen und Basalem Core Promotor Determinanten für das Ansprechen auf eine Therapie mit Interferon zu finden sind.

6. Literaturverzeichnis

1. **Allen MI, Deslauriers M, Andrews CW, Tipples GA, Walters KA, Tyrrell DL, Brown N, Condreay LD.** 1998. Identification and characterization of mutations in hepatitis B virus resistant to lamivudine. Lamivudine Clinical Investigation Group. *Hepatology* 27: 1670-1677.
2. **Almeida JD, Rubenstein D, Stott EJ.** 1971. New antigen-antibody system in Australia-antigen-positive hepatitis. *Lancet* 2: 1225-1227.
3. **Arii M, Takada S, Koike K.** 1992. Identification of three essential regions of hepatitis B virus X protein for trans-activation function. *Oncogene* 7: 397-403.
4. **Balsano C, Avantaggiati ML, Natoli G, De Marzio E, Will H, Perricaudet M, Levrero M.** 1991. Full-length and truncated versions of the hepatitis B virus (HBV) X protein (pX) transactivate the cmyc protooncogene at the transcriptional level. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 176: 985-992.
5. **Bartholomew MM, Jansen RW, Jeffers LJ, Reddy KR, Johnson LC, Bunzendahl H, Condreay LD, Tzakis AG, Schiff ER, Brown NA.** 1997. Hepatitis-B-virus resistance to lamivudine given for recurrent infection after orthotopic liver transplantation. *Lancet* 349: 20-22.
6. **Beasley RP and Hwang LY.** 1983. Postnatal infectivity of hepatitis B surface antigen-carrier mothers. *J.Infect.Dis.* 147: 185-190.
7. **Beasley RP, Hwang LY, Lin CC, Chien CS.** 1981. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22 707 men in Taiwan. *Lancet* 2: 1129-1133.
8. **Beg AA, Sha WC, Bronson RT, Ghosh S, Baltimore D.** 1995. Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF-kappa B. *Nature* 376: 167-170.

9. **Benn J, Su F, Doria M, Schneider RJ.** 1996. Hepatitis B virus HBx protein induces transcription factor AP-1 by activation of extracellular signal-regulated and c-Jun N-terminal mitogen-activated protein kinases. *J.Virol.* 70: 4978-4985.
10. **Bertoletti A, Costanzo A, Chisari FV, Levrero M, Artini M, Sette A, Penna A, Giuberti T, Fiaccadori F, Ferrari C.** 1994. Cytotoxic T lymphocyte response to a wild type hepatitis B virus epitope in patients chronically infected by variant viruses carrying substitutions within the epitope. *J.Exp.Med.* 180: 933-943.
11. **Bertoletti A, Southwood S, Chesnut R, Sette A, Falco M, Ferrara GB, Penna A, Boni C, Fiaccadori F, Ferrari C.** 1997. Molecular features of the hepatitis B virus nucleocapsid T-cell epitope 18-27: interaction with HLA and T-cell receptor. *Hepatology* 26: 1027-1034.
12. **Blum HE, Galun E, Liang TJ, von WF, Wands JR.** 1991. Naturally occurring missense mutation in the polymerase gene terminating hepatitis B virus replication. *J.Virol.* 65: 1836-1842.
13. **Blum HE, Zhang ZS, Galun E, von Weizsacker F, Garner B, Liang TJ, Wands JR.** 1992. Hepatitis B virus X protein is not central to the viral life cycle in vitro. *J.Virol.* 66: 1223-1227.
14. **Blum H, Maier K, Gerok W.** 1995. Virushepatitis. In: Gerok W, Blum HE (Hrsg): *Hepatologie*. Urban&Schwarzenberg München, Wien, Baltimore. 2.Auflage: 376-412.
15. **Böker HW and Manns MP.** 1995. Diagnostik und Therapie chronischer Hepatitiden. *Med.Klin.* 90: 411-422.
16. **Brunetto MR, Oliveri F, Colombatto P, Capalbo M, Barbera C, Bonino F.** 1995. Treatment of chronic anti-HBe-positive hepatitis B with interferon-alpha. *J.Hepatol.* 22: 42-44.
17. **Bruss V and Gerlich WH.** 1988. Formation of transmembraneous hepatitis B e-antigen by cotranslational in vitro processing of the viral precore protein. *Virology* 163: 268-275.

