

HEPATIT B-INFEKTIONEN UPPVISAR OLIKA ANSIKTEN

Variationer i virus DNA ger en möjlig förklaring

Infektion med hepatit B-virus (HBV) kan leda till mycket varierande sjukdomsbilder, alltifrån subklinisk, övergående infektion till fulminant hepatit eller levercancer. Framför allt molekylär-epidemiologiska studier har på senare år visat att variationer i virus DNA, inte bara den enskilda patientens immunsvår, kan förklara de skilda tillstånd man ser. HBV-DNA varierar naturligt mellan olika genotyper, men dessutom kan mutationer uppstå för att bland annat undkomma värdens immunsvår.

En elegant epidemiologisk studie titulerad »Eine nosokomiale Ikterusepidemie» beskrev Flaum och medarbetare 1925 [1] ett utbrott av virushepatit vid medicinska kliniken i Lund. Diabetespåttar och laboratoriepersonal insjuknade med varierande grad av leverpåverkan. Efter visst detektivarbete fann man att de insjuknade varit i kontakt med en »Frankescher Schnapper» som användes för blodprovstagning i örsnibben. Denna Schnapper återanvändes mellan patienterna och torkades bara av då och då med en etersudd. De sista icterusfallen uppträdde tre månader efter det att laboratoriets »Frankescher Schnapper» utbytts mot sedvanliga lansetter som förvarades i koncentrerad sprit.

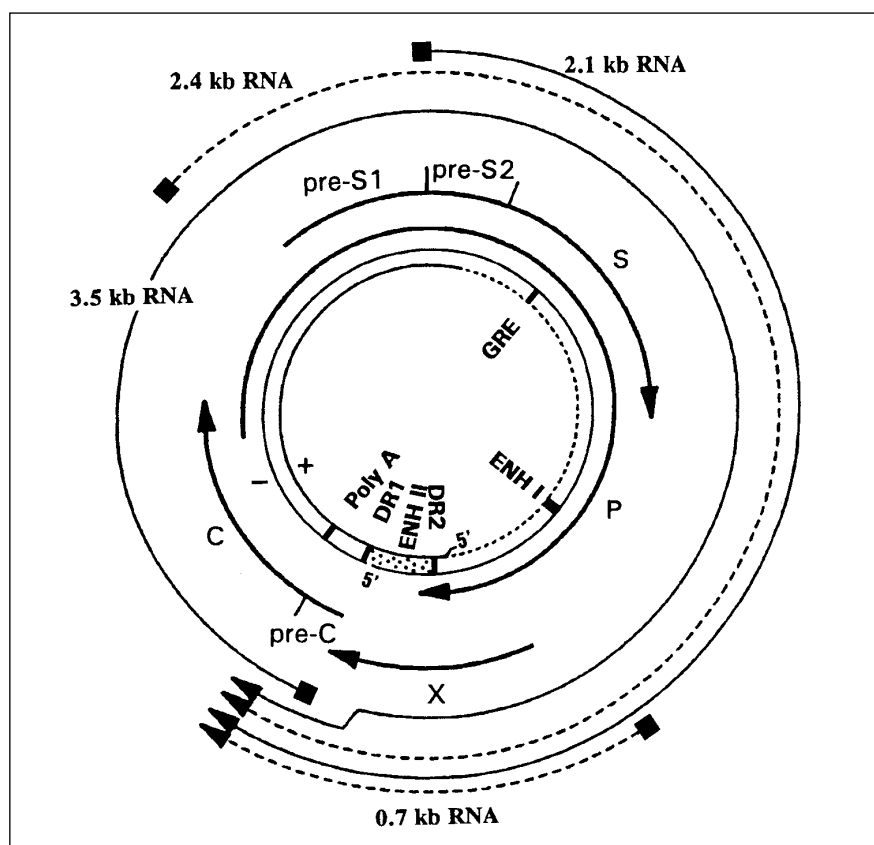
Härav drog man den tentativa slutsatsen att gulsoten orsakades av ett okänt agens som smittade via blod, med en beräknad inkubationstid på mellan 21 och 176 dagar.

