

## DNA-Integration

# Analyse chromosomal integrierter HBV-DNA durch inverse nested PCR

THOMAS TU, SHIRIN NKONGOLO, STEPHAN URBAN  
MOLEKULARE VIROLOGIE, ZENTRUM FÜR INFEKTIOLOGIE,  
UNIVERSITÄTSKLINIKUM HEIDELBERG

**Chronic infection with human hepatitis B virus (HBV) causes about 887.000 deaths annually and is a major risk factor for liver cancer through as-yet unclear mechanisms. HBV DNA integrates into the host cell genome early during infection. HBV integration is not required for viral replication but contributes to subviral particle formation. It is also associated with HBV-induced liver cancer, so its detection, quantification, and characterization are key to understanding HBV-associated disease.**

DOI: 10.1007/s12268-019-1047-5  
© Springer-Verlag 2019

Das humane Hepatitis-B-Virus (HBV) ist ein partiell doppelsträngiges DNA-Virus, das ausschließlich Hepatozyten infiziert (**Abb. 1**). Sein Genom kursiert in zwei Formen im Blut: (1) die *relaxed circular* (rc)DNA, die am häufigsten vorkommt und Vorläufer der replikationskompetenten Form des Virus ist; und (2) die *double-stranded linear* (dsl)DNA, die lan-

ge als replikatives Zwischenprodukt mit unbekannter Funktion angesehen wurde. HBV-dsDNA fungiert jedoch im Zellkern als Substrat von Reparaturenzymen für doppelsträngige DNA-Brüche und kann so in das Wirtsgenom integrieren [1].

Die Integration ist allen Hepadnaviren gemein, obwohl sie, anders als bei Retrovi-

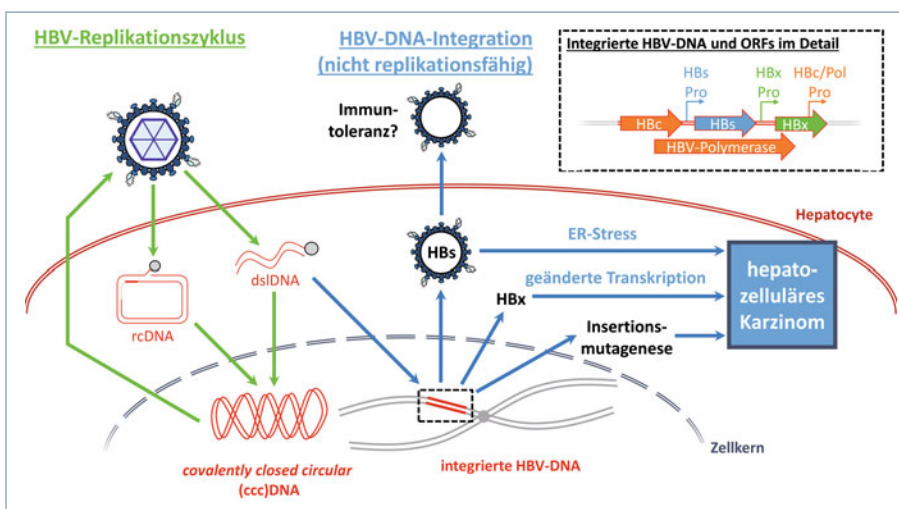
ren, keine Voraussetzung für die Virusvermehrung ist. Integrierte dsDNA ist so rearrangiert, dass virale Promotoren funktional getrennt von wichtigen offenen HBV-Leserahnen (Polymerase und Kapsidprotein) liegen. Diese können daher nicht exprimiert werden. Das Gen des HBV-Oberflächenantigens (HBs) hingegen bleibt intakt und erlaubt die mRNA-Transkription unter der Kontrolle des nativen Promotors. Wenn Zellen mit Integraten im Verlauf der chronischen Infektion klonal expandieren und HBsAg bilden, kann eine Immuntoleranz induziert werden. So können HBV-infizierte Zellen vor der Immunabwehr verborgen bleiben.

Die meisten Zellen HBV-induzierter Lebertumoren enthalten integrierte HBV-DNA, jedoch nur etwa jeder tausendste Hepatozyt im umgebenden nicht-malignen Gewebe. Es gibt also eine starke Assoziation zwischen der Integration von HBV-DNA und der positiven Selektion hepatozellulärer Karzinome (HCC). Wie genau Hepatozyten durch HBV-DNA-Integration transformiert werden, ist noch weitgehend unbekannt. Denkbar sind *cis*-vermittelte, von der Integrationsstelle abhängige oder *trans*-vermittelte, von der Integrationsstelle unabhängige Mechanismen. *Cis*-vermittelt sind z. B. Insertionen nahe Krebs-assoziiierter Gene, die Veränderungen der Expression zellulärer Gene durch Viruspromotoren zur Folge haben; *trans*-vermittelt ist z. B. die chronische Expression von Virusproteinen wie HBx und HBs, die Krebs-assoziierte Signalwege aktivieren können [2, 3].