18. **Buckwold VE, Xu Z, Yen TS, Ou JH.** 1997. Effects of a frequent double-nucleotide basal core promoter mutation and its putative single-nucleotide precursor mutations on hepatitis B virus gene expression and replication. *J.Gen.Virol.* 78: 2055-2065.
19. **Carman WF, Fagan EA, Hadziyannis S, Karayiannis P, Tassopoulos NC, Williams R, Thomas HC.** 1991. Association of a precore genomic variant of hepatitis B virus with fulminant hepatitis. *Hepatology* 14: 219-222.
20. **Carman WF, Jacyna MR, Hadziyannis S, Karayiannis P, McGarvey MJ, Makris A, Thomas HC.** 1989. Mutation preventing formation of hepatitis B e antigen in patients with chronic hepatitis B infection. *Lancet* 2: 588-591.
21. **Carman WF, Thomas HC, Zuckerman AJ, Harrison TJ.** 1998. Hepadnaviridae: Molecular Variants of Hepatitis B Virus. In: Zuckerman AJ, Thomas HC (Hrsg): *Viral Hepatitis*. Churchill Livingstone Edinburgh, Großbritannien. 2.Auflage: 141-172.
22. **Carman WF, Zanetti AR, Karayiannis P, Waters J, Manzillo G, Tanzi E, Zuckerman AJ, Thomas HC.** 1990. Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus. *Lancet* 336: 325-329.
23. **Caselmann WH, Meyer M, Kekule AS, Lauer U, Hofschneider PH, Koshy R.** 1990. A trans-activator function is generated by integration of hepatitis B virus preS/S sequences in human hepatocellular carcinoma DNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 87: 2970-2974.
24. **Chen HS, Kaneko S, Girones R, Anderson RW, Hornbuckle WE, Tennant BC, Cote PJ, Gerin JL, Purcell RH, Miller RH.** 1993. The woodchuck hepatitis virus X gene is important for establishment of virus infection in woodchucks. *J.Virol.* 67: 1218-1226.
25. **Chen IH, Huang CJ, Ting LP.** 1995. Overlapping initiator and TATA box functions in the basal core promoter of hepatitis B virus. *J.Virol.* 69: 3647-3657.

26. **Chen LK, Mathieu-Mahul D, Bach FH, Dausset J, Bensussan A, Sasportes M.** 1986. Recombinant interferon alpha can induce rearrangement of T-cell antigen receptor alpha-chain genes and maturation to cytotoxicity in T-lymphocyte clones in vitro. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 83: 4887-4889.
27. **Chirillo P, Falco M, Puri PL, Artini M, Balsano C, Levrero M, Natoli G.** 1996. Hepatitis B virus pX activates NF-kappa B-dependent transcription through a Raf-independent pathway. *J.Virol.* 70: 641-646.
28. **Colgrove R, Simon G, Ganem D.** 1989. Transcriptional activation of homologous and heterologous genes by the hepatitis B virus X gene product in cells permissive for viral replication. *J.Virol.* 63: 4019-4026.
29. **Cross JC, Wen P, Rutter WJ.** 1993. Transactivation by hepatitis B virus X protein is promiscuous and dependent on mitogen-activated cellular serine/threonine kinases. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 90: 8078-8082.
30. **Dane DS, Cameron CH, Briggs M.** 1970. Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet* 1: 695-698.
31. **Dinarelli CA, Bernheim HA, Duff GW, Le HV, Nagabhushan TL, Hamilton NC, Coceani F.** 1984. Mechanisms of fever induced by recombinant human interferon. *J.Clin.Invest.* 74: 906-913.
32. **Erhardt A, Reineke U, Blondin D, Gerlich WH, Adams O, Heintges T, Niederau C, Häussinger D.** 2000. Mutations of the Core Promotor and Response to Interferon Treatment in Chronic Replicative Hepatitis B. *Hepatology* 31: 716-725.
33. **Faktor O, Budlovsky S, Ben-Levy R, Shaul Y.** 1990. A single element within the hepatitis B virus enhancer binds multiple proteins and responds to multiple stimuli. *J.Virol.* 64: 1861-1863.
34. **Faktor O and Shaul Y.** 1990. The identification of hepatitis B virus X gene responsive elements reveals functional similarity of X and HTLV-I tax. *Oncogene* 5: 867-872.

35. **Fattovich G, Farci P, Rugge M, Brollo L, Mandas A, Pontisso P, Giustina G, Lai ME, Belussi F, Busatto G, et al.** 1992. A randomized controlled trial of lymphoblastoid interferon-alpha in patients with chronic hepatitis B lacking HBeAg. *Hepatology* 15: 584-589.
36. **Feitelson MA and Duan LX.** 1997. Hepatitis B virus X antigen in the pathogenesis of chronic infections and the development of hepatocellular carcinoma. *Am.J.Pathol.* 150: 1141-1157.
37. **Feitelson MA, Zhu M, Duan LX, London WT.** 1993. Hepatitis B x antigen and p53 are associated in vitro and in liver tissues from patients with primary hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 8: 1109-1117.
38. **Fortuin M, Karthigesu V, Allison L, Howard C, Hoare S, Mendy M, Whittle HC.** 1994. Breakthrough infections and identification of a viral variant in Gambian children immunized with hepatitis B vaccine. *J.Infect.Dis.* 169: 1374-1376.
39. **Fujisawa K, Yamkazi K, Kawaze H.** 1987. Interferon therapy for chronic viral hepatitis and the use of peripheral lymphocytic 2',5'-oligoadenylate synthetase. In: Zuckerman AJ (Hrsg): *Viral Hepatitis and Liver Disease*. Alan R Liss New York, USA. 834-839.
40. **Ganem D and Varmus HE.** 1987. The molecular biology of the hepatitis B viruses. *Annu.Rev.Biochem.* 56: 651-693.
41. **Gerken G, Goergen B, Meyer zum Büschenfelde K.** 1994. Virushepatitis und B-Virusmutanten. *Dt.Ärztebl.* 91: C-2077-C-2082.
42. **Gerken G, Knolle P, Meyer zum Büschenfelde K.** 1996. Interferon therapy of viral hepatitis. *Symposium in Immunology* V 77-89.
43. **Gerken G and Loehr H.** 1994. Die chronische Virushepatitis und ihre Behandlung mit IFN. *Med.Monatsschr.f.Pharmaz.* 17: 140-146.