Det skulle dröja 40 år innan Blumberg och medarbetare [2] identifierade

Författare

KARIN KIDD-LJUNGGREN

med dr, avdelningsläkare, infektionskliniken, Universitetssjukhuset, Lund; för närvarande verksam vid avdelningen för virologi, Umeå universitet.



Figur 1. Hepatit B-virusets genom. De inre pilarna indikerar öppna läsramar, medan de yttre visar de olika RNA som bildas. Viktiga regulatoriska sekvenser är indikerade på de inre cirkelarna som föreställer delvis dubbelsträngat DNA.

hepatit B-virus (HBV), det agens som med all sannolikhet orsakade Lunda-epidemin. Sedan dess har HBV klonats och sekvensbestämts [3], visat sig kroniskt infektera drygt 300 miljoner människor i världen och åstadkomma en avsevärd såväl mortalitet som morbiditet bland akut och kroniskt infekterade.

Med nyare molekylärbiologiska tekniker har HBVs arvs massa, ett delvis dubbelsträngat DNA, studerats intensivt de senaste åren. Man har där kunnat se att förändringar i HBV-DNA, antingen i form av naturligt förekommande variationer eller nyuppkomna mutationer, kan förändra virus så att skillnader i den kliniska bilden hos de infekterade uppkommer [4].

Klinik

Vid akut infektion med HBV insjuknar mindre än 1 procent i fulminant hepatit. Ca 90 procent av infekterade vuxna tillfrisknar och utvecklar antikroppar

(anti-HBs) mot HBVs ytantigen (HBsAg). De övriga blir kroniska HBsAg- eller HBV-bärare, vilket definieras som HBsAg-positivitet i mer än sex månader. Kroniskt bärarskap av HBV leder till varierande grad av lever-skada, med risk för utveckling av kronisk, aktiv hepatit, cirrhos och levercancer [5].

Sjukdomsbilden vid neonatal smitta skiljer sig från den vanliga kliniska sjukdomsbilden såtillvida att färre patienter visar kliniska symtom som vid akut leverskada, medan upp till 90 procent av infekterade blir kroniska bärare [6]. Den höga prevalensen kroniska HBV-bärare i Sydostasien och delar av Afrika (5–15 procent) har ansetts bero

på att den vertikala smittspridningen (från mor till barn) är vanligare där än i övriga delar av världen.

Hepatit B-virus morfologi och genetik

HBV-partikeln är relativt stor (42 nm) i förhållande till längden på sitt DNA (3 200 baspar). Det beror på att olika läsramar i DNA utnyttjas på ett sinnrikt sätt så att samma baspar kan delta i kodningen för mer än ett protein (Figur 1). HBV-DNA kodar därmed för ca 50 procent mera protein än förväntat av dess längd [7].

Viruspartikelns yttre skal består av HBsAg (S) och pre-S-proteiner, kodade för av pre-S1, pre-S2 och S-generna (Figur 2). Flera B- och T-cellsepitoper har kartlagts på såväl pre-S- som S-regionerna [4]. Pre-S-proteinerna medierar bindningen av virus till hepatocytmembranet och kan ge upphov till neutraliserande antikroppar [3].

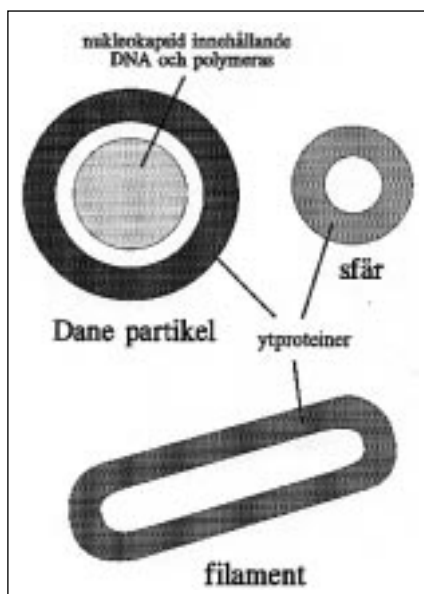
I S-proteinet finns determinanterna för såväl de olika antigena subtyperna och för den immundominanta α -determinanten.