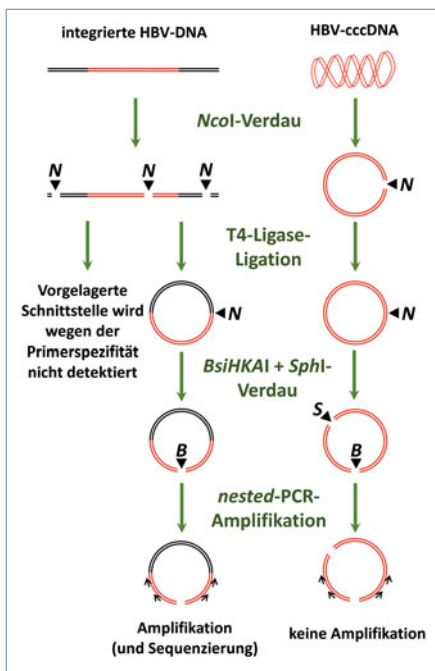
### Detektion von HBV-Integrationen

Um den grundlegenden Mechanismus der HBV-DNA-Integration und ihre Rolle in der Pathogenese zu untersuchen, haben wir die *inverse nested* PCR (invPCR; **Abb. 2**), verwendet. Die invPCR ist hochsensitiv und erlaubt die Detektion einzelner Integrationsereignisse. Sie ermöglicht die Identifizierung viraler und zellulärer DNA-Sequenzen an der Integrationschnittstelle und ist quantitativ.

Wir haben Integrationsereignisse in den erst seit Kurzem zur Verfügung stehenden



**▲ Abb. 1:** HBV-Replikation und -Integration. *Relaxed circular*-DNA (rcDNA) und *double-stranded linear*-DNA (dslDNA) können (nach Zirkularisierung) cccDNA hervorbringen; dslDNA kann sich darüber hinaus in zelluläre DNA integrieren. Durch Umlagerung im Genom wird der HBV-Core-Promotor von seinem *open reading frame* (ORF) getrennt (oben rechts), die integrierte HBV-DNA ist nicht replikationsfähig. Trotzdem könnte die HBV-DNA-Integration ein hepatozelluläres Karzinom befördern sowie Immuntoleranz – durch HBsAg-Produktion – induzieren.



▲ **Abb. 2:** Schema der *inverse nested-PCR* (invPCR). *NcoI* (N) schneidet einmal im zirkulären HBV-Genom; es entstehen jedoch zwei Fragmente der integrierten DNA. Durch Ligation rezirkuliert die genomische HBV-DNA, aus dem Integrat mit zellulärer DNA entstehen zwei Zirkel. *BsiHKAI*- (B) und *SphI*-Verdau (S) führt zu einem Segment zellulärer DNA, flankiert von Fragmenten des HBV-Integrats. Die selektive Amplifikation von replikativen Zwischenformen und HBV-cccDNA erfolgt durch spezifische Primer.

*in vitro*-HBV-Infektionssystemen [4, 5] analysiert: Integration findet schon sehr früh (unter drei Tage) nach der Infektion statt. Voraussetzung ist die rezeptorvermittelte Endozytose der dsDNA-Form umhüllter Viruspartikel. Dies impliziert, dass Integrationsereignisse ständig im Zuge der Virusamplifikation stattfinden können, im Gegensatz zur bisherigen Annahme, dass dies erst Jahre nach der Infektion geschieht [6]. Integrationen ereignen sich im Wesentlichen zufällig und über das gesamte menschliche Genom verteilt [7]. Folglich können Integrationsstellen als „Fingerabdrücke“ von Hepatozytenklonen verwendet werden (**Abb. 3**). Die invPCR kann so klonale Expansion in HBV-infizierten Patienten detektieren.

### Klonale Expansion von Hepatozyten in Patienten mit chronischer HBV-Infektion

Mithilfe der invPCR haben wir [8] und andere [9] herausgefunden, dass Patienten mit ausgeprägten Immunantworten gegen HBV-infizierte Zellen signifikant größere Hepato-

zytenklone beherbergen. Solche Immunantworten treten häufig bei chronischer Infektion auf (HBe-Antigen-Serokonversion). Die expandierten Klone lassen sich in mathematischen Modellen mit selektiver (nicht zufälliger) Expansion erklären. Einige Hepatozyten hatten also einen Überlebensvorteil.

