

Virus-Serie (7)

Virushepatitis und B-Virusmutanten

Eine neue diagnostische
und klinische Herausforderung

Guido Gerken
Bernd Goergen
Karl-Hermann Meyer zum
Büschenfelde

Natürliche Mutationsentstehung

Das Entstehen von Mutationen ist im Rahmen der Replikation des genetischen Informationsmaterials ein ganz natürlicher Vorgang. In Abhängigkeit von der Geschwindigkeit der Replikationszyklen und der Replikationsstrategie entstehen zufällmässig Mutationen, die bei vorhandener Replikationskompetenz zu einem genetischen Viruspool im Sinne von Quasispezies führen. Durch positive Selektion der Mutanten beziehungsweise negative Selektion des Wildtypes kann dann eine Stabilisierung der Varianten innerhalb der Population eintreten (*Abbildung 1*) (6).

Aufgrund eines einzigen Nukleotidaustausches (Punktmutation) im kodierenden Bereich eines Gens entsteht eine geänderte Tripletsequenz, die nach Transkription und Translation zu einer Veränderung im Aminosäuremuster führen kann. So bedeuten neutrale Mutationen, daß trotz eines Basenaustausches in der DNA die Primärsequenz und damit die Struktur des exprimierten Proteins unverändert bleibt. Dies ist durch die Degeneriertheit des genetischen Codes begründet, das heißt, mehrere unterschiedliche Triplets können für dieselbe Aminosäure kodieren. Bei Missense-Mutationen kommt es entweder zu einem einfachen Aminosäureaustausch in der Eiweißket-

HBV-Varianten kommen weltweit vor und sind überwiegend mit chronischen und fulminanten Verläufen assoziiert, andererseits auch bei inaktiven Krankheitsformen und asymptomatischen Trägern zu beobachten. Die HBV-PräC/C-Varianten (HBe-minus-Mutanten) akkumulieren im natürlichen Langzeitverlauf nach Anti-HBe-Serokonversionen oder im Verlauf nach einer Interferon-Therapie. Der molekulare Defekt kann als ein viraler Faktor der Viruspersistenz angesehen werden. Heute sind Mutationen aus verschiedenen Genregionen des Hepatitis-B-Virus bekannt. Als Folge der häufig geringfügigen genetischen Variationen kommt es zur Modifikation wichtiger T- und B-Zell-Epitope, zum Verlust ganzer Antigene oder zu Veränderungen einzelner Genaktivitäten.

te, im Falle einer Leserastermutation zu einer kompletten Sinnverfremdung in 3'-Richtung des mutierten Lokus, oder zur Verhinderung des Translationsbeginns (Veränderungen am Initiationscodon AUG). Als Nonsense-Mutationen werden genetische Veränderungen bezeichnet, die durch die Entstehung eines Stopcodons (UAA, UAG, UAA) den Abbruch der Translation nach sich ziehen.

I. Medizinische Klinik und Poliklinik (Direktor: Prof. Dr. med. Karl-Hermann Meyer zum Büschenfelde) der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

Genetische Organisation des Hepatitis-B-Virus

Das Genom des Hepatitis-B-Virus besteht bekanntermaßen aus einer teilweise doppelsträngigen, zirkulären DNA mit einer Länge von etwa 3200 Nukleotiden (*Abbildung 2*) (10). Es existieren vier offene Leserahmen. Die Genregionen präS-1 sowie präS-2 und S kodieren für das große, das mittlere und das Haupthüllprotein (HBsAg). Der PräC/C-Bereich enthält die Information für das HBcAg als Baustein des Nukleokapsids sowie für das HBeAg, welches in membrangebundener Form ein wichtiges Zielantigen für die Immunabwehr des Wirtes und als lösliches HBeAg im Serum einen indirekten Replikationsmarker darstellt und möglicherweise an der Toleranzinduktion beteiligt ist. Das Polymerase-Gen kodiert für die virale DNA-Polymerase mit reverser Transkriptasefunktion und das x-Gen für das in vitro transaktivierende HBxAg, das bis heute in seiner Bedeutung für den viralen Lebenszyklus noch nicht vollständig aufgeklärt ist.

Aufgrund der Replikation des HBV über eine RNA-Zwischenform und die zum Teil extrem starke Vermehrung (10^9 Viren/ml Serum) ist die Entstehung von Mutationen im Hepatitis-B-Virusgenom ein normales Ereignis, und die genetische Variabilität, angegeben in Substitutionen pro Nukleotid pro Jahr, ist für alle verschiedenen offenen Leserahmen bekannt (*Tabelle 1*) (17). Die Substitutionsfrequenz von DNA-Viren ist im allgemeinen geringer als bei RNA-Viren und höher als im menschlichen Erbgut.