Innanför skalet finns en kärna, uppbyggd av core-protein (HBcAg) som kodats för av core-genen. HBcAg förekommer även i en löslig, något kortare form och kallas då för HBeAg. Precore-genen kodar för en signalpeptid som klyvs av från core-proteinet när det binds till det endoplasmatiske retiklet i cellen [3]. Delar av signalpeptiden ingår i HBeAg. Precore-regionen har tilldragit sig stort intresse i olika mutationsstudier; den har även betydelse för virusets replikationscykel [8].

Kärnan omsluter det cirkulära, delvis dubelsträngade HBV-DNA, samt det största HBV-proteinet, polymeras. Det senare har flera funktioner, samtliga relaterade till virusets replikation som – till skillnad från andra DNA-virus – går via ett steg med omvänd transkription [3].

Ytterligare likheter med retrovirus hittar man i X-genen som kodar för X-proteinet, med transaktiverande funktion och implicerat i utvecklingen till levercancer [9].

Förändringar i de olika HBV-generna har associerats med utvecklingen av



Figur 2. Skiss av de tre olika HBV-partiklar som kan förekomma i serum, där Dane-partikeln representerar den kompletta virionen. De olika grånyanserna i ytskikten visar proportionen pre-S-proteiner (ljus grått = inga pre-S1-proteiner och få pre-S2-proteiner).

skilda sjukdomsbilder vid infektion med HBV.

Sjuka och friska smittbärare

Smittsamhet och grad av leverskada är två olika parametrar för att bedöma kroniska HBV-bärare. Graden av leverskada hos en enskild patient bestäms bäst med leverbiopsi. Men även transaminaser och bilirubin är av betydelse då man följer kroniska HBV-bärare.

Bedömning av smittsamhet är däremot svårare. Under många år betraktades HBsAg-positiva patienter som serokonverterat från HBeAg till anti-HBe som icke smittsamma. Detta baserades dels på empiriska observationer, dels på en experimentell studie där chimpanser inokulerats med HBeAg-positivt respektive anti-HBe-positivt blod. Med

nuvarande tekniker för att mäta virusreplikation, framför allt polymeraskedje-reaktion (PCR), har man funnit HBV-DNA även hos vissa anti-HBe-positiva patienter [10]. Då detektionsnivån med HBV-PCR är jämförbar med »chimpanse-infektös dos» [11] bör därför alla patienter med påvisbart HBV-DNA i serum betraktas som smittsamma, oavsett HBeAg/anti-HBe-status.

I USA och norra Västeuropa är anti-HBe-positiva kroniska bärare ofta PCR-negativa; leverstatus hos dessa patienter är oftast normalt. I Medelhavsområdet, däremot, och även i Sydostasien, ser man anti-HBe-positiva patienter med förhöjda leverenzymnivåer i serum och hög virusreplikation [4]. Sannolikt är det de olika genotyperna av HBV som orsakar skillnaden i klinik mellan olika geografiska områden.

Hos de anti-HBe-positiva patienterna med aktiv virusreplikation har man sett en mutation i precore-genen, ledande till ett stopp i kodon 28 som hindrar HBeAg från att uttryckas (Figur 3). Patienten skulle därmed serokonvertera till anti-HBe [4, 12]. I många fall beskrivs även blandinfektioner med muterade och omuterade stammar, sannolikt tydande på en övergång till muterade stammar, som ter sig dominanta. Dessa stammar, som ofta benämns »precoremutanter» har också felaktigt kallats för »HBe minus HBV». I några rapporterade fall har man nämligen hittat den muterade stammen i HBeAg-positiva sera [13-15]. Detta har lett till att andra mekanismer för serokonversion från HBeAg till anti-HBe har övervägts.