Die invPCR ermöglicht die Untersuchung, ob die Integration an bestimmten Stellen zelluläres Wachstum begünstigt (wie im Modell des Waldmurmeltiers für Hepadnavirus-induziertes HCC beobachtet [10, 11]). Wir haben jedoch keine eindeutigen Unterschiede zwischen Integrationsstellen gefunden, die gehäuft in HBV-Patienten mit viel oder wenig klonaler Expansion vorkamen, verglichen mit Zellkulturmodellen (vor der klonalen Expansion) oder *in silico*-Simulationen (basierend auf zufälliger Integration) [7]. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die HBV-Integration nicht *cis*-vermittelt die Expansion von Hepatozytenklonen befördert (aber eine Tumorprogression später in der Karzinogenese begünstigen könnte [12]).

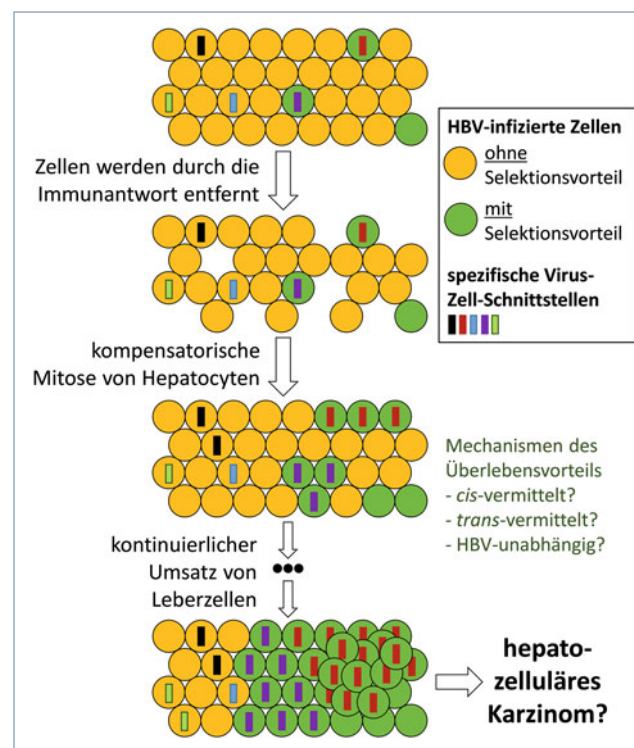
### Fazit und Ausblick

Warum HBV-Integrationen gehäuft bei hepatozellulären Karzinomen vorkommen, ist noch nicht vollständig verstanden. Möglicherweise fördern von der Integrationsstelle unabhängige Prozesse die klonale Expansion der Hepatozyten (z. B. durch HBsAg-Überex-

pression, die Mitosesignalwege aktiviert). Mit unserer Methode können wir in Zukunft untersuchen, ob transkriptionsaktive HBV-DNA-Integrationen gehäuft während einer HBV-assoziierten Krankheitsprogression vorkommen. Das würde bedeuten, dass HBs von integrierter HBV-DNA der Zelle einen Überlebens- oder Wachstumsvorteil einräumt.

Die Quantifizierung integrierter HBV-DNA ist eine geeignete Methode, um die Dynamik genetischer Rearrangements im Rahmen einer HBV-Infektion zu analysieren und Pathogenesemechanismen zu identifizieren. Ob die HBs-Expression alleine die HCC-Bildung begünstigt oder präkanzeröse Mutationen nur als „Trittbrettfahrer“ auftreten, sollte für neue therapeutische Strategien bedacht werden.

Wichtig ist zudem, dass die invPCR auch bei anderen Viren (z. B. HIV, HPV und HTLV) angewendet werden kann, die in das Wirtsgenom integrieren. Des Weiteren können Transposons analysiert werden. Damit gelang es bereits, eine Virus-bedingte extensive klonale Proliferation von T-Zellen in HTLV1-Patienten zu zeigen [13]. Ein tieferer Einblick in die Methodik kann aus Publikationen und einem Video entnommen werden mit spezifischen Empfehlungen für das Design von invPCR [14] sowie technischen Hinweisen [15], um das Protokoll auf andere Systeme auszuweiten. ■



◀ **Abb. 3:** Zufällige klonale Expansion von Zellen (gelb) erzeugt klonale Kolonien. Bei einem Selektionsvorteil einzelner Klone (grün) kann die Kopienzahl stark erhöht sein. Mittels invPCR wird die Zahl einzelner Virus-Zell-Schnittstellen (Rechtecke verschiedener Farben) bestimmt und somit die Größe einer spezifischen klonalen Kolonie. Diese Kolonien könnten Vorläufer eines hepatozellulären Karzinoms sein (adaptiert nach [2, 12]).