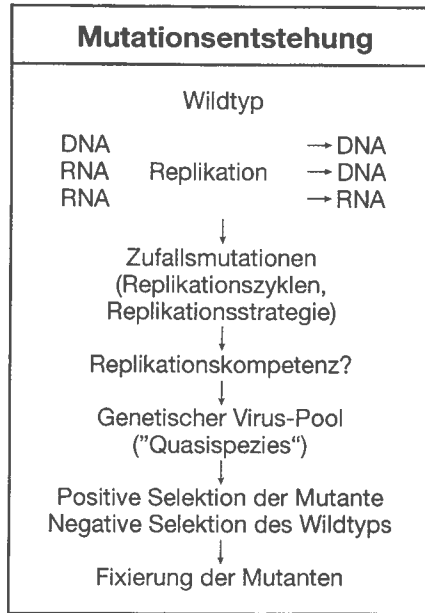
In den letzten Jahren wurden bei allen klinischen Folgezuständen

Abbildung 1: Vorstellung der Entstehung von viralen Mutationen

einer Hepatitis-B-Virusinfektion in zunehmendem Maße Virusmutationen in verschiedenen Genabschnitten nachgewiesen. Mit Hilfe der PCR-Amplifikation und der nachfolgenden DNA-Sequenzierung konnten diese HBV-Mutanten molekular identifiziert werden. Ihre klinische Bedeutung ist Gegenstand aktueller Forschungen (1).

S-Gen-Mutanten

Infolge einer einzelnen Punktmutation in der S-Gen-Region kommt es im Hüllprotein des Hepatitis-B-Virus zu einem Aminosäureaustausch bei As. 145 (Glycin zu Arginin), wodurch sich die „a“-Determinante des Antigens, gegen das die Immunantwort hauptsächlich gerichtet ist, in ihrer Konformation verändert (5). Hierdurch entstehen



HBsAg-positive „Escape-Mutanten“, die einem Teil der Immunabwehr entgehen, so daß sich trotz der Anwesenheit von anti-HBs-Antikörpern eine HBV-Neuinfektion

etablieren kann. In verschiedenen klinischen Situationen wurden solche Mutationen beschrieben:

- ① Bei einem passiv/aktiven HBV-Immunsierungsprogramm in Süditalien, bei einigen Kindern trotz primärer Impfantwort auf die verabreichte HBV-Vakzine (As. 145; Carman, 1990),
- ② in Südostasien bei einer vertikalen Transmission einer Hepatitis auf das Kind (As. 145 und 126; Okamoto, 1992)
- ③ sowie in Amerika im Rahmen einer Reinfektion nach Lebertransplantation trotz Immunglobulingabe (As. 149, 129 und 131; McMahon, 1991).

Die Entstehung oder die Selektion dieser Mutanten ist am ehesten durch den Druck des Immunsystems bedingt.

PräS-Gen-Mutanten

Kürzlich wurden auch Mutationen in den PräS1- beziehungsweise PräS2-Abschnitten des HBV-Genoms beschrieben, deren Genprodukte hauptsächlich auf kompletten 42-nm-Dane-Partikeln exprimiert sind und somit indirekte Marker der Virusreplikation darstellen. Die PräS-Gen-Region enthält eine Reihe von wichtigen genetischen Informationen (12). Hier liegt das Retentionssignal für das endoplasmatische Retikulum, der PräS2/S-Promotor, die direkte und die indirekte Bindungsstelle für die Anheftung des Virus an die Wirtszelle. Schließlich spielen die PräS-codierten Hüllproteine aufgrund ihrer starken Immunogenität eine äußerst wichtige Rolle in der Entwicklung der Immunantwort.