44. **Gerlich WH and Thomssen R.** 1975. Standardized detection of hepatitis B surface antigen: Determination of its concentration in weight units per volume. *Dev.Biol.Stand.* 78-87.
45. **Girones R and Miller RH.** 1989. Mutation rate of the hepadnavirus genome. *Virology* 170: 595-597.
46. **Guidotti LG, Matzke B, Pasquinelli C, Schoenberger JM, Rogler CE, Chisari FV.** 1996. The hepatitis B virus (HBV) precore protein inhibits HBV replication in transgenic mice. *J.Virol.* 70: 7056-7061.
47. **Gunther S, Piwon N, Will H.** 1998. Wild-type levels of pregenomic RNA and replication but reduced pre-C RNA and e-antigen synthesis of hepatitis B virus with C(1653) --> T, A(1762) --> T and G(1764) --> A mutations in the core promoter. *J.Gen.Virol.* 79: 375-380.
48. **Hall RK, Sladek FM, Granner DK.** 1995. The orphan receptors COUP-TF and HNF-4 serve as accessory factors required for induction of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene transcription by glucocorticoids. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 92: 412-416.
49. **Heermann KH, Goldmann U, Schwartz W, Seyffarth T, Baumgarten H, Gerlich WH.** 1984. Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-s sequence. *J.Virol.* 52: 396-402.
50. **Heintges T, Mohr L, Niederau C.** 1994. Epidemiology and clinical features of chronic viral hepatitis. *Dtsch.Med.Wochenschr.* 119: 1365-1370.
51. **Hohne M, Schaefer S, Seifer M, Feitelson MA, Paul D, Gerlich WH.** 1990. Malignant transformation of immortalized transgenic hepatocytes after transfection with hepatitis B virus DNA. *EMBO J.* 9: 1137-1145.
52. **Hollinger FB.** 1990. Hepatitis B virus In: Fields BN, Knipe DM et al.(Hrsg): *Virology.* Raven Press New York, USA 2171-2220.

53. **Hoofnagle JH, Peters M, Mullen KD, Jones DB, Rustgi V, Di Bisceglie A, Hallahan C, Park Y, Meschievitz C, Jones EA.** 1988. Randomized, controlled trial of recombinant human alpha-interferon in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 95: 1318-1325.
54. **Hopf U, Niederau C, Kleber G, Fleig WE.** 1997. The treatment of chronic viral hepatitis B/D and acute and chronic viral hepatitis C. The consensus of the German Society for Digestive and Metabolic Diseases. *Z.Gastroenterol.* 35: 971-986.
55. **Horikita M, Itoh S, Yamamoto K, Shibayama T, Tsuda F, Okamoto H.** 1994. Differences in the entire nucleotide sequence between hepatitis B virus genomes from carriers positive for antibody to hepatitis B e antigen with and without active disease. *J.Med.Virol.* 44: 96-103.
56. **Hruska JF, Clayton DA, Rubenstein JL, Robinson WS.** 1977. Structure of hepatitis B Dane particle DNA before and after the Dane particle DNA polymerase reaction. *J.Virol.* 21: 666-672.
57. **Innis MA and Gelfand DH.** 1990. Optimization of PCRs. In: Innis,M.A.; Gelfand, D.H.; Sninsky,J.J.; White,T.J. (Hrsg.): *PCR protocols: A guide to methods and applications.* Academic Press, San Diego, Kalifornien, USA. 1.Auflage: 3-12.
58. **Jameel S and Siddiqui A.** 1986. The human hepatitis B virus enhancer requires trans-acting cellular factor(s) for activity. *Mol.Cell Biol.* 6: 710-715.
59. **Kann M and Gerlich WH.** 1998. Hepadnaviridae: Structure and Molecular Virology. In: Zuckerman AJ, Thomas HC (Hrsg): *Viral Hepatitis.* Churchill Livingstone Edinburgh, Großbritannien. 2.Auflage: 77-105.
60. **Karthigesu VD, Allison LM, Fortuin M, Mendy M, Whittle HC, Howard CR.** 1994. A novel hepatitis B virus variant in the sera of immunized children. *J.Gen.Virol.* 75: 443-448.
61. **Kekule AS, Lauer U, Weiss L, Luber B, Hofschneider PH.** 1993. Hepatitis B virus transactivator HBx uses a tumour promoter signalling pathway. *Nature* 361: 742-745.