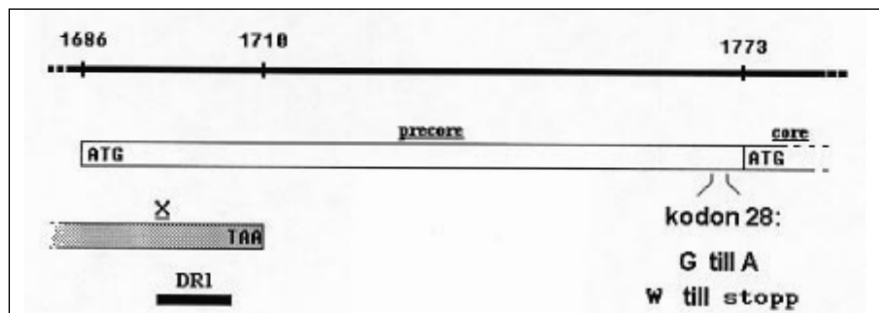
Transkriptionen av precore- och core-generna styrs av en sekvens i X-genen kallad »core promoter». Man har hittat en lika god korrelation mellan HBeAg/anti-HBe-status och mutationer i en kort sekvens av core promoter som mellan HBeAg/anti-HBe-status och mutation i precore-kodon 28 [16, 17].

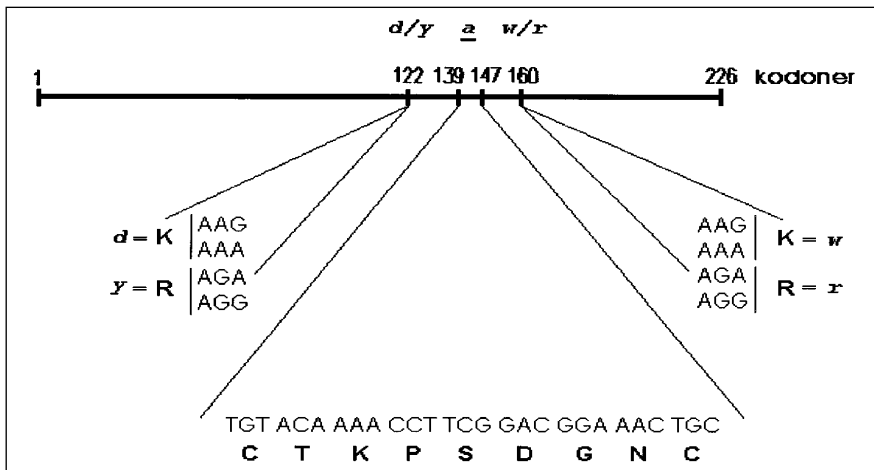
Fulminanta hepatiter

Ett utbrott av fulminant hepatit B hos sex patienter på ett sjukhus i Haifa 1986 ledde till fem dödsfall. Smittkälla var en anti-HBe-positiv kronisk bärare [18]. Senare studier har visat att patienterna var infekterade av samma stam och att denna hade en stoppmutation i precore-kodon 28, identisk med de vanliga rapporterade kodon 28-mutationerna [19]. Samma mutation har hittats i flera andra fall med fulminant hepatit B [4].

I en experimentell studie visade sig en stam som givit upphov till fulminant hepatit även orsaka aggressiv hepatit hos chimpanser, samt innehålla ett flertal mutationer, inklusive stopp i precore-kodon 28 [20]. Vid en genomgång av 40 fall av fulminant hepatit B i USA fann man att även HBV-stammar utan

Figur 3. Regionen runt precore-genen. Precore- och X-generna går omlott. DR1 är en regulatorisk sekvens som är essentiell för virusreplikationen. Mutationen som kan förekomma i kodon 28 är indikerad.





Figur 4. HBV S-proteinet med de subtypspecifika kodonerna och den sannolika lokaliseringen för den immundominanta α -determinanten.

mutation i precore-kodon 28 gav upphov till fulminant hepatit [21]. Sannolikt har co-infektion med andra virus (HCV, HDV) lika stor betydelse i utvecklingen till fulminant hepatit som mutationer i precore-regionen.