Es konnten MHC-I-restringierte zytotoxische T-Zell-Klone gegen

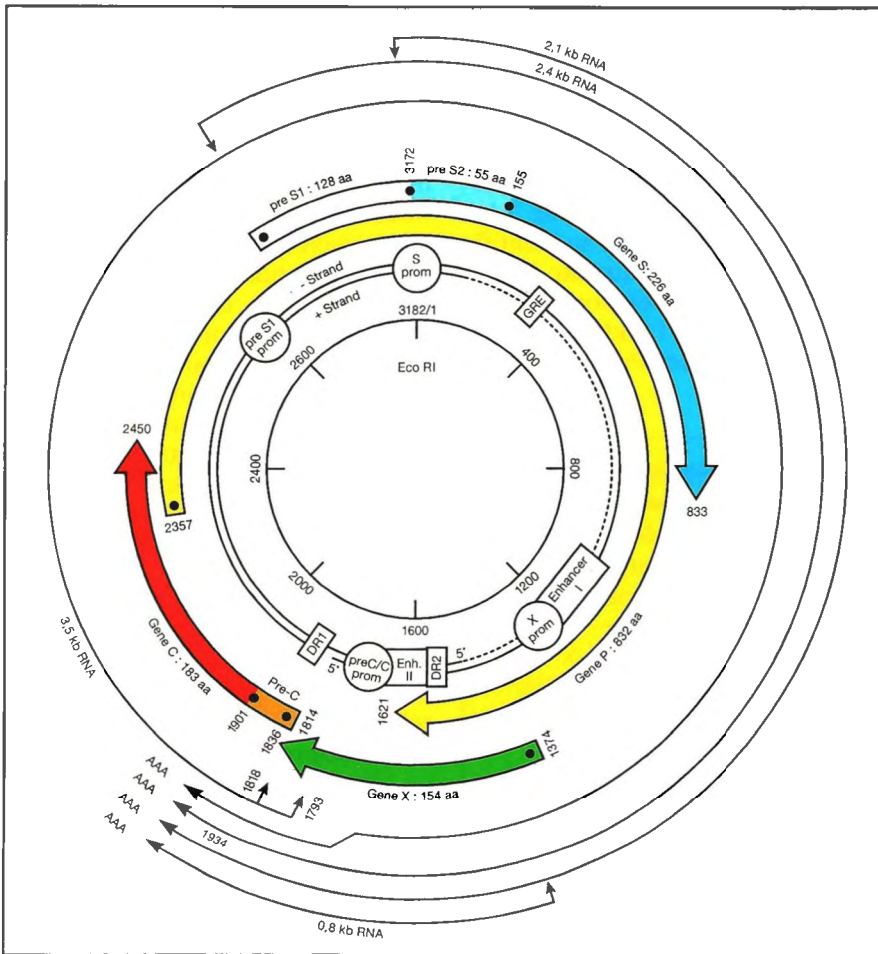


Abbildung 2: Genetische Organisation des Hepatitis-B-Virus (Subtyp ayw); EcoRI: Schnittstelle der Restriktionsendonuklease EcoRI, vereinbarungsgemäß Beginn der Numerierung des HBV-Genoms; GRE: Glucocorticoid Responsive Element (engl.) Glukokortikoid-Antwortelement; Enh: Enhancer (engl.) Transkriptionsverstärker; DR: Direct Repeat (engl.) Direkte Sequenzwiederholung; prom.: Promoter, Bindungsstelle der RNA Polymerase, aa: amino acid (engl.) Aminosäure

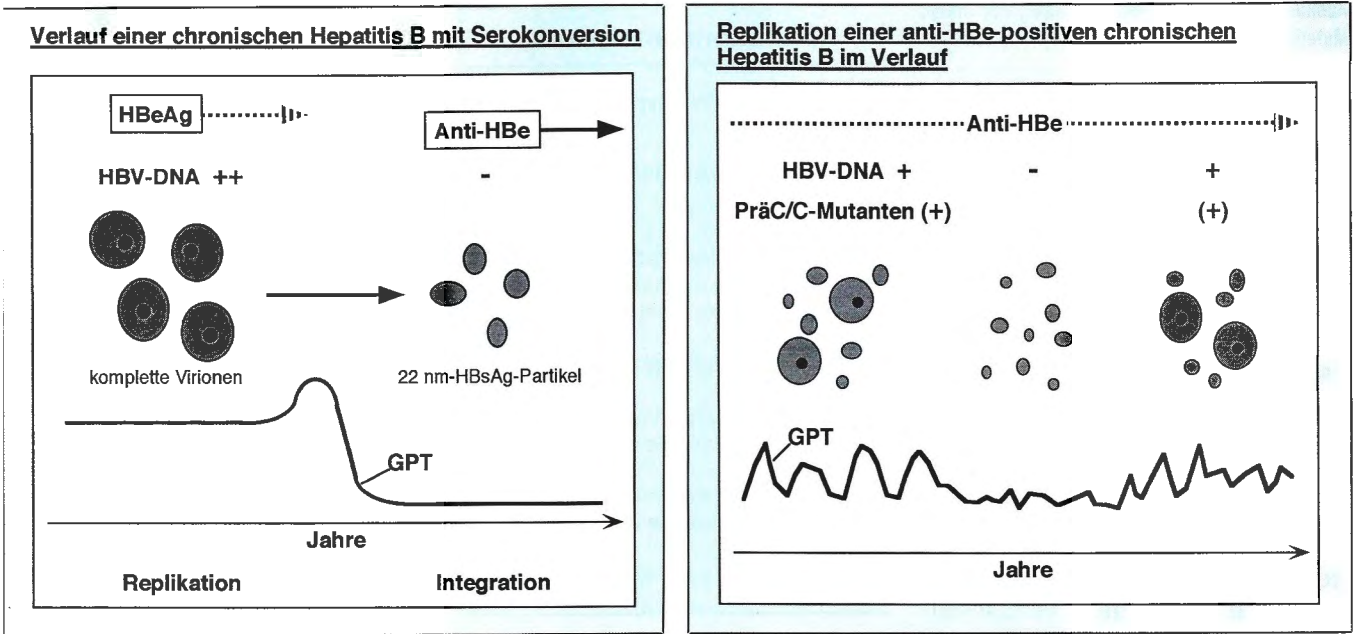


Abbildung 3: a) Verlauf einer chronischen Hepatitis B mit Serokonversion von HBeAg zu anti-HBe b) Verlauf einer anti-HBe-positiven chronischen Hepatitis B mit fluktuierender Virusreplikation