62. **Kidd-Ljunggren K, Oberg M, Kidd AH.** 1997. Hepatitis B virus X gene 1751 to 1764 mutations: implications for HBeAg status and disease. *J.Gen.Virol.* 78: 1469-1478.
63. **Kim CM, Koike K, Saito I, Miyamura T, Jay G.** 1991. HBx gene of hepatitis B virus induces liver cancer in transgenic mice. *Nature* 351: 317-320.
64. **Koike K.** 1995. Hepatitis B virus HBx gene and hepatocarcinogenesis. *Intervirology* 38: 134-142.
65. **Koike K, Moriya K, Iino S, Yotsuyanagi H, Endo Y, Miyamura T, Kurokawa K.** 1994. High-level expression of hepatitis B virus HBx gene and hepatocarcinogenesis in transgenic mice. *Hepatology* 19: 810-819.
66. **Koike K, Shirakata Y, Yaginuma K, Arai M, Takada S, Nakamura I, Hayashi Y, Kawada M, Kobayashi M.** 1989. Oncogenic potential of hepatitis B virus. *Mol.Biol.Med.* 6: 151-160.
67. **Koike K and Takada S.** 1995. Biochemistry and functions of hepatitis B virus X protein. *Intervirology* 38: 89-99.
68. **Kremsdorf D, Garreau F, Duclos H, Thiers V, Schellekens H, Petit MA, Brechot C.** 1993. Complete nucleotide sequence and viral envelope protein expression of a hepatitis B virus DNA derived from a hepatitis B surface antigen-seronegative patient. *J.Hepatol.* 18: 244-250.
69. **Lachmund A and Sachse GE.** 1994. Das Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion und ihre Anwendungsbereiche. In: Gassen HG, Sachse GE, Schulte A (Hrsg): PCR: Grundlagen und Anwendungen der Polymerase-Kettenreaktion. Fischer Verlag Stuttgart, Jena, New York. 1.Auflage.
70. **Lamberts C, Nassal M, Velhagen I, Zentgraf H, Schroder CH.** 1993. Precore-mediated inhibition of hepatitis B virus progeny DNA synthesis. *J.Virol.* 67: 3756-3762.

71. **Landers TA, Greenberg HB, Robinson WS.** 1977. Structure of hepatitis B Dane particle DNA and nature of the endogenous DNA polymerase reaction. *J.Virol.* 23: 368-376.
72. **Laskus T, Rakela J, Tong MJ, Nowicki MJ, Mosley JW, Persing DH.** 1994. Naturally occurring hepatitis B virus mutants with deletions in the core promoter region. *J.Hepatol.* 20: 837-841.
73. **Lee H, Lee YH, Huh YS, Moon H, Yun Y.** 1995. X-gene product antagonizes the p53-mediated inhibition of hepatitis B virus replication through regulation of the pregenomic/core promoter. *J.Biol.Chem.* 270: 31405-31412.
74. **Lee JM and Bernstein A.** 1995. Apoptosis, cancer and the p53 tumour suppressor gene. *Cancer Metastasis Rev.* 14: 149-161.
75. **Levrero M, Balsano C, Natoli G, Avantaggiati ML, Elfassi E.** 1990. Hepatitis B virus X protein transactivates the long terminal repeats of human immunodeficiency virus types 1 and 2. *J.Virol.* 64: 3082-3086.
76. **Liang TJ, Hasegawa K, Rimon N, Wands JR, Ben-Porath E.** 1991. A hepatitis B virus mutant associated with an epidemic of fulminant hepatitis. *N.Engl.J.Med.* 324: 1705-1709.
77. **Liaw YF, Tai DI, Chu CM, Chen TJ.** 1988. The development of cirrhosis in patients with chronic type B hepatitis: a prospective study. *Hepatology* 8: 493-496.
78. **Lindh M, Gustavson C, Mardberg K, Norkrans G, Dhillon AP, Horal P.** 1998. Mutation of nucleotide 1,762 in the core promoter region during hepatitis B e seroconversion and its relation to liver damage in hepatitis B e antigen carriers. *J.Med.Virol.* 55: 185-190.
79. **Lindh M, Horal P, Dhillon AP, et al.** 1996. Hepatitis B virus carriers without precore mutations in hepatitis B e antigen-negative stage show more severe liver damage. *Hepatology* 24: 494-501.

80. **Lo WY and Ting LP.** 1994. Repression of enhancer II activity by a negative regulatory element in the hepatitis B virus genome. *J.Virol.* 68: 1758-1764.
81. **Lopez-Cabrera M, Letovsky J, Hu KQ, Siddiqui A.** 1990. Multiple liver-specific factors bind to the hepatitis B virus core/pregenomic promoter: trans-activation and repression by CCAAT/enhancer binding protein. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 87: 5069-5073.
82. **Lopez CM, Letovsky J, Hu KQ, Siddiqui A.** 1991. Transcriptional factor C/EBP binds to and transactivates the enhancer element II of the hepatitis B virus. *Virology* 183: 825-829.
83. **Lucito R and Schneider RJ.** 1992. Hepatitis B virus X protein activates transcription factor NF-kappa B without a requirement for protein kinase C. *J.Virol.* 66: 983-991.
84. **Magnius LO and 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.
85. **Maguire HF, Hoeffler JP, Siddiqui A .** 1991. HBV X protein alters the DNA binding specificity of CREB and ATF-2 by protein-protein interactions. *Science* 252: 842-844.
86. **Main J and Thomas HC.** 1998. Hepadnaviridae: Treatment of Chronic Hepatitis B. In: Zuckerman AJ, Thomas HC (Hrsg): *Viral Hepatitis*. Churchill Livingstone Edinburgh, Großbritannien. 2.Auflage: 227-236.
87. **Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, et a .** 1995. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83: 835-839.
88. **Margolis HS, Alter MJ, Hadler SC.** 1991. Hepatitis B: evolving epidemiology and implications for control. *Semin.Liver Dis.* 11: 84-92.