Levercancer

Prevalensen av bärare av hepatit B varierar avsevärt i olika delar av världen. I det närmaste identiska geografiska variationer förekommer för prevalensen av levercancer. Sålunda följs en hög prevalens av levercancer och kroniskt HBV-bärarskap åt. År 1981 kom en epidemiologisk rapport från Taiwan, där Beasley och medarbetare funnit att hepatocellulär cancer var 200 gånger vanligare hos kroniska HBV-bärare i ett material på över 22 000 män [22]. Både epidemiologiska och molekylära studier har nu bekräftat sambandet mellan HCC och HBV [9].

På den molekylära sidan är det framför allt X-proteinet med sin transaktiverande förmåga som har en onkogen potential. Dels inhiberar det den DNA-bindande aktiviteten hos p53 [23], dels har den visats transaktivera flera cellulära onkogen [24]. Den transaktiverande funktionen är sannolikt lokaliserad till Kunitz-domänliknande delar av X-proteinet, vilket innebär att X även är en serinproteashämmare [25, 26]. De två Kunitz-domänliknande delarna av X-proteinet är väl konserverade mellan olika HBV-stammar [17]. Mutationer i dessa regioner har betydelse för den transaktiverande förmågan och kan därmed påverka risken för utveckling av hepatocellulär cancer.

Falskt HBsAg-negativa och »vaccine-escape mutants»

Den immundominanta epitopen hos HBsAg på HBV-partikelns yta, be-

nämnd α -determinanten, består av minst nio och möjligen upp till 24 aminosyror [27, 28]. Vissa test för detektion av HBsAg, liksom kroppens egen anti-HBs-produktion, riktar sig mot just denna sekvens.

I början av 1990-talet kom rapporter om fall med akut hepatit B hos patienter som framgångsrikt vaccinerats mot hepatit B och utvecklat skyddande antikropps nivåer (anti-HBs) [4, 28]. De akuta hepatiterna visade sig orsakas av HBV-stammar med en mutation i α -determinanten som ändrade den mer hydrofoba aminosyran glycin 145 till hydrofila arginin, därav namnet »vaccine-escape mutants» (Figur 4 och 5). Waters och medarbetare [29] kunde i experimentella system bekräfta de förändrade egenskaperna hos den muterade stammen.

Även andra aminosyror i α -determinanten har påvisats kunna vara förändrade, med påföljande klinisk infektion hos vaccinerade och risk för falskt negativa svar vid HBsAg-testning [4]. Man har dock inte kunnat se någon klinisk skillnad mellan infektion med omuterade stammar och infektion med stammar muterade i α -determinanten.

Interferonbehandling

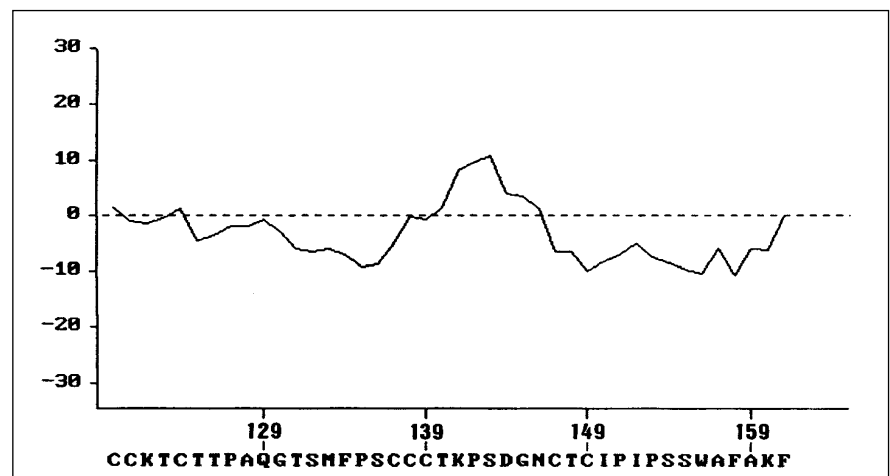
Den hittills enda registrerade behandlingen mot hepatit B är interferon. De bästa behandlingsresultaten erhålls bland västerländska patienter som ej smittats neonatalt och kan då nå över 50 procent serokonversion. Hos en del patienter ser man en initial förbättring som dock inte håller i sig. De återfår HBV-DNA i serum som tecken på en aktiv, pågående virusreplikation och laboratoriemässigt kan man se stigande transaminaser som tecken på recidiverande leverskada [30]. Hos mycket få av dessa patienter har man tittat på förändringar i HBV-DNA som en eventuell förklaring till försämringen. Studier från bl a Italien [31, 32 och författarens egna opublicerade observationer] har visat deletioner i pre-S2-regionen som uppkommit efter interferonbehandling. Det är framför allt den första hälften av genen som avlägsnats.