die PräS2-Region identifiziert werden. MHC-II-restringierte T-Helferzellen und B-Zellen sind wiederum überwiegend gegen Epitope der Oberflächenproteine gerichtet. Dies ist besonders für die Elimination zirkulierender Viruspartikel bedeutsam. Bei Schimpansen, die mit präS2-kodierten Peptiden immunisiert wurden, konnte ein HBV-Impfschutz erreicht werden. Ebenso zeigt sich, daß die PräS-Proteine wesentlich immunogener als das HBsAg alleine sind und eine Immunisierung mit mittlerem Hüllprotein das Nicht-Ansprechen auf die Im-

munisierung mit kleinem Hüllprotein umgehen kann.

Kürzlich gelang es unserer Arbeitsgruppe, aus dem Serum eines Patienten mit einer chronischen Hepatitis B und einem hepatozellulären Karzinom durch PCR mit präS-spezifischen Primern und anschließender Klonierung und Sequenzierung unterschiedliche Hepatitis-B PräS-Varianten zu identifizieren, wobei die dominante Viruspopulation eine Deletion in den vorbeschriebenen, funktionell wichtigen Bereichen des PräS-Gens aufwies (11).

Mittlerweile konnten wir weitere Fälle mit einer Mutation im Startcodon des PräS2-Gens sowie mit Deletionen in der PräS2/präS1-Übergangssequenz identifizieren. Diese Mutationen fanden wir bei Patienten mit chronischer Hepatitis B nicht nur im Serum, sondern auch in Lymphozyten und im Lebergewebe. PräS-Mutanten sind inzwischen weltweit, nicht nur in Südostasien, sondern auch in Mittel- und Südeuropa, beschrieben. In der Arbeitsgruppe von Prof. Bréchet, Institut Pasteur, Paris, wurde erstmals bei Patienten im Langzeitverlauf die selektive Anreicherung der Hepatitis-B-präS-Mutanten bei gleichzeitigem völligen Verschwinden des Wildtyps beobachtet (21).

Tabelle 1: Variabilität der verschiedenen Hepatitis-B-Virus-Genregionen

Virus/Tier	Leserahmen	Anzahl der Codons	Substitutionen pro Nukleotid und Jahr
HBV	P	843	$4,57 \times 10^{-5}$
	PräS	163	$7,62 \times 10^{-5}$
	S	259	$5,75 \times 10^{-5}$
	C	212	$5,54 \times 10^{-5}$
	X	154	$7,9 \times 10^{-5}$
MMLV Säugetiere	Gag	537	$1,16 \times 10^{-3}$
	α -Globin	141	$3,94 \times 10^{-9}$

Orito et al., 1989
Okamoto et al., 1987

Mutationen in der PräC/C-Gensequenz

Serologisch sind bei der chronischen Hepatitis B zwei Phasen zu differenzieren (Abbildung 3a):

▷ die replikative Frühphase mit Nachweis von HBsAg, HBeAg und HBV-DNA mit gleichzeitigem Nachweis von pathologischen Transaminasen sowie

▷ die nicht replikative Spätphase mit Nachweis von anti-HBe

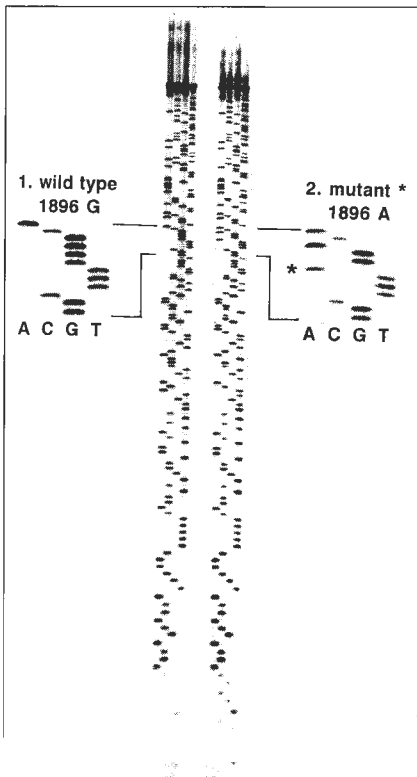


Abbildung 4: Nachweis von HBV-Wildtyp (links) und einer Stopcodonmutation (Nt. 1896 G→A, rechts) mit Hilfe der direkten Festphasensequenzierung von PCR-Produkten aus der HBV-PräC/C-Region

bei negativer HBV-DNA und normalen Transaminasen.