89. **Marion PL, Oshiro LS, Regnery DC, Scullard GH, Robinson WS.** 1980. A virus in Beechey ground squirrels that is related to hepatitis B virus of humans. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 77: 2941-2945.
90. **Mason WS, Seal G, Summers J.** 1980. Virus of Pekin ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus. *J.Virol.* 36: 829-836.
91. **Matsubara K and Tokino T.** 1990. Integration of hepatitis B virus DNA and its implications for hepatocarcinogenesis. *Mol.Biol.Med.* 7: 243-260.
92. **McMahon BJ, Parkinson AJ, Helminiak C, Wainwright RB, Bulkow L, Kellerman-Douglas A, Schoenberg S, Ritter D.** 1992. Response to hepatitis B vaccine of persons positive for antibody to hepatitis B core antigen. *Gastroenterology* 103: 590-594.
93. **Milich DR, Jones JE, Hughes JL, Price J, Raney AK, McLachlan A.** 1990. Is a function of the secreted hepatitis B e antigen to induce immunologic tolerance in utero? *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 87: 6599-6603.
94. **Milich DR, Schodel F, Hughes JL, Jones JE, Peterson DL.** 1997. The hepatitis B virus core and e antigens elicit different Th cell subsets: antigen structure can affect Th cell phenotype. *J.Virol.* 71: 2192-2201.
95. **Miller RH, Marion PL, Robinson WS.** 1984. Hepatitis B viral DNA-RNA hybrid molecules in particles from infected liver are converted to viral DNA molecules during an endogenous DNA polymerase reaction. *Virology* 139: 64-72.
96. **Moradpour D and Blum HE.** 1998. Clinical significance of hepatitis B virus mutants. *Schweiz.Rundsch.Med.Prax.* 87: 205-209.
97. **Moriyama K.** 1997. Reduced antigen production by hepatitis B virus harbouring nucleotide deletions in the overlapping X gene and precore-core promoter. *J.Gen.Virol.* 78: 1479-1486.

98. **Moriyama K, Okamoto H, Tsuda F, Mayumi M.** 1996. Reduced precore transcription and enhanced core-pregenome transcription of hepatitis B virus DNA after replacement of the precore-core promoter with sequences associated with e antigen-seronegative persistent infections. *Virology* 226: 269-280.
99. **Mullis KB.** 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci.Am.* 262: 56-59.
100. **Nakamura I and Koike K.** 1992. Identification of a binding protein to the X gene promoter region of hepatitis B virus. *Virology* 191: 533-540.
101. **Natoli G, Avantaggiati ML, Chirillo P, Puri PL, Ianni A, Balsano C, Levrero M.** 1994. Ras- and Raf-dependent activation of c-jun transcriptional activity by the hepatitis B virus transactivator pX. *Oncogene* 9: 2837-2843.
102. **Niederau C, Heintges T, Lange S, Goldmann G, Niederau CM, Mohr L, Haussinger D.** 1996. Long-term follow-up of HBeAg-positive patients treated with interferon alfa for chronic hepatitis B. *N.Engl.J.Med.* 334: 1422-1427.
103. **Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, Sastrosoewignjo R, Imai M, Miyakawa Y, Mayumi M.** 1988. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: Comparison of surface antigen subtypes. *J.Gen.Virol.* 69: 2575-2583.
104. **Okamoto H, Yano K, Nozaki Y, Matsui A, Miyazaki H, Yamamoto K, Tsuda F, Machida A, Mishiro S.** 1992. Mutations within the S gene of hepatitis B virus transmitted from mothers to babies immunized with hepatitis B immune globulin and vaccine. *Pediatr.Res.* 32: 264-268.
105. **Omata M, Ehata T, Yokosuka O, Hosoda K, Ohto M.** 1991. Mutations in the precore region of hepatitis B virus DNA in patients with fulminant and severe hepatitis. *N.Engl.J.Med.* 324: 1699-1704.

106. **Orito E, Mizokami M, Ina Y, Moriyama EN, Kameshima N, Yamamoto M, Gojobori T.** 1989. Host-independent evolution and a genetic classification of the hepadnavirus family based on nucleotide sequences. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 86: 7059-7062.
107. **Ou JH, Laub O, Rutter WJ.** 1986. Hepatitis B virus gene function: the precore region targets the core antigen to cellular membranes and causes the secretion of the e antigen. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 83: 1578-1582.
108. **Perrillo RP, Schiff ER, Davis GL, Bodenheimer HCJ, Lindsay K, Payne J, Dienstag JL, O'Brien C, Tamburro C, Jacobson IM.** 1990. A randomized, controlled trial of interferon alfa-2b alone and after prednisone withdrawal for the treatment of chronic hepatitis B. The Hepatitis Interventional Therapy Group. *N.Engl.J.Med.* 323: 295-301.
109. **Prives C and Manfredi JJ.** 1993. The p53 tumor suppressor protein: meeting review. *Genes Dev.* 7: 529-534.
110. **Raney AK, Johnson JL, Palmer CNA, McLachlan A.** 1997. Members of the nuclear receptor superfamily regulate transcription from the Hepatitis B virus nucleocapsid Promotor. *J.Virol.* 71: 1058-1071.
111. **Raney AK, Milich DR, Easton AJ, McLachlan A.** 1990. Differentiation-specific transcriptional regulation of the hepatitis B virus large surface antigen gene in human hepatoma cell lines. *J.Virol.* 64: 2360-2368.
112. **Ritter SE, Whitten TM, Quets AT, Schloemer RH.** 1991. An internal domain of the hepatitis B virus X antigen is necessary for transactivating activity. *Virology* 182: 841-845.
113. **Robinson WS, Clayton DA, Greenman RL.** 1974. DNA of a human hepatitis B virus candidate. *J.Virol.* 14: 384-391.
114. **Rossner MT.** 1992. Review: hepatitis B virus X-gene product: a promiscuous transcriptional activator. *J.Med.Virol.* 36: 101-117.