## Literatur

- [1] Tu T, Budzinska MA, Shackel NA et al. (2017) HBV DNA integration: molecular mechanisms and clinical implications. *Viruses* 9:75
- [2] Tu T, Budzinska MA, Shackel NA et al. (2015) Conceptual models for the initiation of hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma. *Liver Int* 35:1786–1800
- [3] Levrero M, Zucman-Rossi J (2016) Mechanisms of HBV-induced hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 64:S84–S101
- [4] Yan H, Zhong G, Xu G et al. (2012) Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *Elife* 3, doi: 10.7554/eLife.00049
- [5] Ni Y, Lempp FA, Mehrle S et al. (2014) Hepatitis B and D viruses exploit sodium taurocholate co-transporting polypeptide for species-specific entry into hepatocytes. *Gastroenterology* 146:1070–1083
- [6] Tu T, Budzinska MA, Vondran FWR et al. (2018) Hepatitis B virus DNA integration occurs early in the viral life cycle in an *in vitro* infection model via NTCP-dependent uptake of enveloped virus particles. *J Virol* 92, doi: 10.1128/JVI.02007-17
- [7] Budzinska MA, Shackel NA, Urban S et al. (2018) Sequence analysis of integrated hepatitis B virus DNA during HBeAg-seroconversion. *Emerg Microbes Infect* 7:142
- [8] Tu T, Mason WS, Clouston AD et al. (2015) Clonal expansion of hepatocytes with a selective advantage occurs during all stages of chronic hepatitis B virus infection. *J Viral Hepat* 22:737–753
- [9] Mason WS, Gill US, Litwin S et al. (2016) HBV DNA integration and clonal hepatocyte expansion in chronic hepatitis B patients considered immune tolerant. *Gastroenterology* 151:986–998
- [10] Hsu T, Möröy T, Etienne J et al. (1988) Activation of c-myc by woodchuck hepatitis virus insertion in hepatocellular carcinoma. *Cell* 55:627–635
- [11] Hansen LJ, Tennant BC, Seeger C et al. (1993) Differential activation of myc gene family members in hepatic carcinogenesis by closely related hepatitis B viruses. *Mol Cell Biol* 13:659–667
- [12] Budzinska MA, Shackel NA, Urban T et al. (2018) Cellular genomic sites of hepatitis B virus DNA integration. *Genes (Basel)* 9:356
- [13] Ohshima K, Mukai Y, Shiraki H et al. (1997) Clonal integration and expression of human T-cell lymphotropic virus type I in carriers detected by polymerase chain reaction and inverse PCR. *Am J Hematol* 54:306–312
- [14] Tu T, Jilbert AR (2017) Detection of hepatocyte clones containing integrated hepatitis B virus DNA using inverse nested PCR. *Methods Mol Biol* 1540:97–118
- [15] Tu T, Urban S (2018) Detection of low copy number integrated viral DNA formed by *in vitro* hepatitis B infection. *J Vis Exp*, doi: 10.3791/58202

## Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Stephan Urban  
Zentrum für Infektiologie, Molekulare Virologie  
Universitätsklinikum Heidelberg  
Center for Integrative Infectious Disease Research  
Im Neuenheimer Feld 344  
D-69120 Heidelberg  
Tel.: 06221-564902  
Stephan.Urban@med.uni-heidelberg.de

## AUTOREN



### Thomas Tu

2004–2008 Studium der Biomedizinischen Wissenschaften an der Universität Adelaide, Australien; dort 2008–2013 Promotion in Biomedizin bei Prof. Dr. A. Jilbert. 2012–2015 Postdoktorand an der Universität Sydney, Australien, bei Prof. Dr. N. Shackel. Seit 2015 Postdoktorand an der Universität Heidelberg bei Prof. Dr. S. Urban.



### Shirin Nkongolo

2008–2015 Medizinstudium an den Universitäten Heidelberg und Montpellier, Frankreich. 2012–2015 Promotion in Medizin an der Universität Heidelberg bei Prof. Dr. S. Urban. Seit 2016 Ärztin an der Universitätsklinik Heidelberg und Postdoktorandin an der Universität Heidelberg bei Prof. Dr. S. Urban.



### Stephan Urban

1982–1992 Chemie- und Biochemiestudium an der Universität Tübingen. 1992–1995 Promotion am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried bei Prof. Dr. P. H. Hofschneider. 1995–2000 Postdoktorand am ZMBH der Universität Heidelberg bei Prof. Dr. H. Schaller. 2000 Habilitation in Molekularbiologie an der Universität Heidelberg; dort 2001–2008 Arbeitsgruppenleiter Molekulare Virologie, 2008–2014 apl. Professor an der Biologischen Fakultät und seit 2014 W3-Professor für Translationale Virologie.