Bei etwa zwei bis fünf Prozent der Fälle jedoch kann auch nach der Serokonversion zu anti-HBe die Virusreplikation erneut einsetzen (Abbildung 3b) (2). Meist werden bei diesen Patienten dann PräC/C-Genvarianten im Serum und in der Leber, zum Teil auch in mononukleären Zellen des peripheren Blutes identifiziert (16). Die mit Abstand häufigste HBV-Variante im PräC/C-Genbereich stellt eine Stopcodon-Mutation (GA Transition an Nt. 1896/1897, Subtyp adw, Abbildung 4) am 3'-Ende des PräC-Gens dar (4). Diese Punktmutation ruft einen Abbruch der Translation des PräC/C-Vorläuferproteins (p25c) als Vorstufe des sezernierten und membrangebundenen HBeAg hervor. Die HBeAg-Produktion ist somit blockiert, während die Virusvermehrung selbst unbeeinflusst bleibt. Der Nachweis dieser Mutantenformen kann mit Hilfe der direkten Festphasensequenzierung von

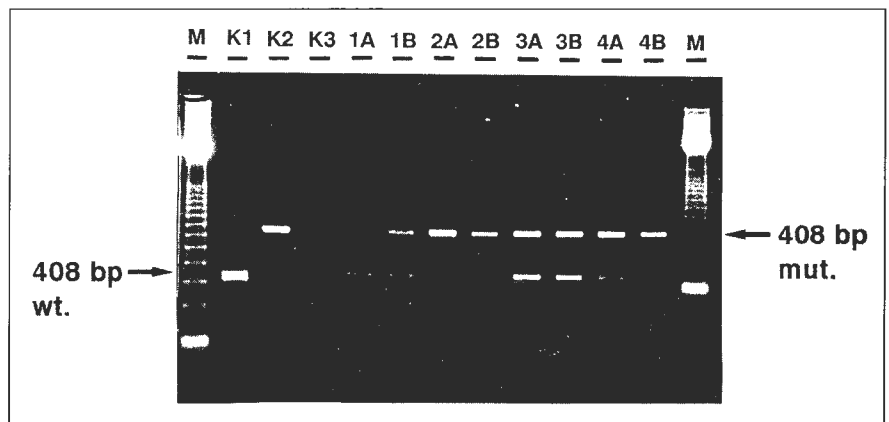


Abbildung 5: Nichtradioaktive Identifizierung eines HBV-PräC-Stopcodons (G→A-Transition am Nt. 1896 [adw]) mit der mutationsspezifischen PCR. Da die separat amplifizierten PCR-Produkte aus einem Serum dieselbe Länge haben, trugen wir sie zu unterschiedlichen Zeitpunkten auf das Agarosegel auf. M = 123 bp-Leiter, K1 = Wildtypkontrolle, K2 = Mutationskontrolle, K3 = H₂O-Kontrolle, 1–4 = mutationsspezifisch amplifizierte Virus-DNA aus den Patienten-Seren, jeweils vor (A) und nach (B) IFN-Therapie

PCR-Produkten und durch alternative indirekte Verfahren, wie mutationsspezifische PCR (Abbildung 5), Oligonukleotidhybridisierungen, einfach und sicher durchgeführt werden.

Bei etwa vier Fünftel der Patienten mit anti-HBe-positivem HBV-Status zeigen eigene Sequenzierungsuntersuchungen Mutationen im PräC/C-Bereich (13). Neben Stopcodonmutationen existieren vielfach Startcodonveränderungen (Nt. 1814–1816 Subtyp adw) und Leserastervarianten, welche die

HBeAg-Synthese verhindern, im Gegensatz zu zahlreichen „Missense“-Mutanten, deren Bedeutung für die HBV-Biologie erst noch geklärt werden muß.