115. **Rossner MT, Jackson RJ, Murray K.** 1990. Modulation of expression of the hepatitis B virus surface antigen gene by the viral X-gene product. *Proc.R.Soc.Lond.B.Biol.Sci.* 241: 51-58.
116. **Runkel L, Fischer M, Schaller H.** 1993. Two-codon insertion mutations of the HBx define two separate regions necessary for its trans-activation function. *Virology* 197: 529-536.
117. **Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N.** 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354.
118. **Schuster R, Gerlich WH, 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* 24. 19: 1173-1180.
119. **Seifer M and Gerlich WH.** 1992. Increased growth of permanent mouse fibroblasts in soft agar after transfection with hepatitis B virus DNA. *Arch Virol.* 126: 119-128.
120. **Seifer M, Heermann KH, Gerlich WH.** 1990. Expression pattern of the hepatitis B virus genome in transfected mouse fibroblasts. *Virology* 179: 287-299.
121. **Seifer M, Hohne M, Schaefer S, Gerlich WH.** 1991. In vitro tumorigenicity of hepatitis B virus DNA and HBx protein. *J.Hepatol.* 13 Suppl 4.
122. **Seta T, Yokosuka O, Imazeki F, Tagawa M, Saisho H.** 2000. Emergence of YMDD motif mutants of hepatitis B virus during lamivudine treatment of immunocompetent type B hepatitis patients. *J.Med.Virol.* 60: 8-16.
123. **Shaul Y, Rutter WJ, Laub O.** 1985. A human Hepatitis B viral enhancer element. *EMBO J.* 4: 427-430.
124. **Siddiqui A.** 1991. Transcription of hepadnaviruses. In: McLachlan A (Hrsg): *Molecular Biology of the Hepatitis B Virus.* CRC Press Boca Raton 95-108.

125. **Siddiqui A, Gaynor R, Srinivasan A, Mapoles J, Farr RW.** 1989. Trans-activation of viral enhancers including long terminal repeat of the human immunodeficiency virus by the hepatitis B virus X protein. *Virology* 169: 479-484.
126. **Siddiqui A, Jameel S, Mapoles J.** 1987. Expression of the hepatitis B virus X gene in mammalian cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 84: 2513-2517.
127. **Spandau DF and Lee CH.** 1988. Trans-activation of viral enhancers by the hepatitis B virus X protein. *J.Virol.* 62: 427-434.
128. **Sprengel R, Kaleta EF, Will H.** 1988. Isolation and characterization of a hepatitis B virus endemic in herons. *J.Virol.* 62: 3832-3839.
129. **Standring DN, Ou JH, Masiarz FR, Rutter WJ.** 1988. A signal peptide encoded within the precore region of hepatitis B virus directs the secretion of a heterogeneous population of e antigens in *Xenopus* oocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 85: 8405-8409.
130. **Summers J and Mason WS.** 1982. Replication of the genome of a hepatitis B-like virus by reverse transcription of an RNA intermediate. *Cell* 29: 403-415.
131. **Summers J, O'Connell A, Millman I.** 1975. Genome of hepatitis B virus: restriction enzyme cleavage and structure of DNA extracted from Dane particles. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 72: 4597-4601.
132. **Summers J, Smolec JM, Snyder R.** 1978. A virus similar to human hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 75: 4533-4537.
133. **Takada S, Kido H, Fukutomi A, Mori T, Koike K.** 1994. Interaction of hepatitis B virus X protein with a serine protease, tryptase TL2 as an inhibitor. *Oncogene* 9: 341-348.
134. **Takada S and Koike K.** 1990. Trans-activation function of a 3' truncated X gene-cell fusion product from integrated hepatitis B virus DNA in chronic hepatitis tissues. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 87: 5628-5632.

135. **Takada S and Koike K.** 1990. X protein of hepatitis B virus resembles a serine protease inhibitor. *Jpn.J.Cancer Res.* 81: 1191-1194.
136. **Takada S and Koike K.** 1994. Three sites of the hepatitis B virus X protein cooperatively interact with cellular proteins. *Virology* 205: 503-510.
137. **Thein SL, Lynch JR, Weatherall DJ, Wallace RB.** 1986. Direct detection of haemoglobin E with synthetic oligonucleotides. *Lancet* 1: 93.
138. **Tine F, Liberati A, Craxi A, Almasio P, Pagliaro L.** 1993. Interferon treatment in patients with chronic hepatitis B: a meta-analysis of the published literature. *J.Hepatol.* 18: 154-162.
139. **Tiollais P, Charnay P, Vyas GN.** 1981. Biology of hepatitis B virus. *Science* 213: 406-411.
140. **Treinin M and Laub O.** 1987. Identification of a promoter element located upstream from the hepatitis B virus X gene. *Mol.Cell Biol.* 7: 545-548.
141. **Twu JS, Chu K, Robinson WS.** 1989. Hepatitis B virus X gene activates kappa B-like enhancer sequences in the long terminal repeat of human immunodeficiency virus 1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 86: 5168-5172.
142. **Twu JS and Schloemer RH.** 1987. Transcriptional trans-activating function of hepatitis B virus. *J.Virol.* 61: 3448-3453.
143. **Uchida T.** 1993. Genetic variations of the hepatitis B virus and their clinical relevance. *Microbiol.Immunol.* 37: 425-439.
144. **Uchida T, Saitoh T, Shinzawa H.** 1997. Mutations of the X region of hepatitis B virus and their clinical implications. *Pathol.Int.* 47: 183-193.
145. **Unger T and Shaul Y.** 1990. The X protein of the hepatitis B virus acts as a transcription factor when targeted to its responsive element. *EMBO J.* 9: 1889-1895.