Det är intressant att notera att det är den första hälften av pre-S2-proteinet som är säte för såväl B- som T-cellsepitoper och som kan ge upphov till neutraliserande antikroppar mot HBV [33]. Mekanismen bakom pre-S2-deletionerna är okänd. Det är dock möjligt att virus gör sig av med en del av sitt genetiska material för att därigenom undkomma upptäckt av immunsystemet. Då de avlägsnade sekvenserna kodar för strukturer som ej är livsviktiga för virusets fortsatta överlevnad och replikationsförmåga skulle deletionen således gynna virus och inte patienten.

Sammanfattning

Hepatit B-virus har normalt en betydande genetik variabilitet. Det är främst pre-S- och S-generna som varierar mellan olika stammar och olika sub-

Figur 5. Hydrofilitetsdiagram över HBV S-proteinets aminosyror 120–161 enligt Hopp och Woods. Topp över medellinjen indikerar en hydrofil region och talar för bättre antigenicitet än en hydrofob region.



ANNONS

och genotyper. Som vi har sett förekommer emellertid även andra förändringar i hepatit B-virusets DNA, mutationer som kan leda till att virus beter sig på ett mer aggressivt sätt eller förändrar virusets kontakter med immunförsvaret och värdcellen.

Att bedöma betydelsen av olika mutationer kan göras på huvudsakligen två sätt. Det ena innebär att man experimentellt förändrar virusets DNA och sedan ser vilken effekt det har in vivo. Med ett virus som HBV, som inte växer i cellkultur och inte infekterar annat än primater, innebär denna metod stora praktiska svårigheter.

Den andra metoden är att gå molekylärepidemiologiskt tillväga. När fler data samlas där HBV-DNA-sekvenser kan korreleras med kliniska tillstånd bör man så småningom kunna få en klarare bild över vilka mutationer som är väsentliga för uppkomsten av olika sjukdomstillstånd.