Im natürlichen Verlauf einer chronischen Hepatitis B werden solche Varianten häufig nach einer Serokonversion von HBeAg zu anti-HBe (Abbildung 6) (20) nachgewiesen. Bei einer Patientin mit anti-HBe-positivem, chronischem HBsAg-Trägerstatus beobachteten wir im Gefolge einer anti-tuberkulostatischen Therapie die Reaktivierung

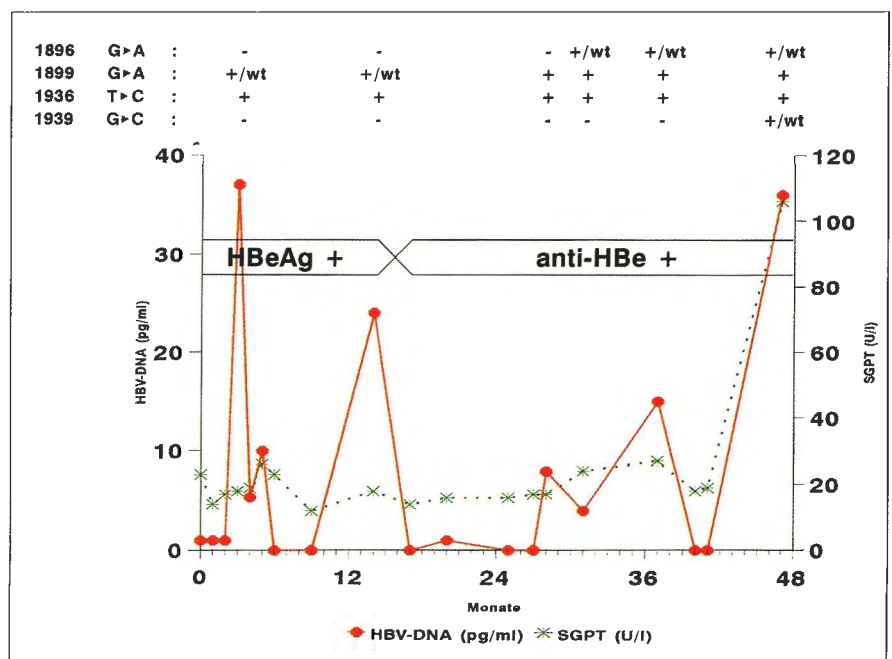


Abbildung 6: Entstehung von HBV-präC/C-Mutanten im natürlichen Verlauf einer chronischen Hepatitis B

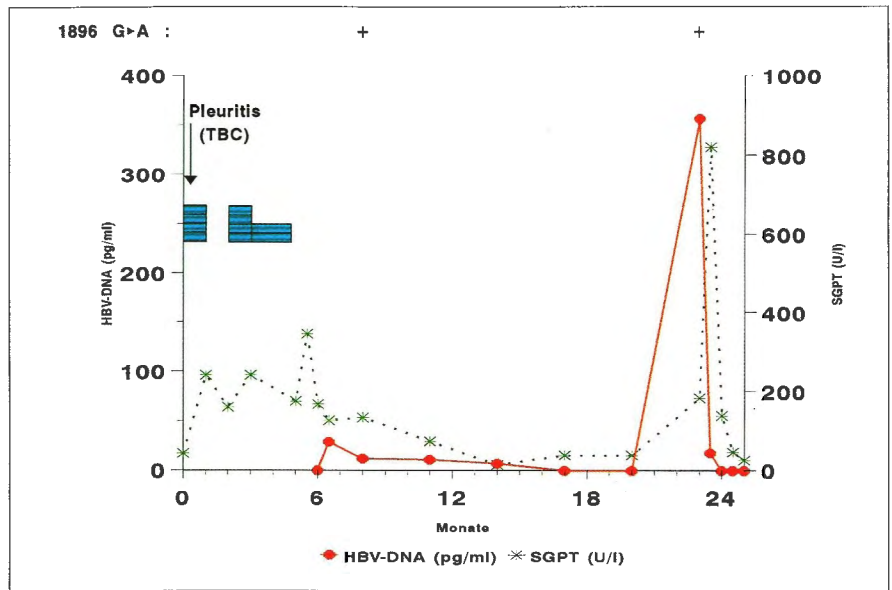
Abbildung 7: Reaktivierung einer Prä-C/C-Stop-Codon (Ncl. 1896) – HBV-Variante bei chronischer Hepatitis B nach tuberkulostatischer Therapie

der Virusreplikation. Die HBV-Sequenzierung erbrachte den Nachweis eines HBV-Prä-C/C-Stopcodons (Abbildung 7).

Nach spontaner Normalisierung der Transaminasen und Sistieren der HBV-Replikation reaktivierte die Erkrankung erneut mit einer akuten Hepatitis mit Virusreplikation.

Das Auftreten der PräC/C-Mutanten ist bei Patienten mit chronisch aktiven Hepatitiden beziehungsweise Leberzirrhosen gehäuft, aber auch bei der chronisch persistierenden Form oder bei den asymptomatischen Trägern können Virusvarianten vorhanden sein (22). Dies wird mittlerweile auch durch zahlreiche Untersuchungen aus allen geographischen Regionen der Welt bestätigt. Daneben herrschen HBV-Varianten allerdings auch bei fulminanten Verlaufsformen vor (18). So ließ sich anhand einer Metaanalyse von fünf Studien zeigen, daß in 40 von 44 Fällen fulminanter B-Hepatitis PräCore-Mutanten vorhanden waren, während bei der ausheilenden, akuten Verlaufsform keine PräCore-Varianten auftraten.