146. **Van Antwerp DJ, Martin SJ, Kafri T, Green DR, Verma IM.** 1996. Suppression of TNF-alpha-induced apoptosis by NF-kappaB. *Science* 274: 787-789.
147. **Wang XW, Gibson MK, Vermeulen W, Yeh H, Forrester K, Sturzbecher HW, Hoeijmakers JH, Harris CC.** 1995. Abrogation of p53-induced apoptosis by the hepatitis B virus X gene. *Cancer Res.* 55: 6012-6016.
148. **Wasenauer G, Kock J, Schlicht HJ.** 1992. A cysteine and a hydrophobic sequence in the noncleaved portion of the pre-C leader peptide determine the biophysical properties of the secretory core protein (HBe protein) of human hepatitis B virus. *J.Virol.* 66: 5338-5346.
149. **Will H, Reiser W, Weimer T, Pfaff E, Buscher M, Sprengel R, Cattaneo R, Schaller H.** 1987. Replication strategy of human hepatitis B virus. *J.Virol.* 61: 904-911.
150. **Wollersheim M, Debelka U, Hofschneider PH.** 1988. A transactivating function encoded in the hepatitis B virus X gene is conserved in the integrated state. *Oncogene* 3: 545-552.
151. **World Health Organization.** 2001. World Health Report 1997-2001. <http://www.who.int/whr/2001./main./en./annex./annex2.htm>.
152. **Yamamoto K, Horikita M, Tsuda F, Itoh K, Akahane Y, Yotsumoto S, Okamoto H, Miyakawa Y, Mayumi M.** 1994. Naturally occurring escape mutants of hepatitis B virus with various mutations in the S gene in carriers seropositive for antibody to hepatitis B surface antigen. *J.Virol.* 68: 2671-2676.
153. **Yu X and Mertz JE.** 1997. Differential regulation of the pre-C and pregenomic promoters of human hepatitis B virus by members of the nuclear receptor superfamily. *J.Virol.* 71: 9366-9374.
154. **Zhang P, Raney AK, McLachlan A.** 1992. Characterization of the hepatitis B virus X- and nucleocapsid gene transcriptional regulatory elements. *Virology* 191: 31-41.

155. **Zhang X, Zoulim F, Habersetzer F, Xiong S, Trepo C.** 1996. Analysis of Hepatitis B Virus Genotypes and Pre-Core Region Variability During Interferon Treatment of HBe Antigen Negative Chronic Hepatitis B. *J.Med.Virol.* 48: 8-16.
156. **Zhou DX and Yen TS.** 1990. Differential regulation of the hepatitis B virus surface gene promoters by a second viral enhancer. *J.Biol.Chem.* 265: 20731-20734.
157. **Zoulim F, Saputelli J, Seeger C.** 1994. Woodchuck hepatitis virus X protein is required for viral infection in vivo. *J.Virol.* 68: 2026-2030.

Verzeichnis der Abkürzungen

A	Adenin
AA	amino acid, Aminosäure
AL	Puffer
AP	activating protein
AS	anti-sense Primer
AW	Puffer
ATF	activating transcription factor
BCP	basal core promotor, basaler Core Promotor
bp	Basenpaar
C	Cytosin
CAH	chronisch aktive Hepatitis
C/EBP	CCAAT/enhancer binding protein
CREB	cAMP responsive element binding protein
COUP-TF	chicken ovalbumin upstream promotor-transcription factor
CURS	core upstream regulatory structure
DAG	1,2 Diacylglycerol
DNA	desoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
DR	direct repeat
ε	encapsidation signal, Signal zur Einhüllung
EDTA	Ethylene Diamine Tetra-Acetate, Äthylendiamintetraessigsäure
fM	Femtomol, das 10^{-15} fache eines Mols
G	Guanin
HBV	Hepatitis B Virus
HBcAg	Hepatitis B core Antigen
HBeAg	Hepatitis B e Antigen
HBsAg	Hepatitis B surface Antigen
HBxAg	Hepatitis B x Antigen
HNF	hepatocyte nuclear factor
HRE	hormone response element