Litteratur

1. Flaum A, Malmros H, Persson E. Eine nosokomiale Ikterus-Epidemie. Acta Medica Scandinavica Suppl 1925; XVI: 544-51.
2. Blumberg BS, Alter HJ, Visnich S. A »new» antigen in leukemia sera. JAMA 1965; 191: 541-6.
3. Ganem D, Varmus HE. The molecular biology of the hepatitis B viruses. Annu Rev Biochem 1987; 56: 651-93.
4. Feitelson MA. Biology of hepatitis B virus variants. Lab Invest 1994; 71: 324-49.
7. Miller RH, Kaneko S, Chung CT, Girones R, Purcell RH. Compact organization of the hepatitis B virus genome. Hepatology 1989; 9: 322-7.
8. Junker-Niepmann M, Bartenschlager R, Schaller H. A short cis-acting sequence is required for hepatitis B virus pregenome encapsidation and sufficient for packaging of foreign RNA. EMBO J 1990; 9: 3389-96.
9. Rossner MT. Hepatitis B virus X-gene product: A promiscuous transcriptional activator. J Med Virol 1992; 36: 101-17.
10. Kidd-Ljunggren K. Genetic variability in hepatitis B virus. Lund, 1995. Akad avh.
12. Carman WF, Jacyna MR, Hadziyannis S, Karayiannis P, McGarvey MJ, Makris A. Mutation preventing formation of hepatitis B e antigen in patients with chronic hepatitis B infection. Lancet 1989; 2: 588-91.
13. Ljunggren K, Kidd AH. Enzymatic amplification and sequence analysis of precore/core DNA in HBsAg-positive patients. J Med Virol 1991; 34: 179-83.
15. Barbera C, Calvo P, Coscia A, Perugini L, Dastole G, Randone A et al. Precore mutant hepatitis B virus and outcome of chronic infection and hepatitis in hepatitis B e-antigen positive children. Pediatr Res 1994; 36: 347-50.
16. Okamoto H, Tsuda F, Akahane Y, Sugai Y, Yoshida M, Moriyama K et al. Hepatitis B virus with mutations in the core promoter for an e antigen-negative phenotype in carriers with antibody to e antigen. J Virol 1994; 68: 8102-10.
17. Kidd-Ljunggren K, Öberg M, Kidd AH. The hepatitis B virus X gene: analysis of functional domain variation and gene phylogeny using multiple sequences. J Gen Virol 1995; 76: 2119-30.
19. Liang TJ, Hasegawa K, Rimon N, Wands

- JR, Ben-Porath E. Hepatitis B virus mutant associated with an epidemic of fulminant hepatitis. N Engl J Med 1991; 324: 1705-9.
22. Beasley RP, Hwang LY, Lin CC, Chen CS. Hepatocellular carcinoma and HBV: a prospective study of 22,707 men in Taiwan. Lancet 1981; 2: 1129-33.
23. Wang XW, Forrester K, Yeh H, Feitelson MA, Gu JR, Harris CC. Hepatitis B virus X protein inhibits p53 sequence-specific DNA binding, transcriptional activity, and association with transcription factor ERCC3. Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91: 2230-4.
24. Zhou MX, Watabe M, Watabe K. The X-gene of human hepatitis B transactivates the c-jun and alfa-fetoprotein genes. Arch Virol 1994; 134: 369-78.
25. Takada S, Kido H, Fukutomi A, Mori T, Koike K. Interaction of hepatitis B virus X protein with a serine protease, tryptase TL2 as an inhibitor. Oncogene 1994; 9: 341-8.
27. Brown SE, Howard CR, Zuckerman AJ, Steward MW. Affinity of antibody responses in man to hepatitis B vaccine determined synthetic peptides. Lancet 1984; 2: 184-7.
28. Carman WF, Zanetti AR, Karayiannis P, Waters J, Manzillo G, Tanzi E et al. Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus. Lancet 1990; 336: 325-9.

En fullständig litteraturförteckning kan erhållas från Karin Kidd-Ljunggren, Avdelningen för virologi, Umeå universitet, 901 85 Umeå.

MANNEN BAKOM SYNDROMET

Läkartidningens SYNDROMSERIE i bokform

Ett unikt medicinhistoriskt material, som ger en bild av männen (och en kvinna – Cornelia de Lange) bakom syndromen samt korta översikter över forskningsläge, diagnostik och behandling i dag.

Totalt 66 artiklar publicerade 1982–1989 har blivit en bok på 152 sidor i Läkartidningens format. Rikt illustrerad med bland annat 36 färgbilder. Därtill en sammanställning (i förminskat utförande) av de uppskattade tidningsomslag som hör till serien. Boken är inbunden och har hårda pärmar.

Beställ här:

..... exemplar Mannen bakom syndromet. Pris 150 kr/ex.

BESTÄLLARE:

ADRESS:

POSTNUMMER/POSTADRESS:

Insändes till Läkartidningen, Box 5603, 114 86 Stockholm.

Beställning per fax: 08-20 76 19