Ein besonderes klinisches Problem der PräCore-Mutanten stellt



deren Behandlung dar. Exemplarisch wird dies verdeutlicht bei einem Patienten mit einer fluktuierenden replikativen anti-HBe-positiven chronischen Hepatitis B und histologischem Nachweis einer chronisch aktiven Hepatitis.

Im Rahmen einer sechsmonatigen α -Interferontherapie zeigte sich ein komplettes Ansprechen mit Verschwinden der HBV-DNA aus dem Serum bereits innerhalb eines Monats mit deutlich verbesserter Leberhistologie nach Ende der Therapie (Abbildung 8). Jedoch innerhalb eines Jahres nach der Be-

handlung trat eine Reaktivierung mit einer akuten Hepatitis mit positiver HBV-DNA und Nachweis der PräC/C-Mutanten auf.

Derartige Reaktivierungen werden sowohl kurzzeitig nach Absetzen der Therapie beobachtet, können sich aber auch unter Fortschreiten der Erkrankung erst nach einem mehrjährigen inaktiven Intervall manifestieren. Dies weist auf die pathogenetische Bedeutung der HBV-Mutanten hin. Im Rahmen einer Pilotstudie in unserer Klinik wurden insgesamt 18 anti-HBe- positive Patienten mit chronischer Hepatitis B mit Interferon therapiert. Die komplette Ansprechrate unter Therapie war hoch (89 Prozent), in den übrigen Fällen fand sich zumindest ein partieller Response mit Reduktion der Transaminasen. Ein Jahr nach Therapie erfolgte jedoch die Krankheitsreaktivierung bei 14 von 18 Fällen (78 Prozent).

Entsprechend den Gensequenzanalysen handelte es sich hierbei in zwei Fällen um reine HBV-Wildtypinfektionen, bei zwölf Patienten konnten hingegen die PräCore-Mutanten identifiziert werden, darunter in sechs Fällen als Mischpopulation mit Wildtyp-Hepatitis-B-Viren. Diese Erfahrungen werden durch internationale Studien bestätigt (3, 8, 14, 15).

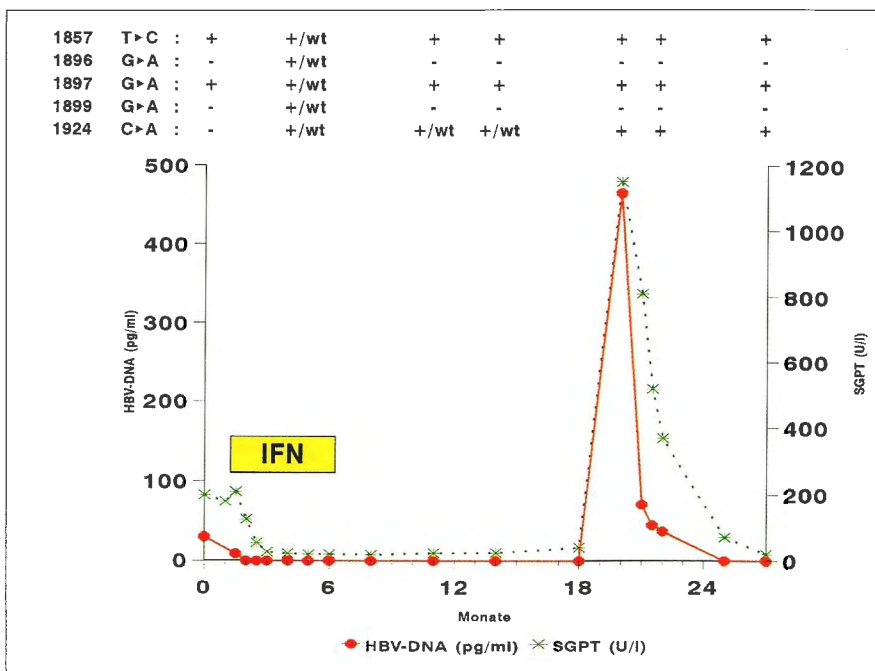


Abbildung 8: Reaktivierung einer chronischen, anti-HBe-positiven Hepatitis B nach Interferon-Therapie