HTLV	Humanes T-Zell Leukämie Virus
IFN	Interferon
i.v.	intravenös
LHBs	large Hepatitis B surface Antigen
LTR	long terminal repeat
m	mean, arithmetischer Mittelwert
M	Mol, mol, ca. 6.023×10^{23} Elementareinheiten
MAPK	mitogen activated protein kinase
mM	Millimol, das 10^{-3} fache eines Mols
MU	million units, Million Einheiten
μ M	Micromol, das 10^{-6} fache eines Mols
NRE	negative regulatory element, negativ regulatorisches Element
PCR	polymerase chain reaction, Polymerase Ketten Reaktion
PKC	Proteinkinase C
pM	Picomol, das 10^{-12} fache eines Mols
RG	range, Spannweite
RSV	Rous Sarkom Virus
S	sense Primer
SD	standard deviation, Standardabweichung
SEM	standard error of the mean, Standardfehler des Mittelwertes
seqPCR	Sequenzierungs-PCR, Polymerase Ketten Reaktion mit fluoreszenzmarkierten Dideoxy-Nukleotiden zur Sequenz-Analyse
snPCR	seminested polymerase chain reaction, halbverschachtelte Polymerase Ketten Reaktion
STAT	signal transducer and activator of transcription
SV 40	Simian Virus 40
T	Thymidin
TBE	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylethylendiamin

TL	Teelöffel
TSG	Tumorsuppressorgen
U/l	Units/liter, Einheiten pro Liter
U/min	Umdrehung pro Minute
X-PBP	x promotor binding protein

Danksagung

Im Folgenden möchte ich für die sehr hilfreiche und freundliche Unterstützung danken:

- Herrn Prof. Dr. D. Häussinger für die hochinteressante Themenstellung der Arbeit, die Organisation hervorragender Bedingungen der Experimente sowie für die Supervision der Arbeitsfortschritte.
- Herrn Priv.-Doz. Dr. A. Erhardt für die kontinuierliche, sowohl außerordentlich gute fachliche, wie auch sehr menschliche Betreuung und den ständigen Dialog.
- Herrn Dipl. Biol. M. Hassan für methodische Hinweise und Ratschläge bei der praktischen Durchführung der Experimente.
- dem ganzen Team des „Gastro-Labors“ für das freundliche und entgegenkommende Verhalten mir gegenüber.
- der Firma G.A.T.C. Konstanz für das freundliche Überlassen einer Demonstrationsversion des Computerprogramms Lasergene.
- meiner Frau Kristin für ihr Verständnis mir gegenüber und für ihre liebevolle Betreuung meiner Person während der Anfertigung der Arbeit.

Lebenslauf

Ulf Reineke

Geburtsdatum: 27. 08. 1973
Geburtsort: Soest
Familienstand: verheiratet mit Ehefrau Kristin

1980-1984: Besuch der Melanchthon Grundschule Wickede/Ruhr
1984-1993: Besuch des Städtischen Mariengymnasiums Werl
1993: Abitur

1993-1994: Wehrdienst bei der Luftlandesanitätskompanie 270 Varel/Friesland

1994-2000: Studium der Humanmedizin an der Heinrich-Heine-Universität,
Düsseldorf

Sommer 1996: Ärztliche Vorprüfung
Sommer 1997: 1. Staatsexamen
Sommer 1999: 2. Staatsexamen
1999-2000: Praktisches Jahr in den Städtischen Kliniken Neuss
Herbst 2000: 3. Staatsexamen

2001: Arzt im Praktikum in der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde,
Stimm- und Sprachstörungen, plastische Operationen, Allergologie
im Alfried Krupp Krankenhaus Essen

seit Juli 2002: Assistenzarzt an gleicher Stelle
Februar 2006 Facharzt für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde

Abstract

Der Einfluß von X-Gen und X-Promotor des Hepatitis B Virus auf Klinik und Interferon-Therapie bei chronisch-replikativer HBe-Antigen negativer Hepatitis B

Ulf Reineke

Bei der chronisch-replikativen Hepatitis B e Antigen (HBeAg) negativen Hepatitis B ist die Signifikanz von Mutationen im X-Gen und den darin enthaltenen funktionellen Regionen wie Basaler Core Promotor (BCP), Core upstream regulatory structure (CURS) und negative regulatory element (NRE) sowie im X-Promotor für das klinische Bild der Patienten und das Ansprechen auf eine Interferon (IFN) Therapie unbekannt. Eine Sequenzanalyse von X-Gen inklusive BCP, CURS, NRE und X-Promotor wurde aus Seren von 37 Patienten mit chronisch-replikativer HBeAg-negativer Hepatitis B durchgeführt. Dabei waren 29 davon mit alfa-Interferon (IFN- α) therapiert.

Die dauerhafte Therapieerfolgsrate betrug 37,9%.

Das Ansprechen auf Interferon korrelierte dabei signifikant mit einer geringen Anzahl der Mutationen im Basalen Core Promotor und innerhalb der Nukleotide 1753-1766 sowie der Wildtyp Sequenz an Nukleotid (Nt.) 1762 und 1764, desweiteren mit der Herkunft der Patienten.

Die Prädiktion des Ansprechens auf IFN war in 80% der HBeAg-negativen Patienten anhand der Zahl an Mutationen im BCP bzw. in 78% durch den Nukleotid Status an Nt. 1764 möglich. Keine signifikanten Zusammenhänge mit dem IFN-Therapieerfolg fanden sich für die Genotypen der Patienten, die Höhe der Aminotransferasen, HBV-DNA Titer oder HBsAg Titer sowie für die Gesamtzahl der Mutationen im X-Gen oder X-Promotor, ebenso wenig wie für die Mutation an Nt. 1896, die Anzahl der Mutationen im CURS oder NRE oder die Krankheitsdauer.

Die Daten deuten daraufhin, dass innerhalb von X-Gen und basalem Core Promotor Determinanten für das Ansprechen auf eine Therapie mit Interferon zu finden sind.