Perspektiven

① Die Bedeutung der Virusvariationen für die Leber der Patienten ist weiterhin unklar. Daß bei solchen Patienten mit Stopcodonmutanten das HBeAg im Lebergewebe zumindest exprimiert werden kann, wirft die Frage auf beziehungsweise bestätigt, daß es sich häufig um Mischpopulationen zwischen Wildtyp und Mutante handelt. Möglicherweise ist die Wildtyppopulation notwendig, um Defektfunktionen von Virusvarianten zu komplementieren. Wir haben dies bei einer Reihe von anti-HBe-seropositiven Patienten mit HBe-minus-Mutanten in Serum und Leber untersucht. In zwei dieser Fälle ließ sich die Expression des HBeAg sowie des PräC-Peptids in der Leber immunhistologisch nachweisen (7). Bei weiteren Fällen ließ der HBV-PräC/C-Genotyp im Serum aber durchaus Rückschlüsse auf das HBeAg/PräC-Peptid-Expressionsmuster in der Leber zu, wie zum Beispiel bei einem Patienten, dessen ausschließlich vorhandene HBV-Leserastervariante weder mit der Synthese des HBeAg noch des PräC-Peptids vereinbar ist. Welche Rolle die mögliche Expression des PräC-Peptids als ein aberrantes Protein für die Zellschädigung im Gewebe spielen kann, muß in Zukunft eingehender untersucht werden.

② Die Frage, ob und in welcher Weise HBV-Varianten auf molekularer Ebene die Pathogenese beeinflussen, ist Gegenstand aktueller und zukünftiger Forschungen. Die Transfektion klonierter HBV-Genome voller Länge in permissive Zellen wird auch darüber Auskunft geben, ob

► einheitliche Mutantenpopulationen überhaupt voll replikationskompetent sind,

► ob und welche neuen Proteine von ihnen synthetisiert werden und

► wie sich die durch Mutation neu erworbenen Eigenschaften auf den Stoffwechsel der Wirtszelle auswirken.

③ Die fehlende Korrelation der Virusvariabilität zum Schädigungsmuster der Leber wirft die Frage auf, welche Rolle die zelluläre Immunantwort für das Ergebnis einer Infektion mit HBV-Mutanten spielt. Die Ergebnisse internationaler Arbeitsgruppen belegen, daß fast alle Patienten im Rahmen der akuten Hepatitis B ausgeprägte spezifische Immunantworten auf Nukleokapsidproteine aufweisen (9). In unserer Arbeitsgruppe wird mit Hilfe rekombinanter HBV-Proteine die Proliferation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) und direkt aus der Leber als Maß für die zelluläre Antwort gegen das Hepatitis-B-Virus bei Patienten mit Wildtyp- und mit Mutanteninfektionen gemessen (19). Erste Ergebnisse zeigen, daß es zu einer Proliferation von HBe/HBeAg-spezifischen T-Zellen auch bei Patienten mit HBe-minus-Mutanten kommt.

Tabelle 2: Nachweis und Auswirkungen von Mutanten mit unterschiedlicher Lokalisation im HBV-Genom – HBV-Mutanten: Faktoren der Viruspersistenz

Gen	Mutationsfolge	Bedeutung
S	Verlust der „a“-Determinante	→
präS	Verlust von B/T-Zellepitopen Verlust der PräS ₂ -Promotorregion Inaktivierung des PräS ₂ -Startcodons	→ Fluchtmutanten
präC/C	Verlust des HBeAg	→
C	Verlust von T-Zellepitopen	→
P	Verlust der Polymerase	Replikationsdefekt
X	?	?

Die Autoren danken den beiden MTAs Frau S. Jakobs und Frau S. Mies für die ausgezeichnete technische Mitarbeit. Die Arbeit wurde unterstützt durch die DFG SFB 311, A 13

Deutsches Ärzteblatt

91 (1994) A-3288–3293 [Heft 47]

Die Zahlen in Klammern beziehen sich auf das Literaturverzeichnis im Sonderdruck, anzufordern über die Verfasser.

Anschrift für die Verfasser:

Priv.-Doz. Dr. med. Guido Gerken
I. Medizinische Klinik und
Poliklinik
Johannes-Gutenberg-Universität
Langenbeckstraße 1
55131 Mainz

Im Rahmen der Virus-Serie im Deutschen Ärzteblatt sind bisher erschienen:

1. Zur Hausen H: Krebsentstehung durch Infektionen – ein wichtiger, noch wenig beachteter Sektor der Krebsforschung 91 (1994): A-738–740 [Heft 11]
2. Bialasiewicz A, Jahn GJ: Augenbefunde bei Virusinfektionen außer AIDS, 91 (1994): A-905–914 [Heft 13]
3. Zur Hausen H: Papillomvirusinfektionen als Ursache des Gebärmutterhalskrebses 91 (1994): A-1945–1948 [Heft 28/29]

Abschließend werden in den nächsten Heften zwei weitere Beiträge zu den Themen „Infektionen mit dem Epstein-Barr-Virus“ und „Viren und Arthritis“ erscheinen.

MWR